

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



**Jiří Namyslov**

Buněčné mechanismy diferenciacce apoplastických bariér v kořeni

Cellular mechanisms of differentiation of root apoplastic barriers

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Praha, 2015



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 5. 2015

Podpis



Rád bych poděkoval především RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za trpělivé vedení mé práce a za její cenné rady a připomínky podávané s nadměrnou ochotou a pečlivostí. Také bych chtěl poděkovat celému laboratornímu týmu za trpělivost a své rodině a přátelům za psychickou podporu.



## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Casparyho proužky .....	2
2.1. Chemické složení Casparyho proužků.....	3
2.2. Proces vzniku Casparyho proužků.....	6
2.3. Vznik membránové domény Casparyho proužků.....	7
2.4. Lokalizované ukládání ligninu v Casparyho proužcích.....	10
3. Suberinové lamely .....	11
3.1. Chemické složení a struktura suberinových lamel .....	12
3.2. Mechanismus syntézy a ukládání suberinu.....	13
4. Terciárně ztloustlé buněčné stěny .....	18
5. Polarita membrány .....	19
5.1. Transport boru a křemíku – příklad centrálně-periferní polarity .....	21
6. <i>SHORT-ROOT</i> a <i>SCARECROW</i> .....	27
7. Závěr .....	28
8. Seznam použité literatury: .....	29





## **Abstrakt**

Apoplastické bariéry (exodermis a endodermis) slouží především k regulaci volného pohybu látek apoplastem, čehož dosahují modifikacemi buněčných stěn. Zatímco na anatomické úrovni jsou bariéry studovány již dlouho, teprve v poslední době začínají být postupně identifikovány molekulární mechanismy, které jsou za vznik těchto modifikací zodpovědné. Nejdůležitější modifikací jsou Casparyho proužky, ligninové útvary, které se ukládají za pomoci CASP proteinů v ekvatoriální oblasti tzv. CSD domény na plazmalemě a tím překlenují místa dotyku sousedních buněk v exodermis a endodermis. Na jejich vzniku se kromě proteinů CASP podílí také místně specifické enzymy syntézy ligninu (peroxidáza PER64, NADPH oxidáza RBOHF). V těchto buněčných vrstvách se krátce po diferenciaci proužků, mezi plazmalemou a buněčnou stěnou, ukládají vrstvy tzv. suberinové lamely sloužící také k blokaci apoplastu. Po lamelách mohou v buňkách vznikat terciární ztlustliny buněčných stěn (U-ztlustliny), které vznikají ukládáním sekundární buněčné stěny, o jejichž mechanismech tvorby v kořenové endodermis se zatím mnoho neví. Procesy vzniku apoplastických bariér tedy souvisejí se syntézou a ukládáním ligninu, suberinu a sekundární buněčné stěny. V souvislosti s významem apoplastických bariér v regulaci příjmu látek je významná také polarita výskytu membránových přenašečů živin (laterální polarita membrány) a zapojení dalších molekulárních mechanismů v kořenových buňkách, které tato práce shrnuje.

## **Klíčová slova**

Casparyho proužky, Suberinová lamela, Apoplast, Apoplastická bariéra, Exodermis, Endodermis, Lignin, Suberin

## **Abstract**

Apoplastic barriers (exodermis and endodermis) are primarily used to regulate the free movement of substances within apoplast due to modifications of cell walls. While at the anatomical level, the barriers are studied for a long time, only recently the molecular mechanisms that are behind the emergence of these modifications are gradually identified. The most important modifications are Casparian strips that fill the space between the adjacent cells in exodermis and endodermis. Casparian strips are lignin-based structures formed with the help of CASP proteins located in equatorial region of plasmalema (called CSD membrane domain). In addition to CASP proteins, the formation of Casparian strip involves activity of site-specific enzymes of lignin synthesis (PER64 peroxidase, NADPH oxidase RBOHF). In these cell layers shortly after differentiation of Casparian strips, the deposition of suberin occurs between plasmalema and primary cell wall leading to formation of suberin lamellae also serving to block the apoplast. Next step of differentiation is the formation of U-shaped tertiary thickenings that are formed by deposition of secondary cell wall, whose formation mechanism in the root endodermis is not yet well-known. Processes responsible for formation of apoplastic barriers are thus related to the synthesis and deposition of lignin, suberin and secondary cell walls. The function of apoplastic barriers in regulation of root solute uptake is related also to the polarity of membrane transporters occurrence (lateral polarity of plasmalema) and other molecular mechanisms that are summarized in this thesis.

## **Key words**

Casparian strips, Suberin lamellae, Apoplast, Apoplastic barrier, Exodermis, Endodermis, Lignin, Suberin

## Seznam použitých zkratek

- AB – apikálně-bazální polarita (Apical-Basal Polarity)
- ABC – transportér s ATP-vazebnou kazetou (ATP-Binding-Cassette)
- ASFT – alifatickýsuberin-feruláttransferáza (Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase)
- BOR1-7 – přenašeč borátového aniontu (Boron Efflux Carrier 1-7)
- CASPs – proteiny domény Casparého proužku (Casparian Strips Domain Proteins)
- CDEF1 – z angl. Cuticle Destruction Factor 1
- CoA – koenzym A (Coenzyme A)
- CP – centrálně-periferní polarita (Central-Peripheral Polarity)
- CSD – membránová doména Casparého proužku (Casparian Strip Membrane Domain)
- CYP – cytochromP450-monooxygenáza (Cytochrome P450 Monooxygenase)
- DAISY – dokosanyl-CoA syntáza KCS2 (Docosanoic Acid Synthase)
- DAPI – z angl. 4',6-diamidin-2-fenylindol
- EMS – ethylmethansulfonát (Ethylmethan Sulfonate)
- ER – endoplazmatické retikulum
- ESB1 – z angl. Enhanced Suberin 1
- FACT – mastný alkohol:kafeoyl-CoA-kafeoyltrasferáza (Fatty Alcohol: Caffeoyl-CoA transferase)
- FAE – komplex elongázy mastných kyselin (Fatty Acid Elongation Komplex)
- FAR – reduktáza mastných kyselin (Fatty Acy Reductase)
- FTH – suberin-feruláttransferáza (Suberin Feruloyl Transferhase)
- FYVE – fosfatidylinositol-3-fosfát vazebná doména, odvozeno od Fab1, YOUTB, Vac1 a AEEA1
- G3P – glycerol-3-fosfát (Glycerol-3-Phosphate)
- GFP – zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)
- GPAT – glycerol-3-fosfát-acyltransferáza (Glycerol-3-Phosphate Acy transferase)
- HORST – CYP86A1, patřící do rodiny cytochrom P450-monooxygenáz (Hydroxylase Of Root Suberized Tissue)
- IRT1 – přenašeč Fe<sup>2+</sup> (Iron-Regulated Transporter 1)
- KCS – β-ketoacyl-CoA-syntáza (β-Ketoacyl-CoA Synthase)
- LACS – syntetáza dlouhořetězcového acyl-CoA (Long-Chain Acy-CoA Synthetase)
- Lsi1, 2 – přenašeč křemíku (Low Silicon Rice 1, 2)
- LTP – protein přenášející lipidy (Lipid Transfer Protein)

MIP – z angl. Major Intrinsic Protein

NADPH – nikotinamidadenindinukleotid-fosfát (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

NIP5;1 – kanál pro příjem kys. borité, z angl. Nod26-Like Intrinsic Protein 5;1

NRAMP – z angl. Natural Resistence-Associated Macrophage Protein

NRT1.1, NRT2.4 – přenašeč dusíku, z angl. Nitrate Transporter 1.1, 2.4

NST – z angl. NAC Secondary Wall Thickening Promoting Faktor

PER – peroxidáza (např. PER64 – peroxidáza64)

PID – serin/treonin-proteinkináza, PINOID

PIS1 – z angl. Polar Auxin Transport Inhibitor Sensitivitel

PM – plazmatická membrána

RALPH – hydroxyláza CYP86B1, patřící do rodiny cytochrom P450-monooxygenáz (Root Aliphatic Plant Hydroxylase)

RBOHF, B, D – z angl. Respiratory Burst Oxidase Homolog F, B, D

SCR – z angl. Scarecrow

SGN3 – Schengen3

SGN4 – Schengen4, gen identický s RBOHF

SHR – z angl. Short-root

SOD – superoxid-dismutáza (Superoxid Dismutase)

SPAD – polyalifatická doména suberinu (Suberin Polyaliphatic Domain)

SPPD – polyfenolická doména suberinu (Suberin Polyphenolic Domain)

SWN – z angl. Secondary Wall NAC Domain Protein

VLCFA – mastná kyselina s velmi dlouhým řetězcem, > C20 (Very Long-Chain Fatty Acid)

$\alpha,\omega$ -DCA –  $\alpha,\omega$ -dikarboxylová kyselina ( $\alpha,\omega$ -Dicarboxylic Acid)

$\omega$ -OH –  $\omega$ -hydroxykyselina ( $\omega$ -Hydroxy Fatty Acid)

## 1. Úvod

Tato práce shrnuje nejnovější poznatky o mechanismu vzniku, buněčné struktuře a chemickém složení apoplastických bariér, které mají za úkol v kořeni regulovat volný pohyb látek apoplastem, čímž dokážou zároveň regulovat příjem vody a živin a bránit přístupu nežádoucích látek nebo patogenů dostávajících se do jeho vnitřních pletiv. Bariéry s touto funkcí jsou typické především pro endodermis, ale vyskytují se také ve vnější vrstvě primární kůry – hypodermis, která je kryta pokožkou kořene – rhizodermis. Nejnvnitřnější vrstvou primární kůry je endodermis. Tato vrstva je funkčně mnohem specifitější a rozvinutější než vrstva exodermální, je jednovrstevná a slouží jako hlavní bariéra regulující pohyb látek do středního válce. Buňky endodermis tvoří ve své ekvatoriální oblasti opaskovité struktury skládající se především z ligninu, tzv. Casparyho proužky. Tyto proužky společně tvoří apoplastickou bariéru kolem středního válce. Casparyho proužky se formují v první fázi vývoje endodermální buňky. Druhým stádiem je pak ukládání suberinových lamel na celé ploše tangenciálních, radiálních a příčných buněčných stěn. A v poslední terciární fázi dochází k ukládání sekundární buněčné stěny. Terciárně ztloustlá buněčná stěna je popisována jako U-ztlustlina, neboť na příčném řezu má buňka ztloustlou vnitřní tangenciální stěnu, stěny radiální a transverzální, tvořící na příčném řezu tvar písmene „U“. Z prostorového hlediska pak tvar připomínající kalíšek.

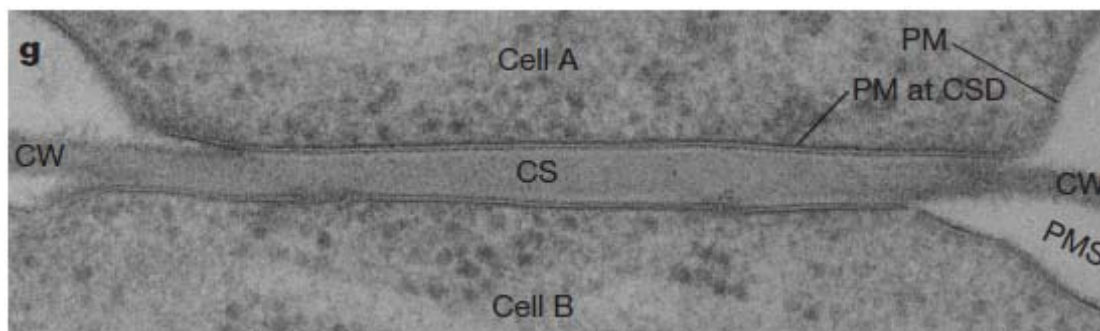
Ale tyto bariéry nenajdeme pouze u endodermis. U většiny rostlin se Casparyho proužky vyskytují také v hypodermis, která se poté nazývá exodermis. Z výzkumu prováděného na 200 krytosemenných rostlinách velká většina z nich (90,5%) měla vyvinutou exodermis s Casparyho proužky (Peterson a Perumalla 1990; Hose *et al.* 2001). Zde také, stejně jako v endodermis, fungují jako selektivní apoplastické bariéry pro vodu a soluty, tentokrát bránící toku přímo z půdy do kořene. Látky se mohou pohybovat apoplastem nebo symplastem. Apoplastický pohyb probíhá buněčnými stěnami a nedostává se do cytoplazmy. Naproti tomu symplastický pohyb jde napříč buňkami, dostává se přes buněčnou stěnu a setkává se s cytoplazmou. Apoplastu v endodermis stojí v cestě právě Casparyho proužky, které jsou téměř nepropustné a nedovolí průtoku většiny látek a iontů. Soluty pohybující se apoplastem jsou po setkání s nimi nuceny přejít přes plazmatickou membránu do symplastu a proniknout dovnitř do buněčné cytoplazmy, čímž buňka dokáže lépe regulovat obsah látek putujících do středního válce. Celý proces vzniku Casparyho proužků je založen především na ukládání ligninu do středové oblasti buněčných stěn, který u *Arabidopsis* není přímo závislý

na suberinu a účastní se ho mnoho proteinů a mechanismů, z nichž některé byly v nedávné době identifikovány (Esau 1953; Enstone *et al.* 2003; Geldner 2013; Roppolo *et al.* 2014).

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o mechanismech ukládání bariér v endodermis a částečně v exodermis. Například o nedávno objevených proteinech zapojených v tvorbě Casparyho proužků (CASP proteiny, oxidáza RBOHF, peroxidáza PER64), účastníci se lokalizace ligninu.

## 2. Casparyho proužky

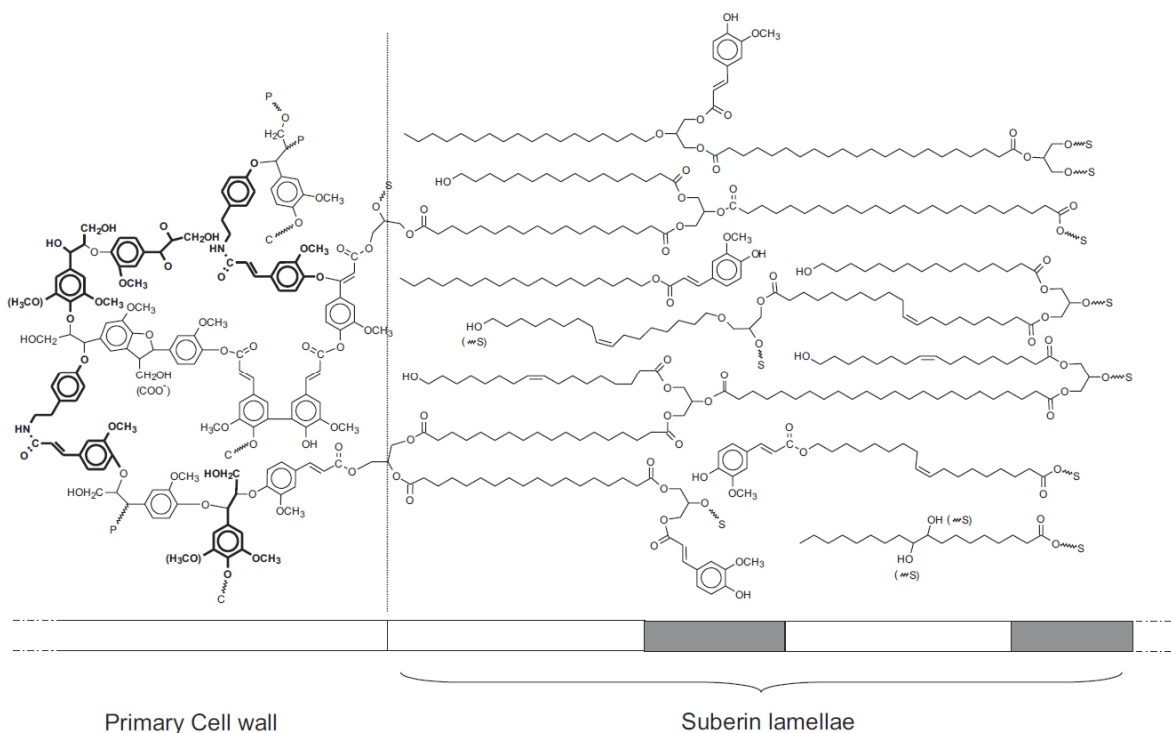
V buňkách endodermis se v centru transverzálních a antiklinálních buněčných stěn tvoří opaskovité struktury lokalizované paralelně s povrchem kořene (Obr. 1.). Tyto struktury se nazývají Casparyho proužky a jsou to tenké oblasti buněčné stěny, ve kterých dochází k ukládání ligninu, případně suberinu (Kroemer 1903; Esau 1953). Pojí se s plazmatickou membránou buňky a přehrazují tak celý apoplastický prostor, čímž fungují jako apoplastická bariéra, která fyzicky brání extracelulární difuzi, dovoluje endodermálním buňkám kontrolovat propustnost pro vodu a soluty do stéle, ale také brání zpětnému toku iontů z apoplastu stéle do apoplastu primární kůry. Jejich výskyt tedy zajišťuje oddělení primární kůry od stéle (Kroemer 1903; Esau 1953; Enstone *et al.* 2003; Geldner 2013; Hosmani *et al.* 2013).



**Obr. 1.** Casparyho proužek v elektronovém mikroskopu v kořeni cibule. CW – buněčná stěna, PM – plazmatická membrána, CS – Casparyho proužek, CSD – membránová doména Casparyho proužku, PMS – prostor vytvořený plazmolýzou (Roppolo *et al.* 2011).

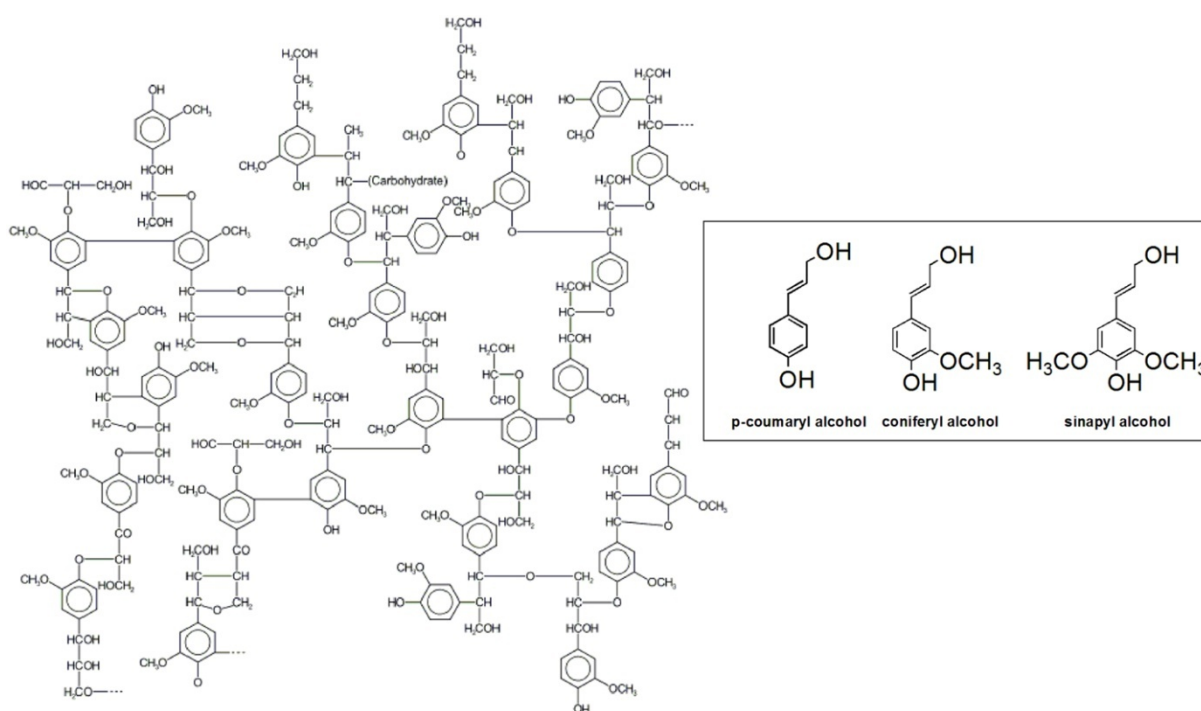
## 2.1. Chemické složení Casparyho proužků

Během dvacátého století se rozhodovalo o hlavním polymeru tvořícím tyto proužky. Jejich objevitel Robert Caspary již v roce 1865 stanovil dva hlavní kandidáty lignin a suberin, ale s dobovými histochemickými technikami nemohl hlavní polymer určit. Nicméně dalším zkoumáním v endodermis byla poprvé popsána lignin-like fluorescence (van Fleet 1961). A v dalších pracích na různých rostlinných druzích se ukázalo, že lignin je pro tvorbu velmi důležitý, zatímco suberin se zde vyskytuje jen v menším množství (Zeier *et al.* 1999), nebo zřejmě nemusí být pro diferenciaci funkčních Casparyho proužků vůbec potřebný (Naseer *et al.* 2012). Suberin je polymer, jehož struktura je složena ze dvou vzájemně oddělených domén, které jsou spojeny glycerolem a při pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu vytvářejí v prostoru mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou střídavě světlé a tmavé pruhy (Obr. 2.). Polyalfatická doména (SPAD) tvořící světlé pruhy je do buněčné stěny usazená třídimenzionální polyesterová síť hydroxykyselin, velmi dlouhých řetězců mastných kyselin a krátkých esterifikovaných hydroxyskořicových kyselin. Polyfenolická doména (SPPD) vytvářející tmavé pruhy je svou prostorovou strukturou polymerické sítě odvozené od monolignolů (kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol) přirovnávána k ligninu (Bernards 2002).



**Obr. 2.** Model struktury suberinu u *Solanum tuberosum* s naznačením střídavě tmavých a světlých pruhů v suberinové lamele oddělené od buněčné stěny (Bernards 2002).

Struktura ligninu představuje racemický heteropolymer složený ze tří aromatických hydroxyskořicových alkoholů (Obr. 3.) s odlišným stupněm methoxylace. Tyto ligninové prekurzory jsou stejné jako u SPPD (*p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol) a nejprve se syntetizují v cytoplazmě, poté jsou v prostoru buněčné stěny za pomoci peroxidáz a lakáz přeměněny na radikály a polymerizují. Samotná polymerizace ligninu je zprostředkována pomocí „dirigent“ proteinů. Monolignoly *p*-kumarylalkohol (M1<sub>H</sub>), koniferylalkohol (M1<sub>G</sub>) a sinapylalkohol (M1<sub>S</sub>), produkují po začlenění do vznikajícího polymeru fenylypropanové jednotky ligninu *p*-hydroxyfenyl (H), guaiacil (G) a syringyl (S). Samotná polymerizace ligninu zřejmě neprobíhá zcela spontánním párováním radikálů, ale účastní se jí také „dirigent“ proteiny které ovlivňují prostorové uspořádání monomerů ve vznikajícím polymeru (Davin a Lewis 2000; Boerjan *et al.* 2003; Hatfield a Fukushima 2005). Vzniklé produkty jsou spojeny etherovými vazbami do struktury ligninu, která se mezidruhově liší svým obsahem monolignolů (Boerjan *et al.* 2003).



**Obr. 3.** Struktura ligninu založená na třech monomerech *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol (Christopher *et al.* 2014).

Kvůli podobnosti mezi ligninem a aromatickou doménou suberinu v subcelulárním prostoru endodermis, je obtížné tyto dva polymery od sebe jednoznačně odlišit. Množství suberinu v endodermis je u každého druhu jiné a mění se i během růstu kořenů. Což dokazuje experiment izolování jednotlivých zón na kořenech *Zea mays*, *Clivia miniata* a *Pisum*



*sativum*, kdy se ukázalo, že se malé procento suberinu vyskytuje v endodermálních buňkách v prvním stádiu vývoje, které jsou nejbližší kořenové špičce a zatím obsahují pouze Casparyho proužky. Tento suberin se od suberinových lamel, které se ukládají v průběhu sekundárního stádia vývoje endodermis, lišil větším obsahem karboxylových kyselin a 2-hydroxykyselin (Zeier *et al.* 1999). Nedávná studie na *Arabidopsis* chemickými a histochemickými metodami i s využitím transformovaných linií ukázala, že suberin u *Arabidopsis* není nutný ani v počátku ukládání proužků a struktura bariéry se zakládá pouze pomocí ligninového polymeru (Naseer *et al.* 2012; Geldner 2013). Většinou tam, kde se v rostlině vyskytují Casparyho proužky dochází k ukládání suberinu pro tvorbu suberinových lamel až později. Pomocí fluorescenčního barvení propidium jodidem (PI), často používaném ke zvýraznění buněčných stěn v kořeni *Arabidopsis*, ale který může být využit také jako vhodná apoplastická sonda, se ukázalo, že lignin funguje jako počáteční složka Casparyho proužku. A s využitím rostlin nesoucích transkripční fúzi s reportérovým genem pro GUS, se ukázalo, že pouze geny *CASPARIAN STRIP DOMAIN PROTEIN 1 (CASPI)* zajišťující lokalizaci proužku (viz níže) a *ALIPHATIC SUBERIN FERULOYL TRANSFERASE (ASFT)*, jsou v kořenové endodermis exprimovány v souvislém sloupci už od špičky. Přestože je ASFT jedním z enzymů syntézy suberinu, sama o sobě depozici suberinu do Casparyho proužku zajistit nedokáže, katalyzuje inkorporaci kyseliny ferulové do alifatické složky suberinu (Bernards 2002; Molina *et al.* 2009). Její aktivita se ale zřejmě může podílet na integraci některých alifatických esterů kyseliny ferulové do Casparyho proužku (Naseer *et al.* 2012). Naproti tomu ostatní geny, kódující enzymy syntetizující suberin, měly velmi pozdní počátek aktivity, tj. byly exprimovány mnohem dále od kořenové špičky v místech, kde již jsou endodermální Casparyho proužky diferencované. Tím se dokázalo, že suberin není syntetizován v oblasti Casparyho proužku (Naseer *et al.* 2012). Pro lepší poznání významu akumulace suberinu pro stavbu Casparyho proužku byl u vybraných rostlin *Arabidopsis* použit *CUTICLE DESTRUCTION FACTOR 1 (CDEF1)* vnesený pod endodermis specifickým promotorem. Tento gen kóduje kutinázu, schopnou degradovat suberin. U takto transformovaných rostlin proto došlo působením kutinázy k místně specifické degradaci suberinu v endodermální vrstvě, což nemělo žádný vliv na strukturu kořenů, ani na tvorbu Casparyho proužků (Naseer *et al.* 2012). Význam ligninu v tvorbě Casparyho proužku byl naopak prokázán, když při blokaci jeho syntézy se Casparyho proužky tvořily až po delší době, na rozdíl od blokace syntézy suberinu, kdy k žádnému viditelnému zpoždění tvorby nedocházelo. Význam ligninu ve stavbě Casparyho proužku dokládají také experimenty s *esb1* mutanty *Arabidopsis*. ENHANCED SUBERIN 1 (ESB1) je protein sekretovaný k lokalizaci do Casparyho proužku

(Geldner 2013; Hosmani *et al.* 2013). Tento protein patří mezi „dirigent“ proteiny potřebné pro správné řízení polymerizace ligninu. Dirigent proteiny poskytují neenzymatickou šablonu, podle které se spojují monolignolové jednotky a vytvářejí tak stereochemii vzniklého dimerického ligninu v Casparyho proužku (Davin a Lewis 2000).

Použití rostlin nesoucích translační fúzi s červeně fluerescenčním mCherry odhalilo, jak je *ESB1* exprimován v endodermis a lokalizován jako opaskovitá struktura podél ekvatoriální linie endodermální buňky, v podobném umístění jako později se tvořící Casparyho proužky. ESB1-mCherry se v počáteční lokalizaci endodermální buňky objevuje v ostrůvcích, které poté splynou do spojitého proužku. Také elektronová mikroskopie v kombinaci s imunodetekcí potvrzuje, že je protein ESB1 lokalizován v oblasti budoucího Casparyho proužku a tato lokalizace chybí v *esb1-1* mutantu, což mu působí kompletní ztrátu dobře organizované struktury Casparyho proužku. Gen kódující ESB, *AT2G28670* je primárně exprimován v endodermis kořene. A mutant *esb1* také ukazuje propojení regulačních drah v kořeni, když při narušení lignifikace endodermálních Casparyho proužků dochází ke stimulaci ukládání suberinu, což je jen nedostatečnou kompenzací, která nedokáže tolik bránit apoplastickému transportu do kořene. Ve spojitosti se suberinovými lamelami má mutant dvojnásobný obsah alifatického suberinu, 50% redukci v obsahu vápníku a 40% zvýšení sodíku. Tyto změny jsou spojeny se sníženou transpirací a zvýšenou rezistencí k vadnutí rostliny (Baxter *et al.* 2009). Bylo také prokázáno, že pro správnou lokalizaci ESB1 je nezbytná přítomnost CASP1 proteinu. Naopak ztráta ESB1 narušuje lokalizaci CASP1 v membránové doméně Casparyho proužku, a to ukazuje na reciproční vztah a důležitost ve formování proužků u obou těchto proteinů (Hosmani *et al.* 2013).

## **2.2. Proces vzniku Casparyho proužků**

Lze stručně definovat jako ukládání ligninu do předem ohraničené oblasti buněčné stěny endodermální buňky. Nejprve se za účasti CASP proteinů ustaví membránová doména Casparyho proužku (CSD, CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN). CASP se koncentrují v oblasti membrány v místě budoucího proužku a s přispěním dalších proteinů zde budují proteinové lešení základající CSD. Následuje lokalizované ukládání a polymerizace ligninu zprostředkovaná peroxidázou, která vyžaduje peroxid vodíku, jehož zdrojem je superoxid produkovaný NADPH oxidázou a následně dismutovaný superoxidodismutázou.

### 2.3. Vznik membránové domény Casparyho proužků

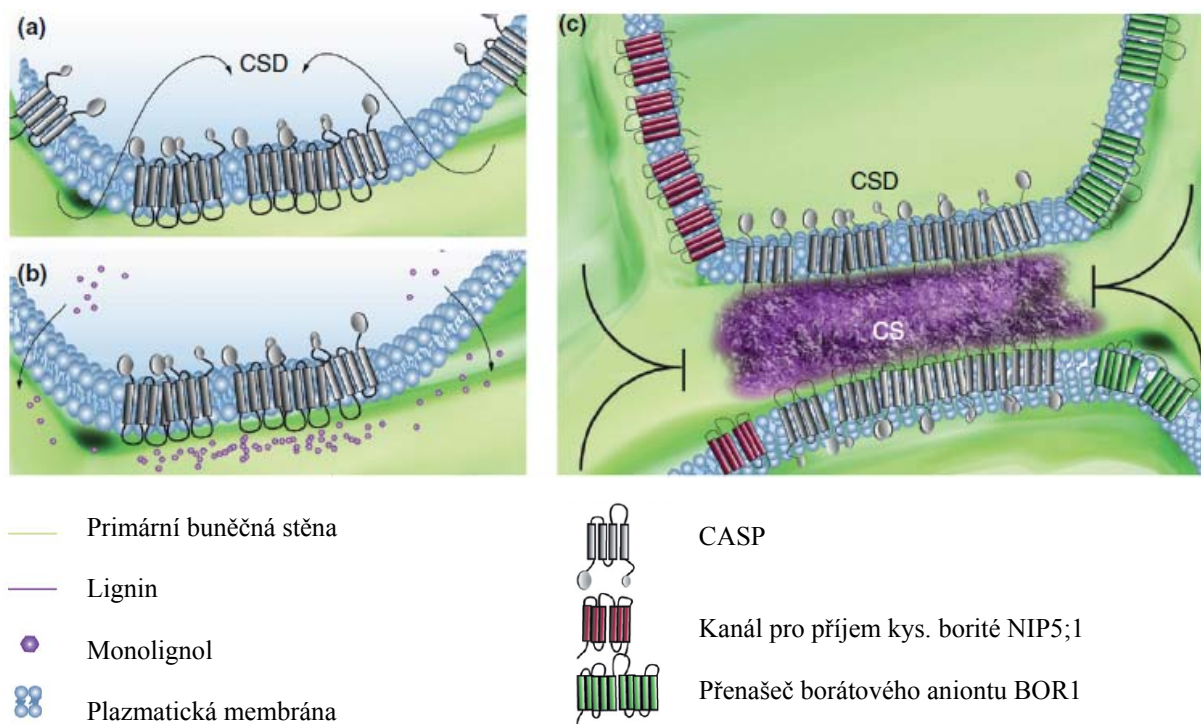
CASPARIAN STRIPS DOMAIN PROTEINS CASPs jsou nedávno objevené membránové proteiny se čtyřmi transmembránovými částmi s cytosolickou amino a karboxy terminální doménou a konzervovanou extracellulární smyčkou. Prvních pět objevených proteinů CASPs, dříve patřících do skupiny „uncharacterized protein family“ (UPF0497) v *Arabidopsis*, bylo pojmenováno CASP1-5. Ortology *CASP* genů však byly identifikovány také u dalších druhů rostlin (Roppolo *et al.* 2014).

CASPs jsou zprvu lokalizované v celé plazmatické membráně endodermální buňky, ale pro zahájení tvorby Casparyho proužku jsou rychle odstraněny z laterálního prostoru membrány a přeměrovány jen do místa vzniku proužku (Roppolo *et al.* 2011; Roppolo *et al.* 2014). Tím správně směřují i všechny potřebné biosyntetické procesy tvorbou proteinového lešení v plazmatické membráně do oblasti, kde se tvoří Casparyho proužky (Hosmani *et al.* 2013). Prostorová rekonstrukce lokalizace pomocí markeru CASP1-GFP odhalila strukturu, přesně do proužků zarovnaných CASP1-GFP signálů, formujících cylindrickou síť kolem stéle. Elektronová mikroskopie v kombinaci s imunodetekcí odhalila, že výskyt CASP1-GFP na plazmatické membráně přesně koreluje s pozicí Casparyho proužků. CASP1-GFP jsou zarovnány mezi sousedními buňkami, ale nejsou s nimi v přímém kontaktu (Roppolo *et al.* 2014).

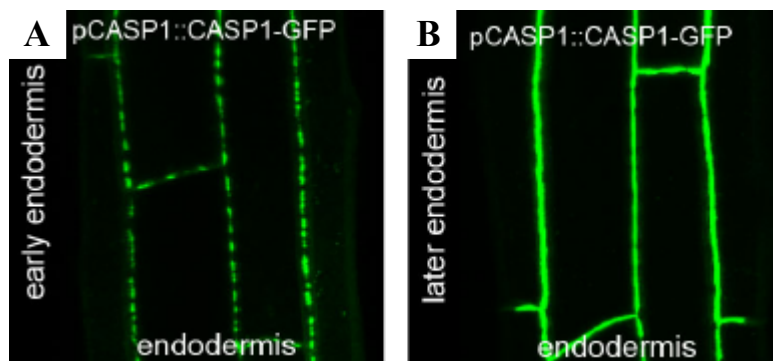
Tvorbu proteinového lešení, lokalizované depozice proteinového materiálu a zadržení stěnových prekurzorů, nebo biosyntetických enzymů do určitého prostoru membrány, předchází vytváření membránové domény, ve které se poté všechny dosud zmíněné procesy odehrávají. Pozorováním diferenciací endodermálních buněk elektronovým mikroskopem se dokázalo, že to jsou membránové domény zakládající Casparyho proužky (Obr. 4.). CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAINS (CSD) jsou odděleny od zbytku plazmatické membrány velkou hustotou elektronů a i po plazmolýze zůstávají těsně spojeny s buněčnou stěnou. Vysoká elektronová hustota CSD v dospělé endodermální buňce značí i husté uspořádání proteinového lešení v této oblasti (Alassimone *et al.* 2010). CASP1 signály na membráně tedy ohraničují zónu tvorby Casparyho proužků a jsou také prvními markery tvorby CSD, kdy je lokalizace signálů zprvu ve fázi „vlákna perel“ (string of pearls) v níž se malé CASP1-GFP ostrůvky objeví podél ekvatoriální linie buňky a poté postupně splývají do kontinuálního pruhu (Obr. 5.).

Z toho vyplývá, že CASPs nejsou lokalizovány do dříve založené CSD, ale jsou asociovány s její formací (Roppolo *et al.* 2011). CASPs jsou nyní známy svou funkcí v

tvorbě membránových zábran a svou esenciální roli v řízení lokální modifikace buněčné stěny tím, že vytváří membránovou doménu, v jejíž oblasti dochází k ukládání materiálu pro Casparyho proužky, ale nejsou nezbytné pro jeho syntézu nebo polymerizaci. Ve skupině proteinů Schengen, pojmenované podle Shengenského prostoru EU, byl podrobně zkoumán protein SGN3. *SGN3* je jeden z hlavních genů nezbytných pro lokalizaci *CASP* v genomu *Arabidopsis* a je exprimován v endodermálních buňkách krátce po začátku elongace, neboť se *CASP1* proteiny, v mutantu velmi citlivém na změny vnějších podmínek prostředí, pouze shlukují do nesouměrného pruhu. Protein SGN3 hraje roli v založení správné lokalizace *CASP1* tím, že je spojí do podoby kontinuálního proužku. *Sgn3* mutant má snížený vodní transport a tlak v kořeni, ale nevykazuje zvýšený obsah suberinu (Pfister *et al.* 2014).



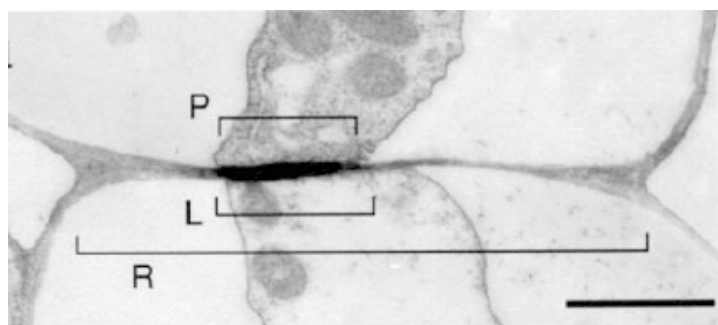
**Obr. 4.** Schematicky znázorněné ukládání Casparyho proužků: a) přesun CASP do prostoru domény CSD, b) monolignoly prostupují plazmatickou membránou a ukládají se zvnějšku buňky, c) vytvořený Casparyho proužek mezi dvěma buňkami, CSD – membránová doména Casparyho proužků, CS – Casparyho proužek (Roppolo a Geldner 2012).



**Obr. 5.** CASP-GFP lokalizace v endodermis u *Arabidopsis thaliana*. A) počáteční shlukování CASP v podobě „vlákna perel“ („string of pearls“) v mladé endodermis, B) CASP vykazující celistvou strukturu ve starší endodermis (Lee et al. 2013).

Další zkoumání funkcí rozlehlé skupiny *CASP*-like genů (*CASPL*) v rostlinné říši ukazuje jejich expresi v různých částech rostliny a poskytl molekularní základy pro objevení dalších membránových domén účastnících se růstu a diferenciace rostlinného těla. Rozšířením genetické analýzy mimo rostliny, byla nalezena spojitost mezi *CASPL*s a *MARVEL* proteinovou rodinou (Roppolo *et al.* 2014), operující v živočišné říši, do které patří řada proteinů např. kladinů a okludinů tvořících tight junction v epitelech (Raleigh *et al.* 2010).

*CASP1* jsou pevně připojeny k extracelulární matrix a zřejmě také k buněčné stěně (Alassimone *et al.* 2010). Důkazem o této silné adhezi plazmatické membrány k buněčné stěně v místě proužku je tzv. pásková plazmolýza. Když je kořenový segment, s již vytvořenými Casparyho proužky, v hypotonickém prostředí, nastává v jeho buňkách plazmolýza, při které plazmatická membrána zůstane spojena s buněčnou stěnou, a vytvoří protáhlý útvar napříč buňkou (Enstone a Peterson 1997). Tento typ plazmolýzy byl dokumentován také při vysoké salinitě u *Zea mays* (Obr. 6.), kdy byla plazmolýza, oproti kontrole, pozorována blíže ke kořenové špičce, zřejmě díky stresem vyvolané časnější tvorbě Casparyho proužků (Karahara *et al.* 2004). K páskové plazmolýze dochází pouze, pokud má endodermální buňka vyvinuté Casparyho proužky a ještě v ní nejsou vytvořeny suberinové lamely (Haas a Carothers 1975).



**Obr. 6.** Ukázka páskové plazmolýzy v endodermis u *Zea mays*, pěstované ve vysoké salinitě. P – oblast plazmatické membrány, L – lignifikovaná oblast, R – radiální stěna (Karahara *et al.* 2004).

#### 2.4. Lokalizované ukládání ligninu v Casparyho proužcích

Polymerizace ligninu vyžaduje oxidační párování monolignolů, které je katalyzováno peroxidázou. Peroxidáza požaduje peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a NADPH oxidáza je hlavním pramenem regulace produkce superoxidu, který může být enzymaticky nebo neenzymaticky dismutován na  $H_2O_2$  (Lee *et al.* 2013). Konkrétní superoxiddismutáza (SOD), účastnící se konverze superoxidu na peroxid vodíku v endodermis zatím nicméně charakterizována nebyla (Voxeur *et al.* 2015). Specifickou NADPH oxidázou, zapojenou v lignifikaci Casparyho proužku je SGN4/RBOHF. Její identifikaci umožnil genetický screening mutantů s poškozenou endodermální bariérou (Lee *et al.* 2013). Identifikovalo se 11 mutantů z EMS-mutagenizované (ethylmethansulfonát) populace více než 20000 linií. Z těchto linií jich šest tvoří jednu největší skupinu, označenou *schengen4* (*sgn4*) skupinu, která je fenotypově podobná linii s vloženou T-DNA v *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG F* (*RBOHF*) genu. Až později se zjistilo, že *SCHENGEN4* (*SGN4*) a *RBOHF* jsou stejný, jen dvakrát popsán gen. *RBOHF* je gen kódující enzymatickou jednotku NADPH oxidázy, byl poprvé nalezen u *Oryza sativa* a popsán jako *OsRBOHA*. Pomocí RNA gel blot analýzy následovaly další u *Arabidopsis*, *AtRBOHA-F* (*Arabidopsis thaliana* Respiratory Burst Oxidase Homologs), poté také u *Solanum lycopersicum* L, *Nicotiana tabacum* a *Solanum tuberosum* (Torres *et al.* 1998). Mutanty, pojmenované *sgn4/rboh*f, vykazují velmi silné zpoždění v tvorbě apoplastických bariér, lokalizaci proteinů CASPs nicméně nemají ovlivněnu. RBOHF je NADPH oxidáza specificky lokalizovaná v oblasti Casparyho proužku,

což dokládá lokalizace fúzního konstruktů RBOHF s fluorescenčním proteinem (*mCherry-RBOHFgen*) v oblasti CSD, zatímco jeho identické fúze s RBOHB a D se zde nevyskytují, přestože jsou *RBOHB* a *RBOHD* v endodermálních buňkách také exprimovány. Tato odlišná lokalizace je jedním z elementů vysvětlujícím specifitu RBOHF, pro jejíž vstup do CSD je požadována specifická interakce s proteinovými doménami Casparyho proužku, jako jsou CASPs (Lee *et al.* 2013). Oxidáza RBOHF obsahuje N-terminální doménu schopnou zachytit regulační impuls, po kterém následuje produkce superoxidu lokalizovaná specificky v Casparyho proužku. Superoxid se následně přeměňuje na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jež pro svou aktivitu využívá peroxidáza. Peroxidáza následně zprostředkovává polymerizaci ligninu tvořícího Casparyho proužky.

Specifická peroxidáza PER64 poskytla první genetický důkaz role peroxidáz v tvorbě Casparyho proužku a také, že možná ve spojení s dalšími endodermálně exprimovanými peroxidázami, je přímo potřebná k tvorbě Casparyho proužku. Význam PER64 dokládá výrazné zpoždění vzniku Casparyho proužků u rostlin s vnesenou inducibilní, endodermis specifickou microRNA způsobující vyřazení PER64 z funkce. Použitím mCherry c-terminální fúze s PER64 se navíc zjistila dokonalá kolokalizace s CASP1-GFP v plazmatické membráně. Lokalizace PER64 v místě vznikajícího proužku u *caspl casp3* dvojitého mutantu také dokazuje, že pro správnou lokalizaci PER64 do CSD jsou potřebné proteiny CASP. Zapojení dalších endodermálně exprimovaných peroxidáz, např. PER03, PER39, PER72 nebo PER09, přímo v lignifikaci Casparyho proužku nebylo zatím jednoznačně prokázáno (Lee *et al.* 2013).

### 3. Suberinové lamely

Po vytvoření Casparyho proužků se endodermální buňka dostává do přechodného stádia, kdy nedochází k dalším velkým vývojovým změnám, ve kterém buď může zůstat, nebo se dále diferencuje a přechází do sekundární fáze vývoje (Perumalla a Peterson 1986; Clarkson *et al.* 1987; Barnabas a Peterson 1992; Geldner 2013; Robbins *et al.* 2014). Při další diferenciaci se téměř po celém jejím povrchu (kromě oblastí s plazmodezmy) mezi buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou ukládá hydrofobní vrstva suberinu a přídatných vosků, nazývaná suberinová lamela. V endodermálních buňkách je mezi dokončením tvorby proužků a začátkem ukládání suberinových lamel časová prodleva, na rozdíl od exodermis, kde k tvorbě lamel dochází krátce po vzniku Casparyho proužků (Enstone a Peterson 1997). Předpokládá se, že lamely zabraňují vstupu iontů z apoplastu do endodermálních buněk.

V přirozených podmínkách se napříč rostlinnými druhy netvoří tak často, jako Casparyho proužky, a proto se jejich funkci apoplastické bariéry nepřipisuje taková důležitost jako ligninovým proužkům (Zeier *et al.* 1999; Enstone *et al.* 2003). Mají schopnost efektivně blokovat, nebo alespoň potlačovat, přístup malých nabitých, nebo polárních molekul k transportérům a přenašečům v endodermální plazmatické membráně. Suberinové lamely jsou proto méně účinné pro blokaci apoplastického a difúzního transportu mezi endodermálními buňkami, ale poměrně účinně blokují, nebo redukují transport vody, živin a popřípadě patogenů přes plazmatickou membránu do samotné buňky (Geldner 2013). Pozorování u řady rostlinných druhů, například *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare* nebo *Allium cepa* ukázala, že se suberinové lamely netvoří souvisle s postupně stoupající akumulací suberinu ve všech buňkách zároveň, ale spíše roztroušeně v některých dříve a v jiných později (Robards *et al.* 1973; Cholewa a Peterson 2004). Je to zřejmě především v elongační zóně, kdy silně suberinizované buňky leží vedle těch, které nevykazují žádnou akumulaci suberinu (Schreiber *et al.* 1999; Geldner 2013). Dozrávání buněčných stěn do sekundární fáze obvykle nastává nejprve u buněk v blízkosti floémových pólů (Peterson a Enstone 1996). Naopak endodermální buňky často ležící blízko protoxylémových pólů cévního svazku, ve kterých se suberinové lamely neukládají, nebo se ukládají výrazně později než v okolních buňkách, jsou nazývány jako „propustné buňky“. Jsou to buňky, které mají vyvinuté pouze Casparyho proužky a kvůli absenci suberinových lamel jsou zřejmě více přístupné k transportu iontů do stéle. Postupně s růstem kořene se i v těchto buňkách suberinové lamely tvoří, čímž jejich počet klesá a ve starších částech kořene se již nemusí vyskytovat vůbec (Peterson a Enstone 1996; Enstone *et al.* 2003; Cholewa a Peterson 2004; Geldner 2013).

### 3.1. Chemické složení a struktura suberinových lamel

Zatím jsou kompletně známy pouze hlavní monomery a o samotné struktuře suberinu se neví vše. Kvůli své makromolekulární struktuře, suberin nemůže být izolován a zkoumán *in vitro* bez alespoň částečné modifikace (Vishwanath *et al.* 2014). Suberin je polymer složený z polyalifatických polyesterů glycerolu, které jsou propojené s fenoly a přídavnými vosky. Struktura lamel díky chemickému složení suberinu, jenž tvoří polyfenolická a polyalifatická doména, pod transmisním elektronovým mikroskopem vytváří střídavě tmavé a světlé pruhy (Bernards 2002). Alifatická část obsahuje mastné kyseliny,  $\omega$ -hydroxykyseliny,  $\alpha,\omega$ -dikarboxylové kyseliny a primární mastné alkoholy (Pollard *et al.* 2008). A fenolická část obsahuje estery hydroxyskořicových kyselin (především kyseliny ferulové), ale i menší

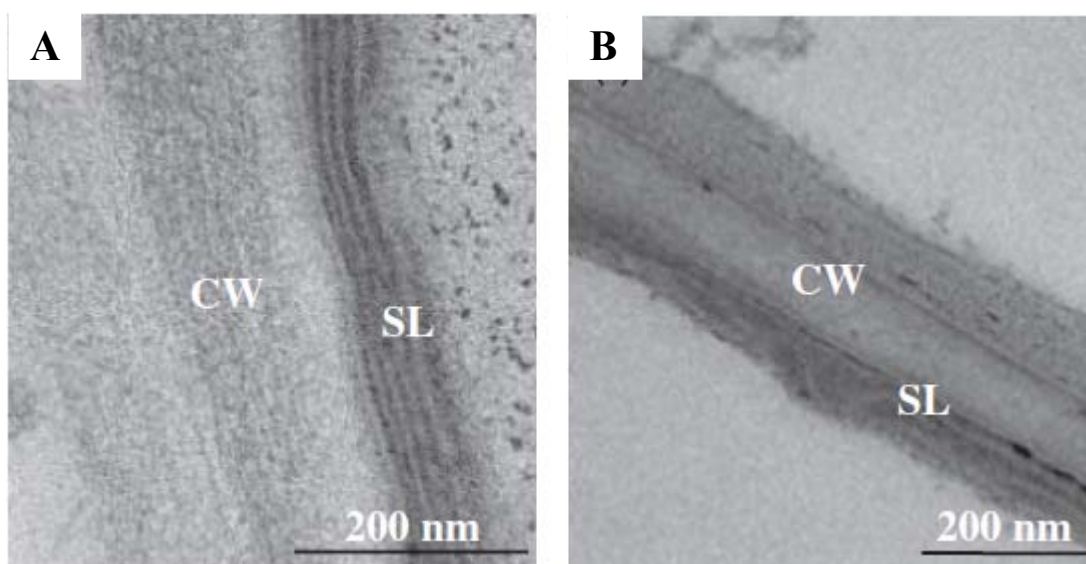


množství monolignolů (kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol), díky čemuž je podobná ligninu (Bernards 2002). Monomery mastných kyselin jsou dlouhé 16 – 32 atomů uhlíku (u *Arabidopsis* C<sub>16</sub> – C<sub>24</sub>) a mastné alkoholy a feruláty mají délku C<sub>18</sub> – C<sub>22</sub> (Franke *et al.* 2005). Toto složení suberinu z velmi dlouhých řetězců mastných kyselin a alkoholů, krátkých esterifikovaných hydroxyskořicových kyselin a glycerolu, dovoluje extensivní polymeraci a může vést k tvorbě lineárních nebo rozvětvených polymerů o vysoké molekulové hmotnosti. Vzniklý lipidový polyester je hydrofobní a vysoce rezistentní k chemické a enzymatické degradaci (Perumalla a Peterson 1986; Pollard *et al.* 2008; Meyer *et al.* 2011; Ranathunge *et al.* 2011; Geldner 2013). V *Arabidopsis* mají suberinové lamely přesný počátek tvorby, která začíná přibližně v oblasti 38 buněk po počátku elongace a 26 buněk po tvorbě Casparyho proužků (Naseer *et al.* 2012).

### 3.2. Mechanismus syntézy a ukládání suberinu

Procesu ukládání suberinu předchází biosyntéza alifatických, fenolických a glycerolových monomerů následovaná jejich transportem do prostoru mezi membránou a buněčnou stěnou a konečnou polymerizací (Ranathunge *et al.* 2011). Samotná syntéza suberinu začíná v plastidech, kdy se mastné kyseliny o délce C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub> syntetizují za pomoci proteinového komplexu syntázy mastných kyselin (fatty acid synthase) a následně jsou převedeny do podoby thioesterů (acyl-CoA) (Vishwanath *et al.* 2014) působením acyl-CoA syntetázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LACS, long-chain acyl-CoA synthetase) nalezené v *Arabidopsis* z nichž LACS2 je zapojen v syntéze kutikulárních vosků a LACS1 aktivuje C<sub>16</sub> kyseliny při syntéze kutinu (Shockey a Fulda 2002). Další prodloužení řetězce probíhá v endoplazmatickém retikulu s pomocí komplexu elongázy mastných kyselin (FAE, fatty acid elongase). FAE komplex, ve kterém dochází k elongaci a produkci mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci (VLCFA, > C<sub>18</sub>), obsahuje β-ketoacyl-CoA syntázu (KCS, β-ketoacyl-CoA synthase). Jedna z nich KCS2/DAISY, jejíž gen *Atg04220* je exprimován hlavně ve středním válci kořene, v kořenové špičce a v květech, má schopnost prodlužovat mastné kyseliny na délku řetězců C<sub>22</sub> – C<sub>24</sub> (Vishwanath *et al.* 2014). Mutant pro *KCS2* pojmenován *daisy* u *Arabidopsis* vykazuje stejný poměr v absolutním množství suberinu v kořeni jako divoký genotyp, ale obsahuje menší množství mastných kyselin s delším řetězcem (> C<sub>20</sub>), naopak vykazuje vyšší objem ω-hydroxykyselin, α,ω-dikarboxylových kyselin a alkoholů s kratším řetězcem. Ve fenotypu se mutant projevuje významně sníženým kořenovým růstem (Franke *et al.* 2009). Velmi podobnou funkci má gen *KCS20* (*At5g43760*),

který byl exprimován ve všech zkoumaných orgánech (ve stonku, v kořenech, listech, siličných kanálcích a květech). Analýza suberinu v mutantech *kcs20* ukázala, že mutace v *KCS20* o 6% zvýšila množství  $C_{20}$  mastných kyselin oproti zastoupení mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci (VLCFA,  $> C_{20}$ ) u divokého genotypu. V kořeni dvojitého mutantu *kcs20 kcs2/daisy-1* byl celkový objem alifatického suberinu o 8% nižší oproti kontrole a v endodermis byla citelně narušena lamelární struktura, ačkoli samostatné mutanty žádné signifikantní snížení alifatického suberinu ani deformaci suberinové lamely neměly (Obr. 7.). Dvojitý mutant měl také objem  $C_{20}$  přibližně o 51% a 24% vyšší než tomu bylo v samostatných *kcs20* a *kcs2/daisy-1*, což ukazuje spoluzapojení *KCS20* v prodlužování  $C_{20}$  na  $C_{22}$  masné kyseliny (Lee *et al.* 2009).

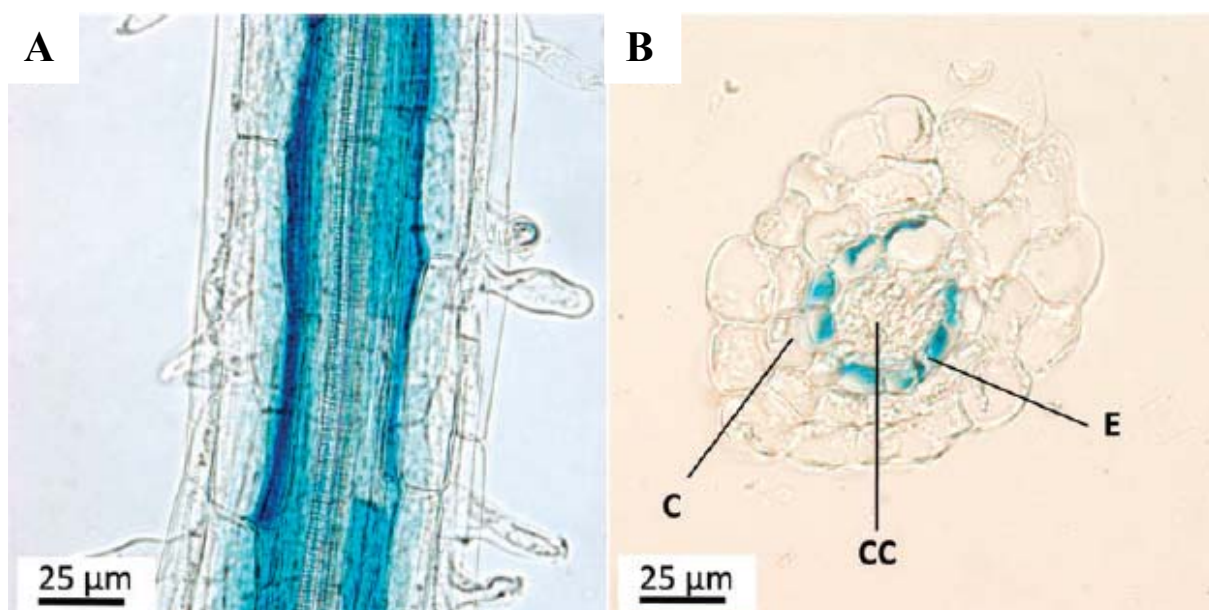


**Obr. 7.** Suberinové lamely v endodermis *Arabidopsis* zobrazené TEM mikroskopií: A) divoký genotyp, B) dvojitý mutant *kcs20 kcs2/daisy-1*. CW – buněčná stěna, SL – suberinová lamela (Lee *et al.* 2009).

Před elongací mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci může reduktázou mastných kyselin (FAR, fatty acyl-CoA reductase), konkrétně FAR5, z části docházet k redukci mastných kyselin na primární alkoholy  $C_{18}$  a  $\alpha,\omega$ -dioly. Po elongaci se i mastné kyseliny s velmi dlouhými řetězci (VLCFA-CoA) působením reduktáz FAR1 a FAR4 částečně přeměňují na primární alkoholy  $C_{20}$  –  $C_{22}$ . Rodina FAR obsahuje osm proteinů u *Arabidopsis* potřebných pro syntézu suberinu. Geny pro reduktázy FAR1, 4 a 5 jsou exprimovány ve všech

tkáních podléhajících ukládání suberinu, především v semeni a v endodermis kořene. Jednotlivé mutanty vykazovaly snížení v celkovém zastoupení mastných alkoholů, u *far1* snížení C<sub>22</sub> - OH, *far4* vykazoval snížení C<sub>20</sub> - OH a *far5* měl snížený obsah C<sub>18</sub> - OH alkoholů (Domergue *et al.* 2010).

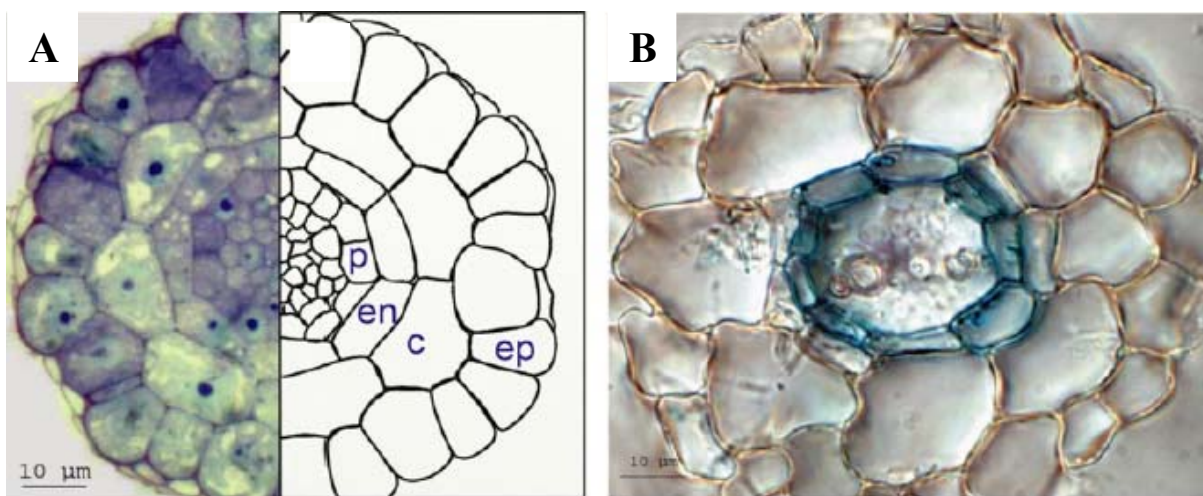
Mastné kyseliny podléhají hydroxylaci za vzniku  $\omega$ -hydroxykyselin a následné oxidaci za vzniku  $\alpha,\omega$ -dikarboxylových kyselin. Hydroxylaci zajišťuje hydroxyláza mastných kyselin, enzym patřící do rodiny cytochrom P450-monooxygenáz (CYP, cytochrome P450 monooxygenase), konkrétně do podrodiny CYP86. Oxidaci pak dehydrogenáza  $\omega$ -hydroxykyselin. *CYP86A1/HORST* je exprimován v endodermis po celé délce kořene (Obr. 8.), jeho mutant *cyp86A1/horst* vykazoval o více než 60% menší množství celkového suberinu oproti divokému genotypu a měl (kromě alkoholů) méně všech specifických monomerů, zřejmě kvůli silné redukci v počtu C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub>  $\omega$ -hydroxykyselin a C<sub>16</sub> – C<sub>20</sub>  $\alpha,\omega$ -dikarboxylových kyselin (Höfer *et al.* 2008).



**Obr. 8.** Lokalizace exprese *ProCYP86A1/HOSRT::GUS* u sedmidenního semenáčku *Arabidopsis*: A) celkový pohled, B) radiální řez. C – primární kůra, CC – střední válec, E – endodermis (Höfer *et al.* 2008).

Enzym CYP86B1s mutantem *cyp86B1/ralph* charakterizovaným s velmi podobnými expresními znaky v endodermis (Obr. 9.). Jeho  $\omega$ -hydroxy a  $\alpha,\omega$ -dikarboxylové mastné kyseliny s počtem uhlíků C<sub>22</sub> a C<sub>24</sub> téměř úplně chyběly v suberinu kořene a semene, což ale nemělo žádný vliv na funkci suberinové bariéry ani na fenotyp rostliny, neboť poměry

hlavních funkčních monomerů  $C_{16}$  a  $C_{18}$   $\omega$ -hydroxy a  $\alpha,\omega$ -dikarboxylových kyselin důležitých pro stavbu suberinu zůstaly nezměněny. Změny se signifikantně nepromítly ani na celkovém množství suberinu kořene a semene. Nenašly se ani viditelné změny v obsahu iontů Mg, K a Ca v listech u *cyp86B1/ralph* mutantu. Což dokázalo neměnnost v poměru iontů v listech *ralph* mutantu (Compagnon *et al.* 2009). Gen *HORST* je tedy zodpovědný za hydroxylaci mastných kyselin s dlouhým řetězcem ( $C_{16} - C_{20}$ ), zatímco u genu *RALPH* je hlavní funkcí hydroxylace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem ( $C_{22} - C_{24}$ ).



**Obr. 9.** A) Lokalizace exprese *proCYP86B1::GUS* v endodermis kořene *Arabidopsis* řezaném 1mm od špičky. B) Endodermis kořene *Arabidopsis* řezaný 1mm od špičky barvený toluidinovou modří. Ep – epidermis, c – primární kůra, en – endodermis, p – pericykl (Compagnon *et al.* 2009).

Následná esterifikace  $\omega$ -hydroxy a  $\alpha,\omega$ -dikarboxylových kyselin s glycerol-3-fosfátem je katalyzována glycerol-3-fosfát acyltransferázou (GPAT, acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase). Rodina GPAT má u *Arabidopsis* osm členů, z nichž je v zapojení do syntézy suberinu kořene nejdůležitější GPAT5. Její gen *At3g11430*, je exprimován ve starších částech kořene. Knock-out mutant tohoto genu *gpat5* vykazoval o 50% nižší zastoupení alifatického suberinu a velkou redukci v zastoupení  $C_{20} - C_{24}$   $\omega$ -hydroxy a  $\alpha,\omega$ -dikarboxylových kyselin v semenech, se stejným jen méně výrazným efektem i v mladých kořenech (Beisson *et al.* 2007). GPAT5 katalyzuje acylaci glycerolu na pozici *sn-2*. Má relativně širokou substrátovou specifitu, váže acyly o délce  $C_{16}$  až  $C_{24}$ , ale nejefektivněji acyly s velmi dlouhým řetězcem  $C_{22} - C_{24}$ . U mutantu *gpat5* bylo pozorováno snížení v obsahu iontů Mg, K a Ca v listech

oproti divokému genotypu (Compagnon *et al.* 2009). GPAT6 je nejvíce produkovaná v květech *Arabidopsis* a vykazuje silnou selektivitu pro C<sub>16</sub> mastné kyseliny a jeho mutant *gpat6* proto vykazuje 80 – 95% snížení C<sub>16</sub> s menší změnou v C<sub>18</sub> ω-hydroxy a α,ω-dikarboxylových kyselinách. GPAT4 a 8 mají až šedesátkrát vyšší aktivitu pro C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub>, než pro ostatní ω-hydroxy a α,ω-dikarboxylové kyseliny (Yang *et al.* 2012). Dvojitý knockout mutant těchto enzymů *gpat4/gpat8* měl 60% redukci v C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub> monomerech kutinu, hlavně u C<sub>18</sub> α,ω-dikarboxylových kyselin. GPAT4, 6 a 8 také produkují *sn-2* monoacylglyceroly, které jsou považovány za prvotní stavební bloky suberinu (Yang *et al.* 2012).

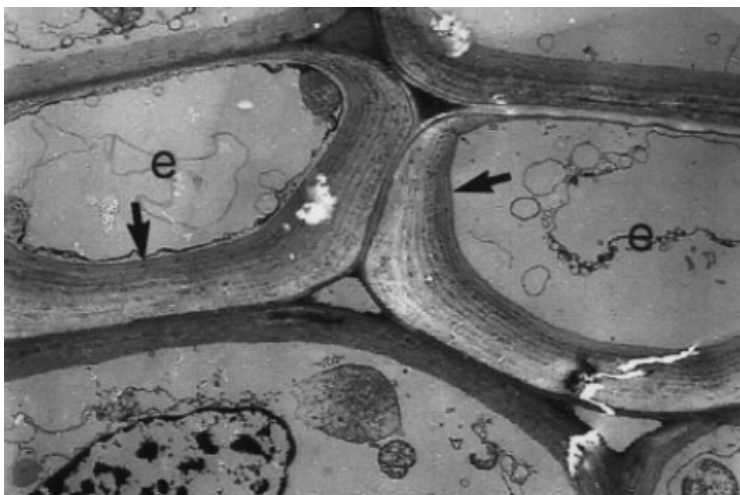
Součástí syntézy suberinu je také esterifikace aromatických komponent s mastnými kyselinami či alkoholy, respektive monoacylglyceroly. Kafeické, kumarinové a ferulové kyseliny jsou připojeny k mastným alkoholům pomocí acyltransferázy BAHD (Vishwanath *et al.* 2014). BAHD je široká skupina enzymů využívajících acyl-CoA, pojmenována podle čtyř acyltransferáz patřících do této skupiny (BEAT, Benzylalcohol O-acetyltransferase; AHCT, Anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase; HCBT, Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase a DAT, Deacetylindoline 4-O-acetyltransferase) (Abe *et al.* 2008) a obsahuje jich přibližně 445 rozdělených do pěti hlavních skupin (D'Auria 2006). Mezi BAHD acyltransferázy patří i ASFT (aliphatic suberin feruloyl transferase) identifikovaná v *Arabidopsis*. *ASFT (AT5G41040)* je exprimován v endodermální zóně, peridermu v zóně druhotného tloušťnutí kořene a ve vnějších vrstvách semene, vždy tam, kde je zahájeno ukládání suberinu. Kontroluje a syntetizuje množství ferulátů spojených s estery v suberinu. Mutant *asft* vykazuje silnou ztrátu ferulátů, což ale podle transmisní elektronové mikroskopie nemá dopad na strukturu suberinu uloženého v peridermu (Molina *et al.* 2009).

Polymerizace suberinových monomerů a jejich vnitrobuněčný transport stále není objasněn. Nejsou ani popsány konkrétní transportéry monomerů přes cytoplazmatickou membránu, jako hlavní kandidát pro tuto funkci byl určen ABCG přenašeč, pomocí trojitého mutantu *abcg2 abcg6 abcg20*, který měl snížený obsah suberinu, zkřivenou strukturu lamel, sníženou schopnost bariér bránit vstupu vody i solutů, a změněnou kořenovou strukturu podobnou té při stresu. Podskupina G je největší skupina přenašečů patřící do rodiny ATP-binding cassette (ABC) transportérů. PCR analýza ukázala, že se *ABCG* geny exprimují hlavně v endodermis kořene a méně ve stonku, semenech a v pylových zrnech (Yadav *et al.* 2014). Kromě ABC transportérů, jsou do suberinizace pravděpodobně zapojeny také LTP proteiny transportující lipidy (LTP, lipid transfer protein), které jsou již dlouhou dobu navrženy jako membránové přenašeče vázající mastné kyseliny a podílející se na stavbě přídatných vosků a kutinu (Wirtz 1997; Arondel *et al.* 2000). Spouštěcí impuls všech těchto

reakcí je stále neznámý, ale studie vnitrobuněčných lokalizací ukazují, že jádro reakcí suberinové syntézy je membránově lokalizované a závislé na endoplazmatickém retikulu (Vishwanath *et al.* 2014).

#### 4. Terciárně ztloustlé buněčné stěny

U mnoha rostlinných druhů především jednoděložných rostlin se vytvářejí další zřetelné modifikace buněčných stěn v endodermálních buňkách, popsané při terciární fázi vývoje endodermis. Tyto modifikace představují ukládání materiálu sekundární buněčné stěny mezi plazmalemu a primární buněčnou stěnu. Ukládání probíhá ve vrstvách, což je dobře patrné na snímcích z elektronového mikroskopu. Terciárně ztloustlé buněčné stěny jsou často ve tvaru „U“ (Obr. 10.), z prostorového hlediska připomínají spíše kalíšek, neboť vnitřní periklinální a radiální buněčné stěny tloustnou, kdežto vnější periklinální stěna zůstává tenká (Northcote *et al.* 1989; Zeier a Schreiber 1998; Geldner 2013). Hlavní součástí takto ukládané sekundární stěny je celulóza, která může být impregnována ligninem, jenž může být hlavní součástí nejsvrchněji uloženého materiálu terciární stěny. Suberin často chybí, nebo se vyskytuje jen v malém množství (Enstone *et al.* 2003), což bylo dokázáno elektronovou mikroskopií na pěti rostlinných druzích *Monstera deliciosa*, *Iris germanica*, *Allium cepa*, *Aspidistra elatior* a *Agapanthus africanus*, jenž v průměru vykazovaly nevelký obsah suberinu v terciárních stěnách (Zeier a Schreiber 1998).



**Obr. 10.** Terciární buněčné stěny v endodermis kořene u *Allium cepa* pod elektronovým mikroskopem, ztloustlé na radiálních a vnitřních tangenciálních stranách (černé šipky). e – endodermální buňka (Zeier a Schreiber 1998).

Toto terciární tloustnutí, je vlastní tvorba sekundární buněčné stěny. Proces ukládání sekundární stěny byl zatím zkoumán převážně v souvislosti s diferenciací na xylému, nebo s procesem sekundárního tloustnutí u dřevin i bylin, včetně *Arabidopsis* (Chaffey *et al.* 2002).



U *Arabidopsis* jsou hlavními regulátory tvorby sekundárních stěn transkripční faktory ze skupiny NAC (pojmenované podle proteinů NAM, ATF1/2, CUC2), geny *NST1*, *NST2* a *NST3* (NAC secondary wall thickening promoting faktor1, 2, 3) (Mitsuda *et al.* 2005; Mitsuda *et al.* 2007). Pozorování hypokotylu dvojitého mutantu *nst1-1 nst3-1* ukázalo, že u něj nedošlo k syntéze ligninu a celulosy pro tvorbu sekundárních buněčných stěn ve sklerenchymu dřevných paprsků stonku a sekundárním xylému hypokotylu, ale nebyly ovlivněny vlastní cévní elementy. Exprese 391 genů zapojených v syntéze sekundárních stěn byla u *nst1-1 nst3-1* potlačena o 50%. Také v kořeni tohoto dvojitého mutantu byla tvorba sekundárních stěn kompletně potlačena ve sklerenchymu sekundárního xylému, zůstala jen u cévních elementů (Mitsuda *et al.* 2007). U *Oryza sativa* je pro ukládání sekundární buněčné stěny důležitý protein SWN (secondary wall NAC domain protein). Při tloušťnutí sklerenchymatických buněčných stěn v listové čepeli působí hlavně gen *OsSWN1* a u tloušťnutí stěn v xylému je důležitý *OsSWN2* (Yoshida *et al.* 2013). Funkčními orthology ke skupině NAC jsou transkripční faktory MYB u *Oryza sativa* (3 MYB) a *Zea mays* (4 MYB) zapojené v ektopickém ukládání sekundárních stěn v epidermálních listových buňkách u mutantů se zvýšenou expresí *OsMYB46* a *ZmMYB46*. Analýza těchto mutantů ukázala, že u nich současně dochází ke stimulaci exprese genů, kódujících enzymy, syntézu ligninu, celulózy a xylanu, což vede k sekundárnímu tloušťnutí buněčných stěn (Zhong *et al.* 2011). U *Brachypodium vulgareae* se zvýšenou expresí *BdSWN5* se kroutily kořeny a mladé epidermální kořenové buňky, na rozdíl od buněk primární kůry kořene a xylémových buněk, nevykazovaly ektopickou tvorbu buněčných stěn. Starší části kořene se nezměnily, což ukazuje, že pouze diferencující se buňky jsou schopné reagovat na expresi *SWN5* (Valdivia *et al.* 2013). Jak je to s procesy tloušťnutí přímo v endodermis kořene dosud není jasné, ale předpokládá se, že by zde mohly být zapojeny podobné mechanismy tloušťnutí jako v předchozích příkladech.

## 5. Polarita membrány

S tvorbou a ukládáním apoplastických bariér také těsně souvisí transport iontů přes plazmalemu, regulace jejich dalšího pohybu symplastem a následné nakládání do xylému. S tím je spojená i polarizovaná lokalizace zapojených membránových transportérů vykazující centrálně-periferní (laterální) polaritu v endodermis i exodermis (Ma *et al.* 2006; Miwa *et al.* 2007; Alassimone *et al.* 2010; Takano *et al.* 2010). Laterální polarita byla popsána relativně nedávno a netýká se jen endodermis a exodermis, ale i epidermis kořene, což je první vrstva kořene, která je v kontaktu s prostředím a je velmi důležitá z hlediska nejen příjmu látek do

kořene, ale i výdej do prostředí. Zatímco apikálně-bazální polarita je popisována již relativně dlouho, hlavně díky studiu lokalizace PIN transportérů a mechanismu transportu auxinu, laterální polarita je teprve objevována a pravděpodobně se jejího ustavení účastní i odlišné regulační mechanismy (Takano *et al.* 2008; Alassimone *et al.* 2012). Cytoplazmatická membrána endodermálních i exodermálních buněk vykazuje centrálně-periferní polaritu, neboť je pomocí CSD a Casparyho proužků rozdělena na dvě membránové domény (Alassimone *et al.* 2010). Vnější část plazmatické membrány je nazývána periferní, nebo také distální a vnitřní část membrány je centrální též proximální (Alassimone *et al.* 2010; Barberon a Geldner 2014). Proteiny z jedné laterální domény nejsou schopny difundovat do opačné domény a jednotlivé domény se liší zastoupením konkrétních membránových bílkovin, jenž se podílejí na příjmu nebo výdeji látek (Ma *et al.* 2007; Takano *et al.* 2010). Endodermální buňka proto obsahuje transportéry lokalizované v centrální doméně plazmatické membrány obklopující stélé, nebo transportéry v periferní doméně plazmalemy, která je ve styku s půdou. Lokalizace těchto proteinů je centrálně-periferní polaritou plazmatické membrány, která je významná nejen pro transport látek, ale také pro samotný růst a vývoj rostliny (Geldner *et al.* 2003).

Příkladem apikálně-basální polarit jsou proteiny transportující auxin, vnašeče auxinu (PIN, Pinformed) a vnášeč auxinu (AUX1, Auxin rezistant 1). U *Arabidopsis* je osm různých PIN přenašečů, které jsou v diferencované zóně kořene umístěny hlavně v bazální části plazmalemy buněk středního válce, případně pokožky a laterální kořenové čepičky (PIN1, PIN3, PIN4 a PIN7). PIN2 je uložen na apikální straně buněk (Feraru a Friml 2008). Přenašeče PIN vykazují apikálně-basální polaritu lokalizace, která je zřejmě ustavována později a za pomoci jiných mechanismů než centrálně-periferní lokalizace boru nebo křemíku. V ještě nediferencovaných buňkách meristému nemají PIN polární lokalizaci, zatímco transportéry boru a křemíku již ano (Alassimone *et al.* 2012). Lokalizace PIN proteinů je závislá na jejich aktivním přenosu mezi endozomálními kompartmenty a předurčenou doménou plazmalemy. Tohoto cyklování se účastní ARF-GEF faktor GNOM, který je nezbytný pro regulaci formování váčků a jejich exocytózu do bazální části plazmalemy (Steinmann *et al.* 1999). GNOM je GDP/GTP výměnný faktor (GEF, guanine nucleotide exchange factor) zajišťující výměnu GDP za GTP na proteinu ARF. ADP-ribozylační faktor (ARF, ADP-ribosylation factor) je malý G protein (Geldner *et al.* 2003). Exocytóza do bazální oblasti plazmalemy je citlivá k BFA (brefeldin A), transport do apikální části plazmalemy nikoli, proto je pravděpodobně zajišťován BFA rezistentními ARF-GEF proteiny. Endocytóza PIN proteinů je zprostředkována pomocí klatrinových váčků

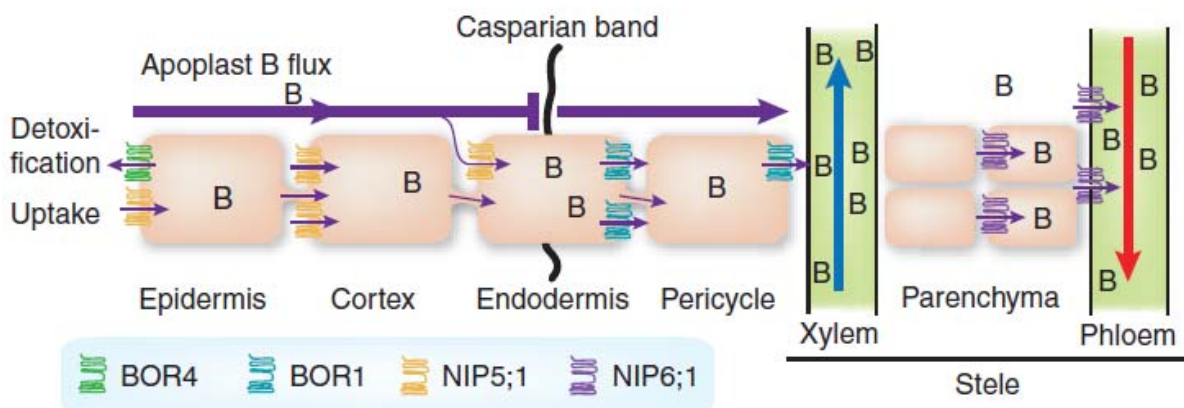


(Donaldson a Jackson 2000; Naramoto *et al.* 2014; Adamowski a Friml 2015). Mutant *gnom* má silně narušenou apikálně-bazální růstovou polaritu (Geldner *et al.* 2003).

### 5.1. Transport boru a křemíku – příklad centrálně-periferní polarity

Centrálně-periferní polarita výskytu membránových transportérů na plazmalemě byla poprvé popsána v buňkách pokožky kořene u *Solanum tuberosum* na příkladu transportéru fosforu StPT2. Imunodetekce prokázala jeho přednostní výskyt v elongační zóně kořene, kde byl lokalizován v části plazmatické membrány orientované směrem k povrchu kořene (Gordon-Weeks *et al.* 2003). Nejlépe prostudovaným příkladem centrálně-periferní polarity je transport boru a křemíku. Dva nejvíce zkoumané transportéry boru u *Arabidopsis thaliana* jsou BOR1 a NIP5;1. V proximální části plazmalemy je uložený přenašeč zajišťující výdej boru (BOR1, boron efflux carrier 1) patřící mezi sedm objevených BOR transportérů v *Arabidopsis* (Takano *et al.* 2008), který je schopen bor přenášet ve formě kyseliny borité nebo borátového aniontu (Frommer a von Wirén 2002; Takano *et al.* 2002). A v distální části plazmalemy je lokalizován kanál (NIP5;1, nod26-like intrinsic protein 5;1), patřící do skupiny MIP, který zajišťuje příjem kyseliny borité do buňky (Takano *et al.* 2006; Takano *et al.* 2008) (Obr. 11. a 12.). Takto polarizovaný výskyt transportérů boru na membráně endodermální buňky umožňuje jeho efektivní příjem a transport do středního válce, respektive nakládání do xylému. Polarizovaná lokalizace se nicméně začíná objevovat v ještě nediferencovaných buňkách kořenové špičky (včetně buněk klidového centra) a elongační zóny, čímž předchází diferenciaci endodermis a tvorbu Casparyho proužků (Alassimone *et al.* 2010). Polární lokalizace BOR1, NIP5;1, PIS1 (polar auxin transport inhibitor sensitivite1), jehož mutant *pis1* je velmi citlivý na množství auxinu (Růžička *et al.* 2010) a lokalizace dalších proteinů je tedy určena již v buňkách meristému. Plazmalema je rozdělena na vnitřní a vnější doménu, ale přechod mezi nimi ještě není plně diferencován. Ostrý přechod mezi centrální a periferní doménou nastává až v momentě založení CSD, která brání laterálnímu pohybu proteinů mezi oběma doménami (Alassimone *et al.* 2012). Existenci takové zábrany potvrzuje i aplikace PI (propidium jodid) do okolí kořene. Tato lipofilní látka, která v tomto případě funguje jako apoplastická sonda, byla schopna difundovat pouze do vnější domény plazmalemy endodermální buňky, ale vnitřní doména zůstala neobarvena (Takano *et al.* 2010). Analýza buněčné lokalizace NIP5;1 užitím rostlin nesoucích translační fúzi *NIP5;1* s GFP na N-terminálním konci pod kontrolou *NIP5;1* promotoru ukázala, že je preferenčně lokalizován v distální části plazmalemy buněk laterální kořenové čepičky a v protodermu meristemické

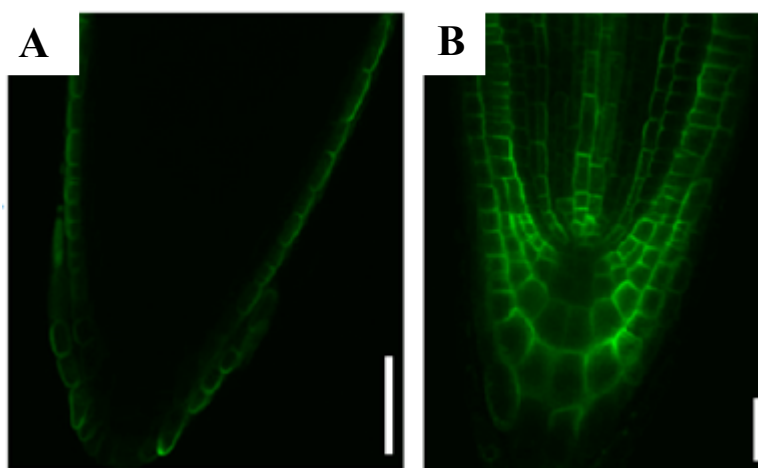
oblasti kořene a v elongační zóně. Tato polární lokalizace NIP5;1 je důležitá pro účinný příjem boru z půdy do kořene. Stejná analýza BOR1-GFP ukázala, že je lokalizován do vnitřní domény plazmalemy buněk v kolumele, v laterální kořenové čepičce, protodermu i v buňkách základního meristému včetně proendodermální linie buněk v meristemické oblasti kořene a v elongační zóně. BOR1-GFP byl také v epidermis, endodermis a v buňkách primární kůry. BOR1 je nutný při transportu boru do stélé a zároveň brání v jeho unikání ze stélé a xylému (Takano *et al.* 2010). Při nízké koncentraci boru v prostředí, jsou transportéry důležité pro jeho přísun do cévních svazků kořene, ale při vysokém obsahu boru v půdě musí být jejich aktivita potlačena, aby nedocházelo k přílišnému příjmu boru, který je sice pro rostlinu potřebný, ale ve velkém množství je toxický. Redukce BOR1 je zprostředkována jeho endocytózou z plazmalemy do vakuoly, kde je poté protein degradován. Tento proces dokazuje přesun GFP-BOR1 do vakuoly následovaný postupným vymizením GFP signálu ve vakuole u rostlin *Arabidopsis* pěstovaných v půdě s vysokým obsahem boru. U jeho protějšku GFP-NIP5;1 se tato dráha nepotvrdila, redukce NIP5;1 zřejmě spočívá přímo ve snížené expresi jeho genu *NIP5;1* (Takano *et al.* 2010). Protože při nízkém obsahu boru v půdě fúze promotoru GUS indikovala zvýšenou expresi *NIP5;1* v elongační zóně kořene a v kořenových vláscích, za vysokého obsahu boru se exprese snížila (Takano *et al.* 2006).



**Obr. 11.** Schéma transportu boru do xylému kořene u *Arabidopsis thaliana* pomocí přenašečů v plazmatické membráně (Robert a Friml 2009).

Pro ustavení polarizované lokalizace BOR1 na membráně je nezbytná přítomnost tyrozinových zbytků v pozici 373, 405 a 398 v regulační oblasti čtvrté cytoplazmatické smyčky tohoto proteinu. Jejich mutace způsobí ztrátu polarizované lokalizace v buňkách pokožky i kořenové špičky, ale překvapivě nikoli v endodermálních buňkách (Takano *et al.* 2010). Na rostlinách nesoucích mutaci v některém z těchto tyrozinových zbytků se testoval

také jejich význam v dopravě přenašeče BOR1 do vakuoly v podmínkách nízké a vysoké dostupnosti bóru v prostředí. A podle rychlosti degradace u jednotlivých mutantů se zjistilo, že tyrozinové zbytky jsou potřebné nejen pro zprostředkování polární lokalizace v elongujících se epidermálních buňkách a v buňkách kořenové špičky, ale také pro nasměrování BOR1 k degradaci do vakuoly. Degradace ve vakuole je hlavním mechanismem kontroly množství BOR1 při ideálním obsahu boru v půdě nebo při jeho nadbytku. Syntéza BOR1 je také kontrolována sníženou expresí jeho genu *BOR1* v závislosti na množství boru v půdě. Mutant *bor1-1*, s nepolární lokalizací v buňkách kořenové špičky při nízkém obsahu boru, měl velmi zkrácený růst stonku. Oproti BOR1, neobsahuje NIP5,1 na tyrozinu založený signál ve vnitrobuněčné oblasti smyčky (Takano *et al.* 2010).



**Obr. 12.** Polární lokalizace přenašečů v kořenové špičce a elongační zóně kořene *Arabidopsis thaliana* A) GFP-NIP5;1, B) GFP-BOR1 (Takano *et al.* 2010).

Laterální polarita byla popsána také pro membránové přenašeče účastníci se příjmu křemíku u rostlin s vysokým požadavkem na křemík, konkrétně u *Oryza sativa*, která velmi silně akumuluje křemík ve svém těle (> 10% obsahu sušiny). K transportu křemíku ve formě kyseliny křemičité do kořenových buněk u *Oryza sativa* dochází prostřednictvím kanálu (Lsi1, low silicon rice 1, neboli OsNIP2;1), který je podobně jako další NIP (nod26-like intrinsic protein) proteiny, příbuzný s aquaporiny (Ma *et al.* 2006). Dalším zkoumáním byl objeven, Lsi1nepříliš podobný, transportér (Lsi2, low silicon rice 2). Ukázalo se, že Lsi2 zajišťuje výdej křemíku z buňky. Imunodetekcí se zjistilo, že je lokalizován v proximální části plazmalemy exodermálních a endodermálních buněk kořene, stejně jako kanál Lsi1, který je uložen na distální straně kořenových buněk (Ma *et al.* 2007). Oba dva přenašeče jsou

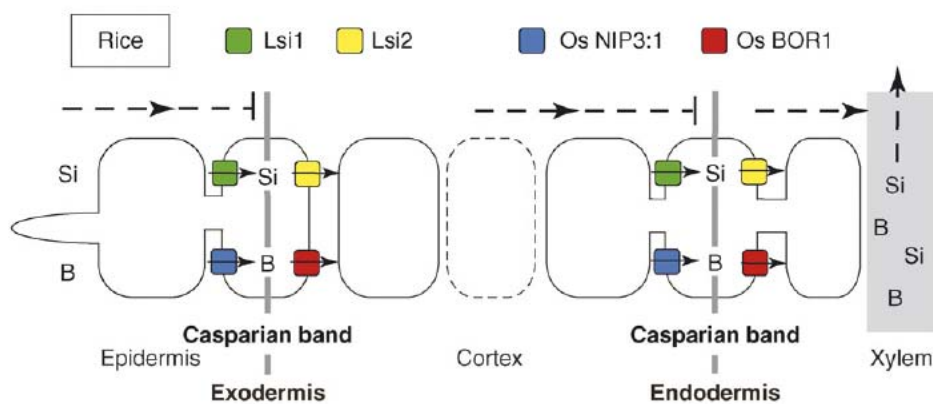
potřebné pro transport křemíku do stélé (Obr. 13.). Křemík je nejprve transportován do exodermálních buněk pomocí Lsi1 a z nich je prostřednictvím Lsi2 uvolněn do apoplastu dalších buněk, které nemají apoplastické bariéry. Poté je křemík opět pomocí Lsi1 transportován do endodermálních buněk a uvolněn do stélé pomocí Lsi2. Pro transport křemíku přes buňky s Casparyho proužky do stélé, kde nelze využít přenos apoplastem, je spojení Lsi1 a Lsi2 v jedné buňce protilehlých domén plazmatické membrány velmi důležité. Ví se, že přenos přes Lsi1 je nezávislý na energii, zatímco přes Lsi2 je to energeticky závislý aktivní proces, řízený protonovým gradientem, ale k bližšímu pochopení tohoto transportního mechanismu bude nutný další výzkum (Ma *et al.* 2007). Jeden ze sedmi objevených transportérů kovů u *Oryza sativa* (Belouchi *et al.* 1997) je transportér (Nramp5, Natural resistance-associated macrophage protein 5), který je hlavním transportérem zajišťujícím vstup kadmia a manganu do buňky. Byl objeven ve vnější doméně plazmalemy buněk exodermis i endodermis. Nebyl k němu ale nalezen ekvivalentní transportér zajišťující výdej manganu a kadmia. Koncentrace těchto dvou prvků v kořenech a stonku knockout mutanta byla nižší než u divokého genotypu, protože ztratil schopnost v jejich příjmu, měl mutant také celkově menší vzrůst (Sasaki *et al.* 2012). Nicméně *Oryza sativa* nemusí představovat univerzální modelovou rostlinu, neboť ve srovnání s jinými druhy přijímá křemíku velké množství a analogy transportérů Lsi u jiných zkoumaných rostlin nevykazovaly takto signifikantní lokalizaci ani expresi v endodermis. U *Zea mays* (Zm Lsi1) a *Hordeum vulgare* (Hv Lsi1) jsou přenašeče křemíku lokalizovány v epidermálních, hypodermálních buňkách a v buňkách středního válce (Obr. 14.). Homology transportéru přenášejícího křemík z buňky Lsi2 byly také objeveny u *Zea mays* a *Hordeum vulgare* zde se Lsi2 nejsilněji exprimoval v bazální oblasti kořene s regulací závislou na obsahu křemíku v rostlině. Zm Lsi2a Hv Lsi2 jsou lokalizovány pouze v endodermis a nevykazují polaritu na rozdíl od Os Lsi2, který je polarizován i v exodermis, nejspíš pro efektivnější transport křemíku do stélé. Polarita transportérů u *Zea mays* a *Hordeum vulgare* zřejmě není vyvinuta, protože tyto rostliny nepřijímají křemík v tak velkém množství jako *Oryza sativa* (Mitani *et al.* 2009).

Další příklad centrálně-periferní polarity ukazuje, že ne všechny PIN jsou orientovány apikálně nebo bazálně. PIN3 protein, s centrálně-periferní polaritou v endodermální buňce, je auxinový přenašeč nezbytný pro fototropismus hypokotylu a gravitropismus kořene. Ve tmě má PIN3 v endodermálních buňkách hypokotylu apolární lokalizaci, při vystavení kořenů světlu postupně mizí z vnější oblasti plazmalemy a naopak zůstává ve vnitřní oblasti plasmalemy orientované směrem ke střednímu válci. Recyklace na plazmalemu je citlivá na inhibitor dráhy váčků tzv. brefeldin A (BFA), jehož aplikace indukuje intracelulární akumulaci

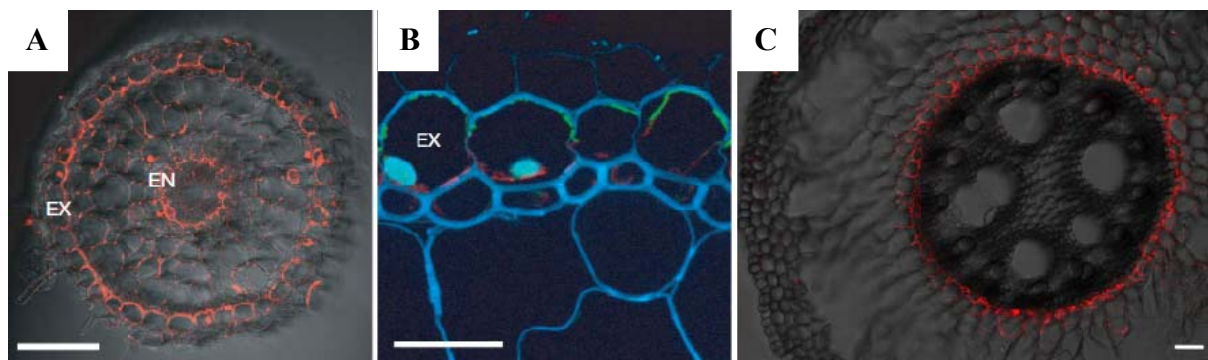
PIN3-GFP v epidermálních buňkách hypokotylu. Což dokazuje, že fototropická odpověď a světlem zprostředkovaná PIN3 polarizace vyžaduje dráhu citlivou na BFA, se zapojením serin/treonin-proteinkinázy PINOID (PID) a zřejmě endocytózu PIN3 z vnější do vnitřní oblasti plazmalemy závislou na GNOM (Ding *et al.* 2011). Po nerovnoměrné světelné stimulaci je PIN3 na osvětlené straně hypokotylu přesunut z vnější oblasti plazmalemy endodermálních buněk a stabilizuje se na jejich vnitřní straně. Na zastíněné straně kořene naopak PIN3 ve vnější oblasti plazmalemy zůstává a zachovává si apolární lokalizaci. Tato PIN3 asymetrie způsobí auxinový tok do místa zastíněných buněk (Ding *et al.* 2011; Rakusová *et al.* 2015). Z toho vyplývá, že PIN3 aktivita dává endodermis funkci obousměrného ventilu, žene auxin k vnější nebo vnitřní vrstvě, podle vnějších lokálních podmínek. A podobně to probíhá i při gravitropismu, což naznačuje, že PIN3 je zapojen i v dalších tropizmech (Dinneny 2014). Nedávno objevenou funkcí auxinu je podpora iniciace laterálních kořenů, kde je *PIN3* exprimován na proximální straně endodermálních buněk (Marhavý *et al.* 2011).

Jak již bylo výše naznačeno, laterální polarita a s ní spojený polarizovaný výskyt transportérů se netýká vždy jen endodermálních, nebo exodermálních buněk. To potvrzuje i pozorování sedmi nezávislých transgenních linií nesoucích BOR4-GFP fúzi, které ukázalo, že transportér boru BOR4 akumuluje do plazmalemy na distální straně buněk protodermu (Obr. 11.) v elongační zóně kořene za vysoké koncentrace boru, což naznačuje, že BOR4 nepodléhá (na rozdíl od BOR1) postranslačnímu degradačnímu systému, který zajišťuje vymizení BOR1 z plazmalemy při vysoké dostupnosti boru v prostředí. Se zvyšujícím se obsahem kyseliny borité v půdě stoupala akumulace BOR4-GFP a tím i tolerance rostliny k boru. Distální lokalizace BOR4 je důležitá pro přímý export boru z kořenů do půdy a pro zabránění jeho akumulace v xylému a v rostoucích buňkách (Miwa *et al.* 2007). Podobně také vysoce afinitní transportér dusíku (NRT2.4, Nitrate transporter 2.4) u *Arabidopsis* účinný za nízké koncentrace dusíku je přednostně lokalizován ve vnější doméně plazmalemy pokožkových buněk kořene, což ukázalo GFP (Kiba *et al.* 2012). Stejnou polární lokalizaci vykazuje transportér železa u *Arabidopsis thaliana* (IRT1, Iron-regulated transporter 1) s genem exprimovaným v epidermis kořene (Vert *et al.* 2002). IRT1, jehož polarita udržuje homeostázi železa a dalších kovů se vyskytuje na vnější doméně plazmalemy epidermálních buněk a je regulován transkripcí *IRT1*, ubiquitinací a recyklací z endosomu pomocí proteinu obsahující domény (Fab1, YOTB, Vac1 a EEA1), ze kterých vznikla zkratka proteinu FYVE1, jenž váže hlavní složku endozomální membrány fosfatidylinositol 3-fosfát (Kolb *et al.* 2015). Mutant se ztrátou polarit, pěstovaný v půdě s velmi nízkým obsahem železa, ukazoval defekt radiálního

transportu, sníženou akumulaci železa a kratší kořenový růst oproti divokému genotypu. (Barberon *et al.* 2014).



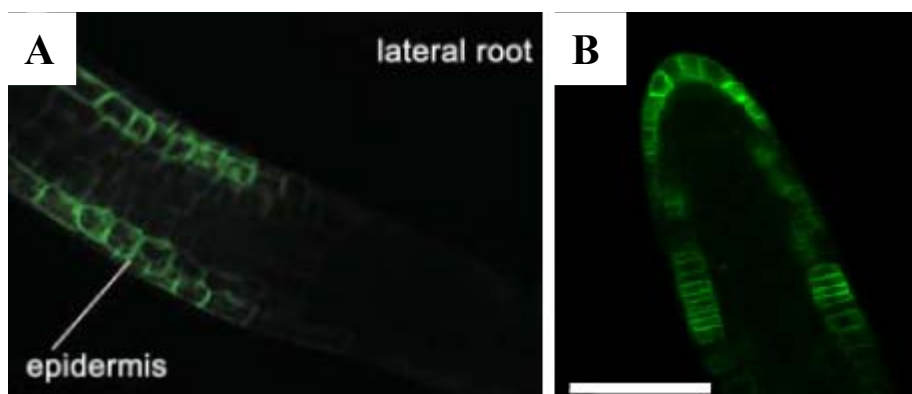
**Obr. 13.** Schéma transportu křemíku do cévního svazku kořene u *Oryza sativa* pomocí přenašečů v plazmatické membráně (Takano *et al.* 2010).



**Obr. 14.** A) Imunolokalizace Lsi2 v kořeni *Oryza sativa*, B) Exodermis s fluorescenčně značeným Lsi1 (zelená) a Lsi2 (červená), jádra obarvená DAPI a autofluorescence buněčné stěny (modře) (Ma *et al.* 2007). C) Kořen *Zea mays* imunodetekcí označený Lsi2, lokalizovaný jen v endodermis (Mitani *et al.* 2009). EN – endodermis, EX - exodermis

Příjem dalších iontů do kořene pomocí přenašečů již nevykazuje tak výraznou polaritu výskytu přenašečů na membránách buněk kořene. Další transportéry, které jsou důležité pro příjem iontů a nevykazují polární umístění na membráně, jsou například v transportu draslíku u *Arabidopsis thaliana*. Přenašeč AtHAK5, jehož gen byl při nedostatku draslíku v půdě jeden z nejvíce exprimovaných přenašečových genů. GFP odhalila AtHAK5 promotorovou aktivitu (Obr. 15.) v epidermis, v buňkách primární kůry a stéle dospělých kořenů a dokonce silnější aktivitu v postraních kořenech, naopak velmi nízká až neaktivní lokalizace byla v kořenové špičce (Gierth *et al.* 2005). Výrazná laterální polarita lokalizace AtHAK5 nebyla pozorována.

Podobně také jeden z nejvýznamnějších přenašečů zajišťujících příjem nitrátu (NRT1.1, Nitrate-regulated auxin transport), který je zapojen i v transportu auxinu, nevykazuje ve svrchních buněčných vrstvách kořene laterální polaritu výskytu (Obr. 15.). NRT1.1. je zapojen také v regulaci růstu postranních kořenů v závislosti na dostupnosti nitrátu v prostředí. Mutant *NRT1.1* vykazoval zvýšenou akumulaci auxinu a dusíku v postranních kořenech rostoucích v půdě s nízkým obsahem dusíku (Krouk *et al.* 2010).



**Obr. 15.** A) Lokalizace GFP-AtHAK5 v epidermis postranního kořene *Arabidopsis* (Gierth *et al.* 2005), B) NRT1.1-GFP lokalizace ve špičce postranního kořene *Arabidopsis* (Krouk *et al.* 2010).

## 6. *SHORT-ROOT* a *SCARECROW*

*SHORT-ROOT* (*SHR*) je gen zodpovědný za signální regulaci radiálního růstu, konkrétně za asymetrické buněčné dělení v diferenciací zóně kořene, kam se radiálně přesouvá ze stéle, díky čemuž vzniká endodermis a primární kůra (Helariutta *et al.* 2000) *SHR* je exprimován již během embryogeneze v primární kůře a v iniciálách endodermis. GFP ukázalo pohyb *SHR* proteinu do jednotlivých vnějších tkání, kde vstupoval do jader dějících se buněk a po jejich rozdělení zůstal pouze v jádru té vnitřní buňky, čímž pravděpodobně řídí radiální symetrii (Nakajima *et al.* 2001). Pro pohyb *SHR* je nicméně nutná i jeho lokalizace v cytoplazmě (Gallagher *et al.* 2004). Spoluzapojený gen s podobnou funkcí *SCARECROW* (*SCR*) je exprimován také v primární kůře a v iniciálách endodermis. Lokalizace exprese dovoluje, těmito dvěma genům u *Arabidopsis thaliana*, regulaci radiální organizace nejen v meristému kořene (*SHR*, *SCR*), ale i ve stonku (*SCR*) (Di Laurenzio *et al.* 1996; Wysocka-Diller *et al.* 2000). Zatímco *SHR* gen reguluje buněčné dělení a endodermální specifikaci, *SCR* reguluje primárně jen buněčné dělení. A předpokládá se, že *SHR* je možná pozitivním

regulátorem exprese *SCR* (Helariutta *et al.* 2000). Roli těchto genů v radiálním dělení meristému ukázaly jednotlivé mutanty. *Shr* mutant nemá v kořenech vyvinuté endodermální buňky, má jen jednu vrstvu buněk primární kůry a mnohem méně buněk ve středním válci oproti divokému genotypu nebo *scr-3* mutantu, kvůli čemuž má menší průměr a délku kořene (Martinka *et al.* 2012). *Scr-3* mutant má nekompletní endodermální vrstvu, neboť primární kůra je složena z vnějších endodermálních buněk a z atypických buněk primární kůry pocházejících z tangenciální nerozdělené iniciály, Casparyho proužky jsou ukládány stejně jako u divokého genotypu. Mutant *Scr* obsahuje endodermální buňky podobné těm v divokém genotypu s Casparyho proužky a suberinovými lamelami, ale také má atypické buňky nevytvářející pravé Casparyho proužky, jen nepravidelné útvary z ligninu. *Shr* nerozvíjí Casparyho proužky ani suberinové lamely v žádných svých endodermálních buňkách (Martinka *et al.* 2012).

## 7. Závěr

Za tvorbou a ukládáním apoplastických kořenových bariér stojí řada procesů a mechanismů, z nichž byla dosud objevena pouze část. Zatím je nejpodrobněji popsán ukládání Casparyho proužků, při jehož výzkumu došlo k objevu důležitých a zajímavých membránových proteinů, které pomáhají cílené depozici ligninu. Suberinové lamely vyžadují syntézu suberinu. Tento polymer se díky své struktuře špatně izoluje a zkoumá, kvůli čemuž jsou známy pouze jeho hlavní komponenty, které umožňují získat jen přibližnou představu o jeho makromolekulární struktuře. O jeho syntéze se ví poměrně dost, ne však tolik aby se mohl tento velice zajímavý proces ukládání suberinových lamel kompletně popsat. Doposud se nejméně zjistilo o sekundárním tloustnutí v terciární fázi vývoje buněčných stěn v endodermis a ještě méně v exodermis. Existence příkladů tloustnutí v jiných buněčných vrstvách nestačí pro plné pochopení diferenciaci endodermis a exodermis. Ve své budoucí práci, bych se proto chtěl zaměřit na diferenciaci těchto vrstev kořene *Zea mays* ve vztahu k nedostatku živin v půdě. Dosavadní výzkumy ukazují sníženou a zpomalenou tvorbu exodermis a diferenciaci apoplastických bariér v podmínkách chudých na živiny, ale jiné naopak potvrzují zrychlenou tvorbu bariér za nedostatku živin. V mé magisterské práci bych se proto chtěl věnovat vztahu mezi dostupností živin a vývojem bariér v kořeni a mechanismům koordinace vývojových procesů v kořenech (především mezi větvením kořene a diferenciací exodermální vrstvy), včetně zapojení auxinu v koordinaci těchto procesů.



## 8. Seznam použité literatury:

**Abe Y, Tera M, Sasaki N, Okamura M, Umemoto N, Momose M, Kawahara N, Kamakura H, Goda Y, Nagasawa K (2008)** Detection of 1-O-malylglucose: pelargonidin 3-O-glucose-6'-O-malyltransferase activity in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Biochemical and biophysical research communications* 373: 473-477

**Adamowski M, Friml J (2015)** PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The Plant Cell Online*: tpc. 114.134874

**Alassimone J, Naseer S, Geldner N (2010)** A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 5214-5219

**Alassimone J, Roppolo D, Geldner N, Vermeer JE (2012)** The endodermis--development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249: 433-443

**Arondel V, Vergnolle C, Cantrel C, Kader J-C (2000)** Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant science* 157: 1-12

**Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, Zelazny E, Vert G (2014)** Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 8293-8298

**Barberon M, Geldner N (2014)** Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant physiology* 166: 528-537

**Barnabas AD, Peterson CA (1992)** Development of Casparian bands and suberin lamellae in the endodermis of onion roots. *Canadian journal of botany* 70: 2233-2237

**Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE (2009)** Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 5: e1000492

**Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB (2007)** The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 19: 351-368

**Belouchi A, Kwan T, Gros P (1997)** Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant molecular biology* 33: 1085-1092

**Bernards MA (2002)** Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80: 227-240

**Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003)** Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology* 54: 519-546

**Clarkson D, Robards A, Stephens J, Stark M (1987)** Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant, cell & environment* 10: 83-93

**Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F (2009)** CYP86B1 is required for very long chain  $\omega$ -hydroxyacid and  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant physiology* 150: 1831-1843

**D'Auria JC (2006)** Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current opinion in plant biology* 9: 331-340

**Davin LB, Lewis NG (2000)** Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant physiology*

123: 453-462

**Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN (1996)** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86: 423-433

**Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demarsy E, Langowski Ł, Kleine-Vehn J, Fan Y, Morita MT, Tasaka M, Fankhauser C, Offringa R (2011)** Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* 13: 447-452

**Dinneny JR (2014)** A gateway with a guard: How the endodermis regulates growth through hormone signaling. *Plant Science* 214: 14-19

**Domergue F, Vishwanath SJ, Joubès J, Ono J, Lee JA, Bourdon M, Alhattab R, Lowe C, Pascal S, Lessire R (2010)** Three Arabidopsis fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant physiology* 153: 1539-1554

**Donaldson JG, Jackson CL (2000)** Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Current opinion in cell biology* 12: 475-482

**Enstone DE, Peterson CA (1997)** Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. *Canadian Journal of Botany* 75: 1188-1199

**Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003)** Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351

**Esau K (1953)** *Plant anatomy*

**Feraru E, Friml J (2008)** PIN polar targeting. *Plant physiology* 147: 1553-1559

**Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L (2005)** Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues—a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66: 2643-2658

**Franke R, Höfer R, Briesen I, Emsermann M, Efremova N, Yephremov A, Schreiber L (2009)** The DAISY gene from Arabidopsis encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza - micropyle region of seeds. *The Plant Journal* 57: 80-95

**Frommer WB, von Wirén N (2002)** Plant biology: Ping-pong with boron. *Nature* 420: 282-283

**Gallagher KL, Paquette AJ, Nakajima K, Benfey PN (2004)** Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Current biology* 14: 1847-1851

**Geldner N (2013)** The endodermis. *Annual review of plant biology* 64: 531-558

**Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Müller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G (2003)** The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230

**Gierth M, Maser P, Schroeder JI (2005)** The potassium transporter AtHAK5 functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and AKT1 K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant physiology* 137: 1105-1114

**Gordon-Weeks R, Tong Y, Davies TE, Leggewie G (2003)** Restricted spatial expression of a

- high-affinity phosphate transporter in potato roots. *Journal of cell science* 116: 3135-3144
- Haas DL, Carothers ZB (1975)** Some ultrastructural observations on endodermal cell development in *Zea mays* roots. *American Journal of Botany*: 336-348
- Hatfield R, Fukushima RS (2005)** Can lignin be accurately measured? *Crop science* 45: 832-839
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M-T, Benfey PN (2000)** The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* 101: 555-567
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R (2008)** The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid  $\omega$ -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of experimental botany* 59: 2347-2360
- Hose E, Clarkson D, Steudle E, Schreiber L, Hartung W (2001)** The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of experimental botany* 52: 2245-2264
- Hosmani PS, Kamiya T, Danku J, Naseer S, Geldner N, Guerinot ML, Salt DE (2013)** Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 14498-14503
- Chaffey N, Cholewa E, Regan S, Sundberg B (2002)** Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiologia Plantarum* 114: 594-600
- Cholewa E, Peterson CA (2004)** Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots. *Plant physiology* 134: 1793-1802
- Christopher LP, Yao B, Ji Y (2014)** Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research* 2: 12
- Karahara I, Ikeda A, Kondo T, Uetake Y (2004)** Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219: 41-47
- Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H (2012)** The Arabidopsis nitrate transporter NRT2. 4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *The Plant Cell Online* 24: 245-258
- Kolb C, Nagel M-K, Kalinowska K, Haggmann J, Ichikawa M, Anzenberger F, Alkofer A, Sato MH, Braun P, Isono E (2015)** FYVE1 Is Essential for Vacuole Biogenesis and Intracellular Trafficking in Arabidopsis. *Plant physiology* 167: 1361-1373
- Kroemer K (1903)** Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibliotheca Botanica* 59: 151
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K (2010)** Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell* 18: 927-937
- Lee SB, Jung SJ, Go YS, Kim HU, Kim JK, Cho HJ, Park OK, Suh MC (2009)** Two Arabidopsis 3 - ketoacyl CoA synthase genes, KCS20 and KCS2/DAISY, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal* 60: 462-475
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N (2013)** A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis. *Cell* 153: 402-412

- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M (2006)** A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M (2007)** An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209-212
- Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Pařezová M, Petrášek J, Friml J, Kleine-Vehn J (2011)** Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental cell* 21: 796-804
- Martinka M, Dolan L, Pernas M, Abe J, Lux A (2012)** Endodermal cell–cell contact is required for the spatial control of Casparian band development in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany* 110: 361-371
- Meyer CJ, Peterson CA, Bernards MA (2011)** Spatial and temporal deposition of suberin during maturation of the onion root exodermis. *Botany* 89: 119-131
- Mitani N, Chiba Y, Yamaji N, Ma JF (2009)** Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *The Plant Cell Online* 21: 2133-2142
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2007)** NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 19: 270-280
- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2005)** The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *The Plant Cell Online* 17: 2993-3006
- Miwa K, Takano J, Omori H, Seki M, Shinozaki K, Fujiwara T (2007)** Plants tolerant of high boron levels. *Science* 318: 1417-1417
- Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M (2009)** Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant physiology* 151: 1317-1328
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN (2001)** Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307-311
- Naramoto S, Otegui MS, Kutsuna N, De Rycke R, Dainobu T, Karampelias M, Fujimoto M, Feraru E, Miki D, Fukuda H (2014)** Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 26: 3062-3076
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N (2012)** Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 10101-10106
- Northcote D, Davey R, Lay J (1989)** Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta* 178: 353-366
- Perumalla C, Peterson CA (1986)** Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany* 64: 1873-1878
- Peterson CA, Enstone DE (1996)** Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum* 97: 592-598

- Peterson CA, Perumalla CJ (1990)** A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 113-125
- Pfister A, Barberon M, Alassimone J, Kalmbach L, Lee Y, Vermeer JE, Yamazaki M, Li G, Maurel C, Takano J (2014)** A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife* 3: e03115
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008)** Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13: 236-246
- Rakusová H, Fendrych M, Friml J (2015)** Intracellular trafficking and PIN-mediated cell polarity during tropic responses in plants. *Current opinion in plant biology* 23: 116-123
- Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR (2010)** Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Molecular biology of the cell* 21: 1200-1213
- Ranathunge K, Schreiber L, Franke R (2011)** Suberin research in the genomics era—new interest for an old polymer. *Plant Science* 180: 399-413
- Robards A, Jackson SM, Clarkson D, Sanderson J (1973)** The structure of barley roots in relation to the transport of ions into the stele. *Protoplasma* 77: 291-311
- Robbins NE, Trontin C, Duan L, Dinneny JR (2014)** Beyond the barrier: communication in the root through the endodermis. *Plant physiology* 166: 551-559
- Robert HS, Friml J (2009)** Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology* 5: 325-332
- Roppolo D, Boeckmann B, Pfister A, Boutet E, Rubio MC, Déneraud-Tendon V, Vermeer JE, Gheyselinck J, Xenarios I, Geldner N (2014)** Functional and evolutionary analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN family. *Plant physiology* 165: 1709-1722
- Roppolo D, De Rybel B, Tendon VD, Pfister A, Alassimone J, Vermeer JE, Yamazaki M, Stierhof YD, Beeckman T, Geldner N (2011)** A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473: 380-383
- Roppolo D, Geldner N (2012)** Membrane and walls: who is master, who is servant? *Current opinion in plant biology* 15: 608-617
- Růžicka K, Strader LC, Bailly A, Yang H, Blakeslee J, Langowski Ł, Nejedlá E, Fujita H, Itoh H, Syōno K (2010)** Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 10749-10753
- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF (2012)** Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *The Plant Cell Online* 24: 2155-2167
- Shockey JM, Fulda MS (2002)** Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant physiology* 129: 1710-1722
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999)** Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of experimental botany* 50: 1267-1280
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Gälweiler L, Palme**

- K, Jürgens G (1999)** Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286: 316-318
- Takano J, Miwa K, Fujiwara T (2008)** Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* 13: 451-457
- Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T (2002)** Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* 420: 337-340
- Takano J, Tanaka M, Toyoda A, Miwa K, Kasai K, Fuji K, Onouchi H, Naito S, Fujiwara T (2010)** Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 5220-5225
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, Von Wirén N, Fujiwara T (2006)** The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5; 1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell Online* 18: 1498-1509
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond - Kosack KE, Jones JD (1998)** Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *The Plant Journal* 14: 365-370
- Valdivia ER, Herrera MT, Gianzo C, Fidalgo J, Revilla G, Zarra I, Sampedro J (2013)** Regulation of secondary wall synthesis and cell death by NAC transcription factors in the monocot Brachypodium distachyon. *Journal of experimental botany*: ers394
- van Fleet DS (1961)** Histochemistry and function of the endodermis. *The Botanical Review* 27: 165-220
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F, Curie C (2002)** IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell Online* 14: 1223-1233
- Vishwanath SJ, Delude C, Domergue F, Rowland O (2014)** Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. *Plant cell reports*: 1-14
- Voxeur A, Wang Y, Sibout R (2015)** Lignification: different mechanisms for a versatile polymer. *Current opinion in plant biology* 23: 83-90
- Wirtz K (1997)** Phospholipid transfer proteins revisited. *Biochem. J* 324: 353-360
- Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN (2000)** Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127: 595-603
- Yadav V, Molina I, Ranathunge K, Castillo IQ, Rothstein SJ, Reed JW (2014)** ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 26: 3569-3588
- Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge JB (2012)** A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in Arabidopsis: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant physiology* 160: 638-652
- Yoshida K, Sakamoto S, Kawai T, Kobayashi Y, Sato K, Ichinose Y, Yaoi K, Akiyoshi-Endo M, Sato H, Takamizo T (2013)** Engineering the Oryza sativa cell wall with rice NAC transcription factors regulating secondary wall formation. *Frontiers in plant science* 4
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999)** Chemical analysis and immunolocalisation of

lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209: 1-12

**Zeier J, Schreiber L (1998)** Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206: 349-361

**Zhong R, Lee C, McCarthy RL, Reeves CK, Jones EG, Ye Z-H (2011)** Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors. *Plant and Cell Physiology* 52: 1856-1871