

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**„TRANS-ZEATIN DEHYDROGENASA“
KONVERTUJÍCÍ TRANS-ZEATIN V KUKUŘICI,
HRACHU A FAZOLI**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Filip Kokáš
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	30.4.2012

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, za použití citované literatury.

V Olomouci dne 30.4.2012

;

.....

podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D. za jeho věnovaný čas, rady, připomínky a odborné vedení, které mi v průběhu vypracování této práce poskytl. Děkuji panu Marku Kuzmovi Ph.D. za určení chemické struktury neznámého produktu pomocí NMR. Mé poděkování patří také mé rodině za finanční i morální podporu a celému kolektivu oddělení molekulární biologie a katedry biochemie za umožnění vypracování této práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Filip Kokáš
Název práce	„Trans-zeatin dehydrogenasa“ konvertující trans zeatin v kukuřici, hrachu a fazoli.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Cytokininy jsou skupina rostlinných hormonů, které mají vliv na růst a vývoj rostlin. Hlavními isoprenoidními cytokininy jsou zeatin, isopentenyladenin a dihydrozeatin. Pro syntézu cytokininů byly nalezeny dvě rozdílné metabolické dráhy. Hlavním enzymem syntézy je isopentenyltransferasa.</p> <p>Degradace cytokininů může být rozdělena na vratnou a nevratnou. Vratná degradace probíhá pomocí konjugace aktivního cytokininu se sacharidem nebo aminokyselinou. Nevratná degradace je realizována enzymem cytokinin oxidasou/dehydrogenasou.</p> <p>Zeatin se vyskytuje v rostlinách ve dvou izomerech. Trans-zeatin je v rostlinách enzymaticky konvertován na cis-zeatin, dihydrozeatin a další produkty. Cílem této práce byla identifikace chemické struktury produktu nového enzymu konvertujícího trans-zeatin na neznámý metabolit. Tento produkt byl později identifikován jako 6-(3-methylpyrrol-1-yl)-purin a jeho přítomnost byla prokázána v listech hrachu, fazole a částech kukuřice.</p>
Klíčová slova	cytokinin, enzym, kukuřice, fazole, hrách
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Filip Kokáš
Title	"Trans-zeatin dehydrogenase" converts trans-zeatin in maize, pea and bean.
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>Cytokinins are a group of plant hormones that affect growth and development of plants. The main isoprenoid cytokinins are zeatin, isopentenyladenine and dihydrozeatin.</p> <p>For the synthesis of cytokinins, two different pathways were found. The major enzyme participating on synthesis is isopentenyltransferase.</p> <p>Degradation of cytokinins can proceed as reversible or irreversible. Reversible degradation takes place through active cytokinin conjugation with carbohydrate or amino acid. Irreversible degradation is carried out by the enzyme cytokinin oxidase/dehydrogenase.</p> <p>Zeatin in plants occurs in form of two isomers. Trans-zeatin could be enzymatically converted to cis-zeatin, dihydrozeatin and other products. The goal of this work was to identify the chemical structure of the unknown product of enzyme converting trans-zeatin. This product was identified as 6-(3-methylpyrrol-1-yl)-purine and his presence has been detected in leaves of peas, beans and various corn parts.</p>
Keywords	cytokinin, enzyme, pea, bean, corn
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

OBSAH	6
Cíle práce:	8
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Cytokininy.....	10
1.1.1 Definice a historie objevu cytokininů	10
1.1.2 Chemická struktura a rozdělení.....	10
1.1.3 Cytokininový transport	12
1.1.4 Signální dráha cytokininů	14
1.1.5 Biologické funkce cytokininů v rostlinách	15
1.2 Biosyntéza a degradace cytokininů.....	18
1.2.1 Biosyntetické dráhy cytokininů	18
1.2.1.1 Zdroje isoprenoidní části cytokininové molekuly.....	18
1.2.1.2 Isopentenyltransferasa (IPT)	19
1.2.1.3 Ostatní enzymy biosyntetické dráhy	23
1.2.2 Degradace cytokininů	24
1.2.2.1 Vratná inaktivace cytokininů	25
1.2.2.2 Nevratná inaktivace cytokininů – cytokinin oxidasa/dehydrogenasa	26
1.3 Enzymy konvertující <i>trans</i> -zeatin	28
1.3.1 Zeatin <i>cis-trans</i> isomerasa	29
1.3.2 Zeatin reduktasa	30
1.4. Analýza cytokininů	31
1.4.1 Systém GC/MS	32
1.4.2 Techniky s využitím kapalinové chromatografie	32
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
2.1 Materiál, chemikálie a roztoky.....	35
2.1.1 Biologický materiál.....	35
2.1.2 Chemikálie	35
2.1.3 Technické vybavení	36
2.1.4 Příprava pufrů a ostatních roztoků	37
2.2 Metodika	38

2.2.1 Částečná izolace enzymu produkujícího neznámý produkt z fazolových lusků	38
2.2.2 Nastavení enzymových reakcí	38
2.2.3 Postup zpracování vzorků pro HPLC-UV/VIS a následná analýza	39
2.2.4 Analýza enzymových reakcí s radioaktivně značeným substrátem	40
2.2.5 Příprava vzorků listů různých druhů a odrůd fazolí a hrachu a vzorků kukuřice v různém stádiu vývoje	40
2.2.6 Lowryho metoda stanovení koncentrace proteinů	40
2.3 Výsledky a diskuze	41
2.3.1 Stanovení neznámého produktu v různých druzích a odrůdách fazolí a hrachu	41
2.3.2 Analýza vzorků kukuřice v různém stádiu vývoje na přítomnost neznámého produktu	43
2.3.3 Stanovení distribuce radioaktivity v rostlinných extraktech po enzymatické reakci s radioaktivně značeným tZ[³ H].....	45
2.4 Závěr:	56
Seznam použité literatury.....	57

Cíle práce:

1. Vypracování literární rešerše zahrnující metabolismus, využití, a analýzu cytokininů za použití citované odborné literatury.
2. Izolace neznámého produktu vznikajícího z *trans*-zeatinu enzymovou aktivitou z extraktu fazolových lusků.
3. Kvalitativní a kvantitativní analýza aktivity enzymu konvertujícího *trans*-zeatin v extraktech různých odrůd fazole a hrachu.
4. Kvantitativní analýza aktivity enzymu konvertujícího *trans*-zeatin v extraktech z kukuřičných orgánů v různém stádiu vývoje.
5. Ověření konverze radioaktivně značeného *trans*-zeatinu ve vybraných vzorcích kukuřice a hrachu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cytokininy

1.1.1 Definice a historie objevu cytokininů

Název rostlinných hormonů cytokininů vznikl z jejich schopnosti podporovat dělení buněk. Objev prvního cytokininu se datuje v roce 1955, kdy byla v autoklávované DNA nalezená látka, chemicky pojmenovaná jako 6-furfuryladenin a triviálně pojmenovaná jako „kinetin“ (Barciszewski et al., 1996; Frébort et al., 2011).

Navzdory objevu kinetinu jako prvního cytokininu, tato sloučenina byla jako přirozeně se vyskytující látka prokázána o více než čtyři desetiletí později, kdy po většinu této doby byl vznik kinetinu vysvětlován jako produkt umělého přesmyku vyvolaného autoklávováním. Jako přirozeně se vyskytující byl kinetin nalezen v kokosovém ořechu, DNA telecího brzlíku nebo i v jiných DNA, kde může vznikat jako produkt poškození DNA chemickou reakcí furfuralu s adeninovým zbytkem (Barciszewski et al., 1996; Barciszewski et al., 2007; Miller et al., 1956; Frébort et al., 2011).

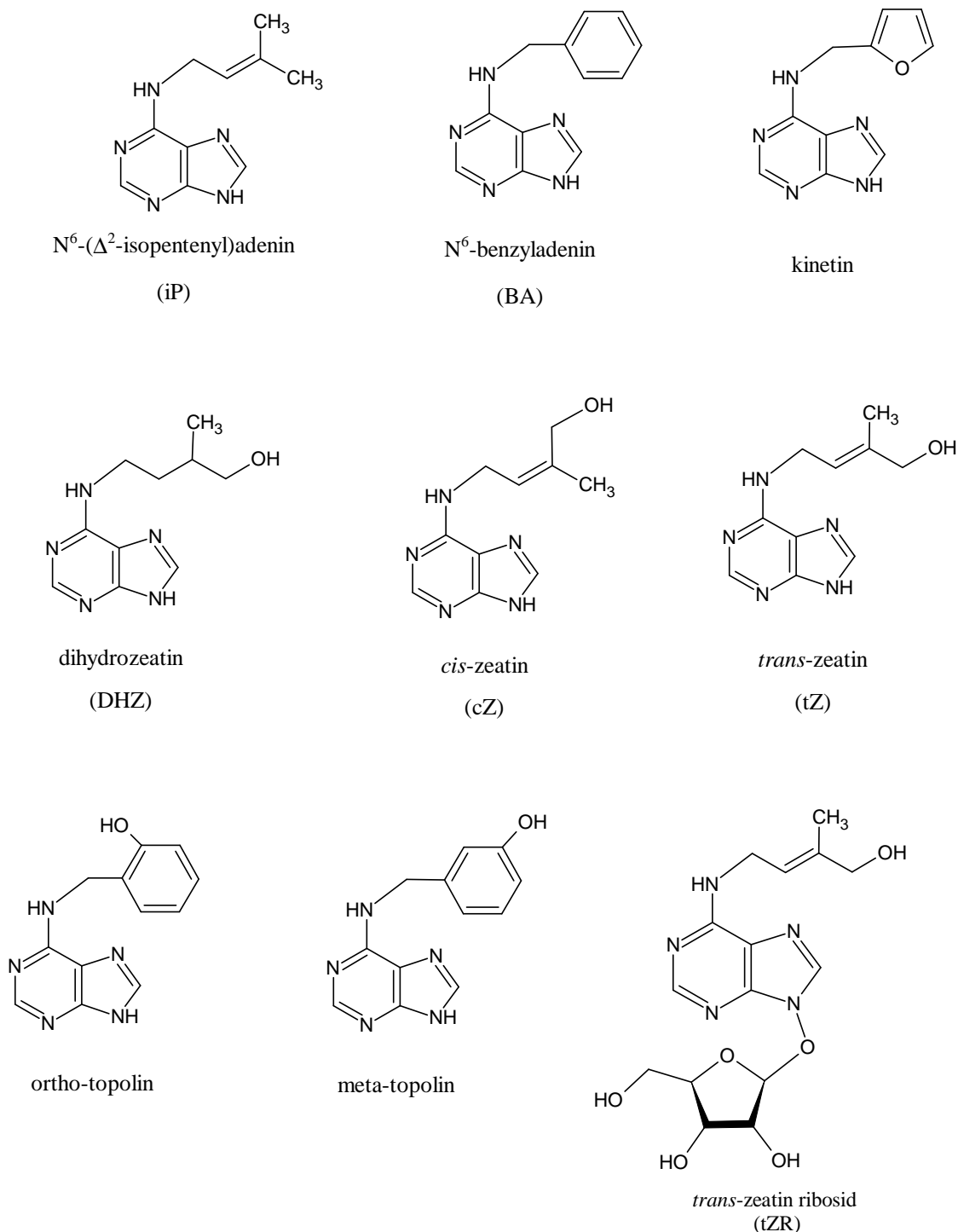
Cytokininy se jako chemická individua řadí mezi rostlinné hormony, které byly objeveny na konci 19. století a jsou definovány jako přirozeně se vyskytující látky, které se nacházejí v rostlinném pletivu ve velmi nízké koncentraci (fmol - pmol.g⁻¹ čerstvé hmoty). Tato definice souvisí také s pojmem „regulátory růstu rostlin“, které lze definovat jako látky schopné stimulovat růst, ovšem na rozdíl od růstových regulátorů mezi ně lze zařadit i látky uměle nasyntetizované (Frébort et al., 2011; Tarkowski et al., 2004). Velké množství látek řazených mezi cytokininy lze zařadit do obou těchto skupin, a tudíž lze dojít k závěru, že cytokininy leží na průniku těchto dvou množin.

Společně s rozvojem cytokininů se objevuje ještě další skupina látek, jejíž vznik byl umožněn na základě znalosti struktury cytokininů a jejich vazebných proteinů. Jedná se o anticytokininy, které v biologickém materiálu působí jako antagonisté cytokininové odpovědi (Skoog et al., 1975).

1.1.2 Chemická struktura a rozdělení

Podle chemické struktury lze cytokininy rozdělit do dvou hlavních skupin, a sice na deriváty adeninu a deriváty močoviny a thiomčoviny, kdy v biologickém materiálu se přirozeně vyskytují hlavně deriváty adeninu (Frébort et al., 2011; Tarkowski et al., 2004).

Podrobnější rozdělení cytokininů adeninového typu lze provést podle konfigurace N⁶ postraního řetězce na isoprenoidní a aromatické. Mezi cytokininy s isoprenoidním postraním řetězcem lze zařadit isopentenyladenin, zeatin (*cis* a *trans* izomer), dihydrozeatin a další. Mezi aromatické cytokininy lze zařadit benzyladenin a topoliny. Některé z těchto sloučenin jsou zobrazeny na Obr. 1.



Obrázek 1: Vzorce a názvy vybraných cytokininů (Mok & Mok, 2001).

Kromě těchto sloučenin lze v rostlinách nalézt různé deriváty, mezi které patří O-glukosidy, N-glukosidy a konjugáty s aminokyselinami u kterých je na základě strukturálních odlišností patrná odlišná biologická aktivita (Mok & Mok, 2001; Tarkowski et al., 2004).

1.1.3 Cytokininový transport

Vyšší rostliny jsou složeny z několika orgánů, které mohou být funkčně rozděleny na vegetativní a generativní, nebo také na fotosyntetické a nefotosyntetické. Tyto orgány na sebe vzájemně působí a to jak z důvodu optimalizace metabolických a vývojových procesů, tak i z hlediska reakce na vnější podmínky. Pro tyto účely vznikly systémy místní a dálkové komunikace mezi buňkami a orgány u kterých rostlina využívá nízkomolekulárních látek mimo jiné i fytohormonů (Sakakibara et al., 2010).

Mezi cytokininy převládající ve vyšších rostlinách patří především N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin (iP) a zeatin (Z), kdy volné báze a jejich ribosidy (iPR, ZR) jsou považovány za biologicky aktivní sloučeniny (Werner et al., 2001).

Z hlediska regulace hladiny cytokininů se využívá několika regulačních systémů zahrnující mimo jiné také regulaci syntézy a degradace cytokininů, kterým bude věnována následující kapitola. Dalším systémem regulace hladiny je distribuce růstových hormonů jak v rámci pletiva, tak i v rámci celé rostliny. Distribuční systém těchto látek je v rostlinách zcela klíčový z hlediska efektivnosti komunikace mezi buňkami a částmi rostliny (Hirose et al., 2008; Sakakibara et al., 2010).

Prvním stupněm cytokininové distribuce je intracelulární transport cytokininů. Hlavním prostorem subcelulární syntézy cytokininů jsou plastidy, kdy na základě poznatků hromadění cytokininových ribosidů ve vakuole a striktní intracelulární lokalizaci biosyntetických enzymů v buněčných organelách vede k předpokladu existence intracelulárního transportního systému (Sakakibara, 2006).

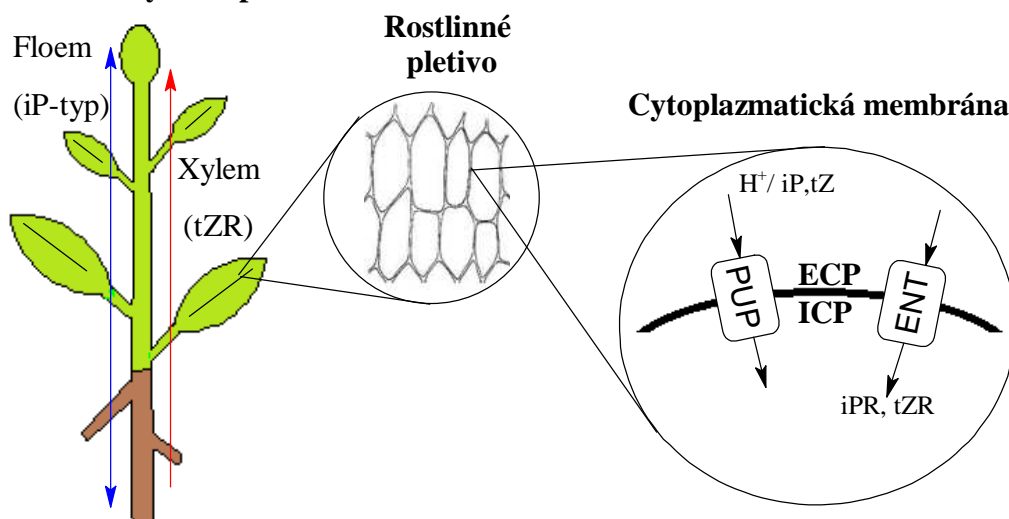
Druhou oblastí distribuce je transport cytokininů přes plazmatickou membránu, kdy pokud pomineme difuzi, byly v rámci tohoto systému nalezeny dvě skupiny enzymů, které mohou zodpovídat za distribuci cytokininů mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem.

První skupinou jsou purinové permeasy (PUP), které byly nalezeny v *Arabidopsis*, zprostředkovávají příjem cytokininových bází. Jedná se o transportéry AtPUP1 a AtPUP2 s širokou substrátovou specifitou, schopné kromě transportu cytokininových

bází (iP, tZ) zprostředkovávat příjem i několika jiných adeninových derivátů, jako samotného adeninu nebo kofeinu (Bürkle et al., 2003; Sakakibara, 2006). Transportéry PUP jsou zakotveny v cytoplasmatické membráně a pracují na principu symportu s H^+ kationty (Obr. 2). Transportérová afinita AtPUP1 pro tZ se pohybuje kolem $K_i = 20\text{-}35 \mu\text{M}$, což je hodnota srovnatelná s jinými enzymy metabolizující cytokininy (Bürkle et al., 2003; Cedzich et al., 2008; Gillissen et al., 2000).

Ačkoliv existují transportéry pro volné báze, majoritní transportní formou cytokininů zůstávají nukleosidy. Transportní proteiny pro nukleosidy patří do skupiny rovnovážných nukleosidových transportérů (ENT). V *Arabidopsis* bylo zjištěno, že proteiny z této skupiny (AtENT3, AtENT6, AtENT7) dokážou přenášet cytokininové ribosidy iPR a tZR na základě koncentračního gradientu přes membránu (Sakakibara et al., 2010).

Rostlina - dálkový transport



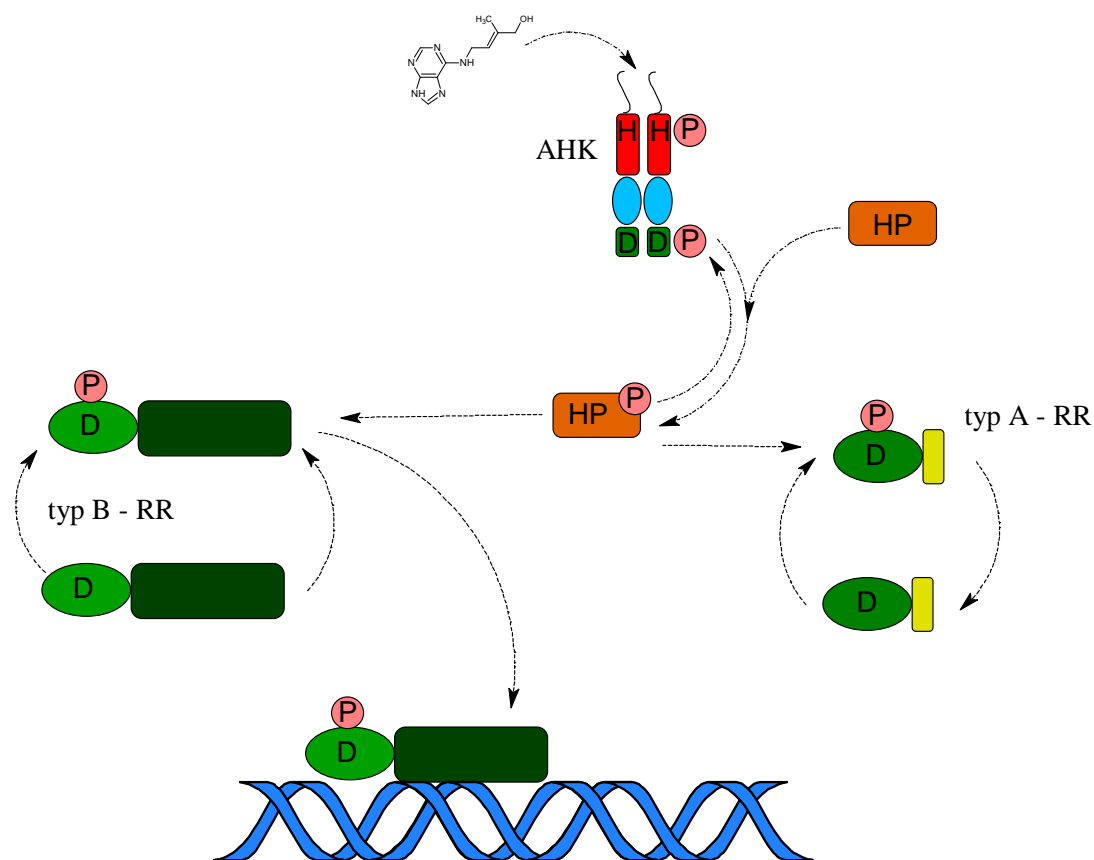
Obrázek 2: Transport cytokininů v rostlinách. ECP, extracelulární prostor (apoplast); ICP, intracelulární prostor (cytosol); iP, N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin; tZ, *trans*-zeatin; iPR, N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin ribosid; tZR, *trans*-zeatin ribosid; PUP, purinová permeasa; ENT, rovnovážný nukleosidový transportér (Werner & Schmölling, 2009; Sakakibara et al., 2010).

Podobné transportéry byly nalezeny také v genomu rýže (*Oryza sativa*), který obsahuje čtyři ENT geny (OsENT1 - OsENT4), kdy produkt genu OsENT2, zprostředkovává příjem cytokininových nukleosidů, stejně jako samotného adenosinu. OsENT2 preferuje iPR s $K_m = 32 \mu\text{M}$ před tZR s $K_m = 660 \mu\text{M}$ (Hirose et al., 2005).

Posledním stupněm distribuce je transport v rámci celé rostliny, která je zprostředkována xylemem a floemem (Obr. 2). Cytokininů typu iP převažují ve floemovém transportu a tZR převažuje v xylemovém transportu (Sakakibara et al., 2010). Samotný vznik těchto cytokininů může být odpovědí na několik vnějších nebo vnitřních podmětů, kterým je věnována podkapitola 1.1.5.

1.1.4 Signální dráha cytokininů

Cytokininová signalizace je v buňkách vyšších rostlin zprostředkována komplikovaným systémem. Přenos signálu nastává navázáním cytokininů na transmembránový receptor obsahující tzv. CHASE doménu, tvořenou vysoce konzervovanou sekvencí aminokyselin, která zajišťuje vazbu aktivního cytokininu, nejčastěji iP nebo tZ případně i cZ a jejich příslušných ribosidů (iPR, tZR, cZR). V případě Arabidopsis byly nalezeny tři receptory (AHK2, AHK3, AHK4), kdy na základě vazebných preferencí byla zjištěna nižší afinita těchto receptorů k iP typu cytokininů (To & Kieber, 2008; Werner & Schmülling, 2009).



Obrázek 3: Signální dráha cytokininů (Mok & Mok, 2001; Werner & Schmülling, 2009).

Navázáním cytokininu na CHASE doménu dochází u histidinkinasy k autofosforylaci histidinového zbytku s následným přenosem fosfátové skupiny na Asp, ze kterého dochází k fosforylaci proteinu HP, který zprostředkovává přenos signálu do jádra buňky (Obr. 3). Fosforylovaný HP protein v jádře reaguje s proteiny RR (response regulátor), které se dělí na A-typ a B-typ. Rozdíl mezi těmito skupinami spočívá jednak v aminokyselinové sekvenci a také ve schopnosti reagovat se samotnými cytokininy, kdy A-typ je schopen samostatně reagovat na cytokininy, ovšem B-typ nikoliv (To & Kieber, 2008; Werner & Schmülling, 2009; Sakakibara, 2006).

1.1.5 Biologické funkce cytokininů v rostlinách

Zvýšení zemědělské produkce v celém světě za poslední čtyři desetiletí bylo spojeno s významným nárůstem v používání hnojiv, ovšem s negativním dopadem na životní prostředí. Příkladem je eutrofizace sladkovodních vod. Z toho důvodu se stále zvyšuje potřeba pochopit vztahy mezi růstovými regulátory, enviromentálními podmínkami a fenotypovými projevy (Sakakibara et al., 2010).

Původně se předpokládalo, že cytokininy jsou syntetizovány v kořenech. Ovšem nedávné studie o rozmístění metabolismu cytokininů prokázaly, že cytokininy jsou vyráběny nejen v kořenech, ale také v různých místech v rámci částí rostlin. V *Arabidopsis* jsou geny kódující proteiny syntetizující cytokininy exprimovány v řadě orgánů, včetně kořenů, listů, stonků a květů.

Z pohledu biologických funkcí cytokininů je třeba věc hodnotit z několika pohledů a to z pohledu výskytu aktivních a neaktivních forem cytokininů, vlivu enviromentálních podmínek a vývojové fáze, ve které se rostlina nachází. Rovněž je třeba poukázat na vliv cytokininů na jednotlivé části rostliny, jelikož nelze z hlediska přesnosti výkladu pohlížet u vlivu cytokininů na rostlinu jako celek.

První faktor je, že se cytokininy mohou v rostlině vyskytovat v aktivní a neaktivní formě. Za aktivní formu jsou považovány volné cytokininové báze jako iP nebo tZ, kdy zvláštní postavení v tomto faktoru má vzájemný vztah *trans*- a *cis*- izomeru zeatinu. *Trans* izomer byl považován za aktivní formu hormonu, naproti tomu *cis* izomer byl považován za téměř neaktivní (Kamínek, 1982).

V posledních několika letech byly předneseny důkazy o klíčové roli vzájemného vztahu obou izomerů, spočívající jednak v dynamických proměnách hladin obou izomerů ve fázích rostlinného vývoje a také enzymaticky zprostředkované vzájemné konverzi

v průběhu života celé rostliny (příkladem je *Arabidopsis*) nebo v průběhu embryogeneze či buněčného cyklu (Dobrev et al., 2002; Emery et al., 1998; Gajdošová et al., 2011; Quesnelle & Emery, 2007).

Dalším aspektem biologických funkcí cytokininů je jejich vliv na jednotlivé části rostlin. Pokud se budeme zabývat jednotlivými fyziologickými účinky, jsou cytokininy považovány za regulátory funkce meristému, podporují dormanci axiálních pupenů, regulují vztah mezi sinkem a zdrojem a oddalují senescenci listu (Gan & Amasino 1995; Tanaka et al., 2006; Sakakibara et al., 2010).

V kořenech rostliny se stejně jako na mnoha jiných místech projevují protichůdné účinky mezi cytokininy a auxiny, kdy jejich vzájemná interakce a poměr ve prospěch cytokininů ovlivňuje meristematickou diferenciaci cévních svazků, kořenové prodlužování a negativní regulaci tvorby postranních kořenů (Sondheimer & Tzou, 1971; Werner & Schmölling, 2009). Tyto a další účinky cytokininů v kombinaci s vlivem auxinu jsou popsány v tzv. auxin-cytokininové hypotéze vytvořené Skoogem a Millerem předpokládající zásadní vliv interakce těchto dvou skupin hormonů na rostlinnou morfogenezi (Werner et al., 2001).

Neméně důležitým využitím cytokininů je reakce na enviromentální podmínky. V nadzemní části rostliny se dá hovořit o vlivu světla, které interaguje s prvky cytokininového signalizačního systému.

U podzemních částí (kořenů) se lze z hlediska vnějších podmínek setkat s velmi variabilním prostředím, včetně lokálních rozdílů v dostupnosti minerálních živin, kdy reakce na změnu podmínek zprostředkovávají právě cytokininy.

V tomto směru panuje dlouhodobý názor, že vznik cytokininů je indukován dostupností anorganického dusíku. Rovněž na základě analýzy transkriptomu byly nalezeny funkce cytokininů také v signalizaci výskytu síry, fosfátů a ovlivnění syntézy proteinů zajišťujících příjem železa z půdy, kdy tato cytokininová funkce je závislá na receptorech AHK3 a AHK4 (Argueso et al., 2009; Rubio et al., 2009; Séguéla et al., 2008). Z tohoto pohledu jsou tedy cytokininy, považovány za regulátory příjmu živin přes kořen, včetně vlivu na směr růstu kořenů do míst s ideální koncentrací živin (Werner & Schmölling, 2009).

Cytokininy hrají svou roli nejen v reakcích na světlo a koncentraci živin, ale také ve stresových reakcích na osmotický tlak, sucho nebo reaktivní formy kyslíku. Nezanedbatelná je také role cytokininů v patogenezi a symbióze s bakteriemi nebo plísněmi. Nejznámější a bezpochyby nejprozkoumanější případ je interakce rostliny

s bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která na základě produkce cytokininů a auxinů vyvolává u rostliny tvorbu nediferenciovaného pletiva (kalusu). Mezi další mikroorganismy využívající podobný princip patří *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* a *Rhodococcus fascians* (Werner & Schmülling, 2009).

1.2 Biosyntéza a degradace cytokininů

V této kapitole budou představeny sledy enzymatických reakcí, pomocí kterých jsou v rostlinách syntetizovány cytokininy a rovněž budou probrány možnosti jejich inaktivace jak reverzibilní tak ireverzibilní. Navzdory existenci isoprenoidních a aromatických cytokininů se tato kapitola bude věnovat pouze isoprenoidním cytokininům.

1.2.1 Biosyntetické dráhy cytokininů

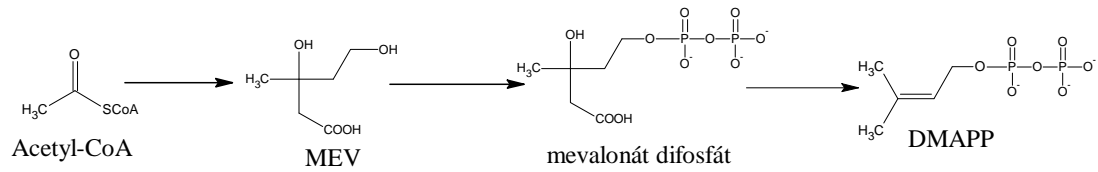
Ústřední postavení v biosyntéze cytokininů má bezpochyby enzym isopentenyltransferasa (IPT), která katalyzuje konjugaci isopentenylové části řetězce se strukturou obsahující adeninovou část. Z hlediska původu může isopentenylová část pocházet ze dvou metabolických drah, jmenovitě MEP dráha a MVA dráha. Z hlediska původu adeninové části molekuly se rovněž vyskytují dvě možnosti, které budou podrobněji probírány u podkapitoly věnující se enzymu IPT (Mok & Mok, 2001; Frébort et al., 2011).

1.2.1.1 Zdroje isoprenoidní části cytokininové molekuly

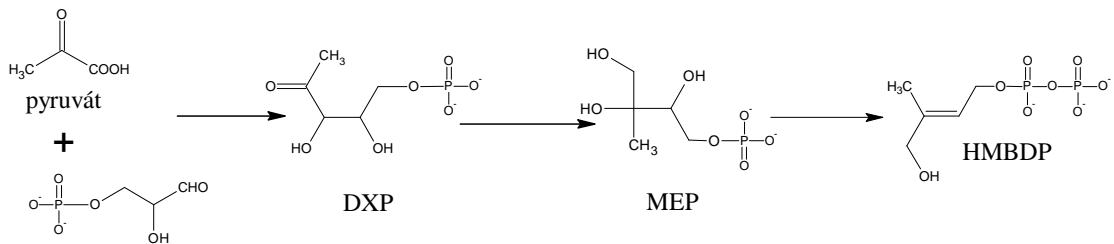
Jak bylo řečeno v úvodu kapitoly, pro syntézu cytokininů je zapotřebí adeninová a isoprenoidní část. K syntéze isoprenoidní části molekuly dochází na dvou místech s možným využitím dvou metabolických drah, které jsou přehledně zobrazeny na Obr. 4. Mevalonátová dráha je umístěna v cytosolu u buněk vyšších rostlin, a zahrnuje vznik dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) z původního prekursoru acetyl-CoA. Na základě experimentů s radioaktivně značenými substráty byla navržena alternativní možnost syntézy isopentenylové části řetězce v podobě hydroxyanalogu postranního řetězce, s názvem 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát (HMBDP).

HMBDP je meziproduktem methylthriolfosfátové (MEP) dráhy, která se vyskytuje v bakteriích a plastidech. Jelikož HMBDP obsahuje hydroxylovou skupinu, kromě možné konverze na DMAPP jej lze přímo enzymaticky transportovat na aminoskupinu adeninu za vzniku zeatinového typů cytokininů. Obě cesty syntézy byly nalezeny v *Arabidopsis thaliana*, kde hrají obě důležitou roli v syntéze aktivních cytokininů (Åstot et al., 2000; Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006).

Meválonátová dráha



Methyltriofosfátová dráha



D-glyceraldehyd-3-fosfát

Obrázek 4: Syntéza isoprenoidní části cytokininů. MEV, mevalonát; DXP deoxyxylulosafosfát; MEP, methyltriofosfát; DMAPP, dimethylallylpyrofosfát; HMBDP, 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát (Kakimoto, 2003).

1.2.1.2 Isopentenyltransferasa (IPT)

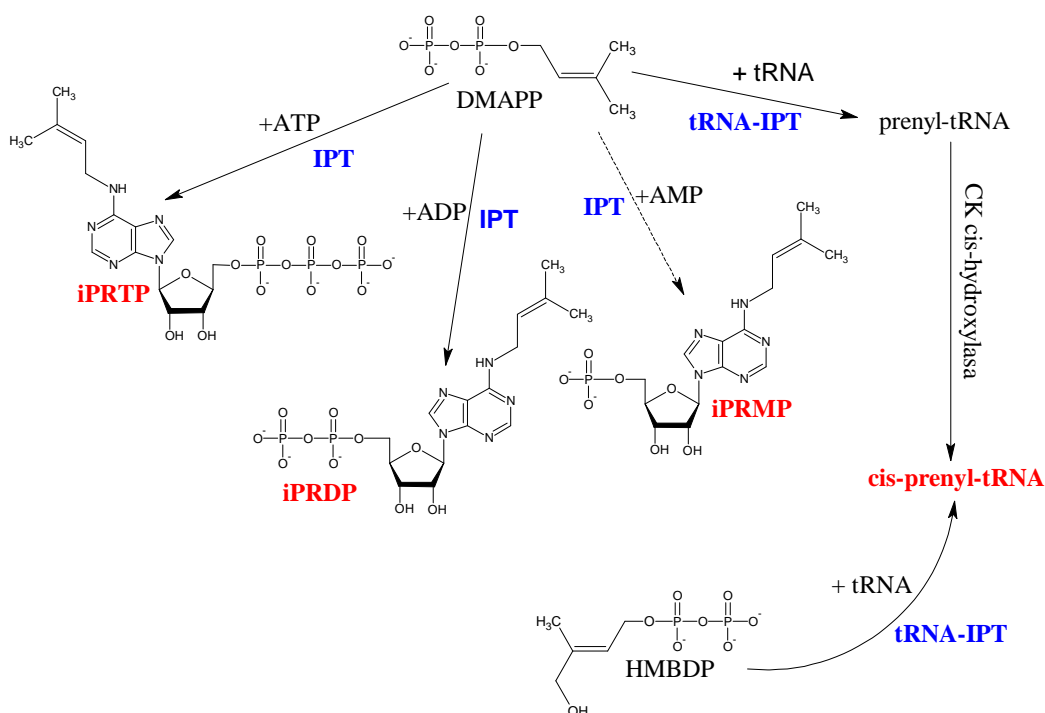
První a rychlost určující krok biosyntézy cytokininů je převod isopentenylového řetězce na adeninovou část molekuly. Tato enzymatická reakce je katalyzována isopentenyltransferasou (IPT, ES 2.5.1.27). Ačkoliv základní úvaha o reakci zůstává pro všechny organismy stejná, u různých skupin organismu panují v této reakci rozdíly v preferencích a druzích substrátů, které enzym využívá (Sakakibara, 2006).

První identifikace substrátů využívaných IPT byla dosažena v organismu *Dictyostelium discoideum*. Tato hlenka produkuje látku discadenin, adeninový derivát, působící jako inhibitor klíčení spór (Nomura et al., 1977; Taya et al., 1978). První krok syntézy této látky je identický vzhledem k syntéze cytokininů kdy dochází k IPT katalyzovanému přenosu isoprenylového řetězce na akceptor AMP nebo ADP, ale nikoliv ATP nebo cAMP.

U rostlin a některých jiných organismů rozlišujeme několik forem syntézy cytokininů, kterých se zúčastňuje IPT. Na Obr. 5 je zobrazeno stručné schéma reakcí katalyzovaných IPT vedoucích ke tvorbě cytokininů. Jak je patrné, v *Arabidopsis* jako modelové rostlině se vyskytují 2 skupiny IPT enzymů, kdy první typ je někdy označován jako ATP/ADP AtIPT vzhledem k tomu, že jako substrát využívá volné

nukleotidy. V *Arabidopsis* se vyskytuje celkem 9 IPT izoenzymů, kdy 7 z nich náleží právě do tohoto typu (AtIPT1, AtIPT3, AtIPT4, AtIPT5, AtIPT6, AtIPT7 a AtIPT8). Tento typ tvoří stěžejní část syntézy cytokininů. Každý člen tohoto typu IPT genů má jedinečnou prostorovou expresi. Exprese AtIPT3, 5 a 7 se vyskytuje poměrně rozsáhle ve vegetativních orgánech. AtIPT8 se exprimuje výhradně v reprodukčních orgánech s nejvyšší expresí v nezralých semenech, stejně jako AtIPT4. AtIPT1 je exprimován v ováriích a vegetativních orgánech.

Tyto enzymy disponují ještě jedním vzájemným rozdílem, a sice odlišností vůči inhibičnímu vlivu cytokininů na jejich expresi, kdy enzymy AtIPT1, 3, 5 a 7 jsou negativně regulovány cytokininy, zatímco účinky cytokininů na AtIPT4, 6 a 8 nebyly sledovány (Kakimoto, 2003; Miyawaki et al., 2006; Chu et al., 2010).

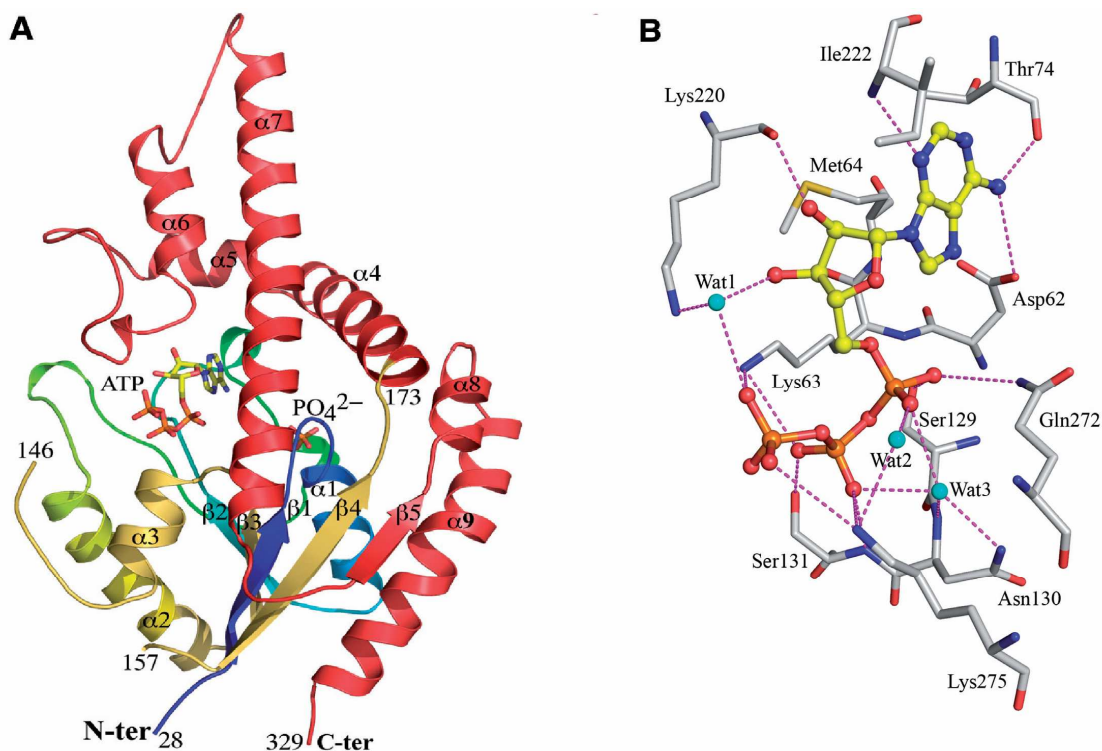


Obrázek 5: Enzymatické reakce katalyzované IPT (modře). AMP, adenosinmonofosfát; ADP, adenosindifosfát; ATP, adenosintrifosfát; iPRMP, N⁶-(Δ²-isopentenyl)adenin ribosid 5'-monofosfát; iPRDP, N⁶-(Δ²-isopentenyl)adenin ribosid 5'-difosfát; iPRTP, N⁶-(Δ²-isopentenyl)adenin ribosid 5'-trifosfát; DMAPP, dimethylallylpyrofosfát; HMBDP, 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát (Sakakibara, 2006).

Kromě této cesty byla identifikována další možnost syntézy cytokininů, která využívá jako zdroj adeninové části molekuly tRNA. Tyto enzymy rozpoznávají tRNA především

pak typ, který na začátku antikodonu obsahuje na prvním místě U a katalyzují přenos isopentenylového nebo cis-hydroxy-isopentenylového postranního řetězce na N⁶ pozici na adeninovém kruhu. V tomto směru z důvodu možnosti využití i HMBDP lze předpokládat, že degradace tRNA představuje hlavní zdroj *cis*-zeatinového typu cytokininů (Sakakibara, 2006; Chen, 1997).

Arabidopsis má dva geny (AtIPT2 a AtIPT9) kódující enzymy s afinitou vůči tRNA. Klíčovou úlohu v ověření tvrzení, že *cis*-zeatinový typ cytokininu je vázán na degradaci tRNA, sehrála příprava rostlinného double a kvadrupolového mutantu *Arabidopsis thaliana*, přičemž double mutant měl vyřazené geny AtIPT2 a 9 a kvadrupolový mutant měl vyřazené geny AtIPT1, 3, 5 a 7. V případě kvadrupolového mutantu byl detekován pokles iP a tZ, ovšem cZ, *cis*-zeatin ribosid (CZR) a *cis*-zeatin ribosid monofosfát (cZRMP) měly normální nebo i zvýšenou hladinu, což společně se skutečností, že v případě double mutantu došlo k jejich kvantitativnímu vymizení, potvrzuje domněnku, že cZ-typ cytokininů je produkován pomocí jiné cesty než iP a tZ-typ cytokininů. tRNA IPT jsou tedy nezbytné pro biosyntézu cZ-typu cytokininů (Chen, 1997; Chu et al., 2010; Miyawaki et al., 2006).



Obrázek 6: Krystalová struktura IPT (A) a jeho aktivního místa (B; Chu et al., 2010).

Pokud se nyní zaměříme na objasnění mechanismu enzymatické reakce IPT pocházející z *Humulus lupulus* který je zobrazen na Obr. 6 zjistíme, že struktura daného enzymu obsahuje některé konzervované sekvence, které jsou společné pro všechny rostliny, ovšem na druhou stranu obsahuje rovněž variabilní oblasti, které určují prostorové umístění příslušného genu například v chloroplastech (Chu et al., 2010).

Pokud chceme objasnit důvod preference některých substrátů před jinými, je třeba poznat strukturu aktivního místa. V IPT se molekula substrátu ATP nachází na jedné straně enzymového kanálu. Adeninový kruh z ATP je zanořen v hluboké kapse a kanál obsahuje také Pi skupinu, která se nachází na druhé straně kanálu. Cukerná část molekuly ATP není oproti adeninovému kruhu zanořena. Jinak celý enzymový kanál je obklopen řadou pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků, a tudíž je k dispozici rozsáhlá síť vodíkových vazeb.

Aminokyselinové rezidua vytvářející tuto síť jsou v rámci zachování reaktivity enzymu vysoce konzervované. Mezi tyto aminokyselinové zbytky patří například Asp⁶² interagující přímo s N⁶ pozicí na adenosinu. Mezi další aminokyselinové zbytky interagující s adenosinem patří například Ile²²², Thr⁷⁴ nebo Lys²²⁰, který interaguje tzv. přímou a nepřímou vodíkovou vazbou, kdy nepřímá vodíková vazba je zprostředkována molekulou vody, která se nachází v aktivním místě.

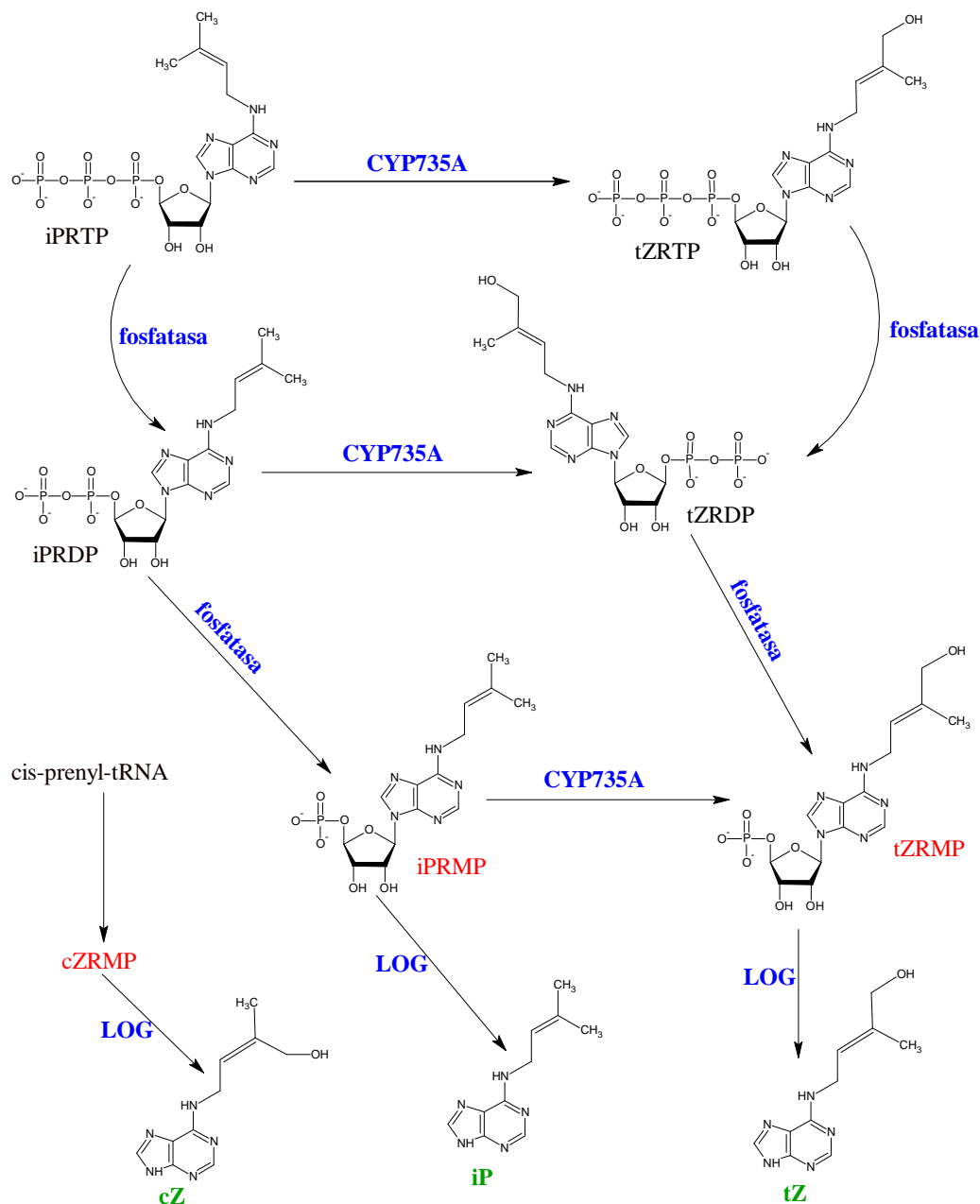
V tomto směru se zde projevuje důležitost přístupu rozpouštědla do aktivního místa enzymu. Kromě jiného s adenosinem interagují i aminokyselinové zbytky Met⁶⁴, Leu²⁶⁸, Ala²²¹ a Ile²²² formou van der Waalsovy interakce s adeninovým kruhem a ribosou. Fosfátová skupina ATP tvoří vodíkové vazby s postranními řetězci Ser¹²⁹ a Gln²⁷² stejně jako dvě vodou zprostředkované interakce.

Obecně platí, že enzymy potřebují jako kofaktor Mg²⁺ ionty na stabilizaci beta a gama fosfátové skupiny vázané na ATP. Nicméně, žádný kovový ion koordinující ATP se ve struktuře rostlinné IPT nevyskytuje.

Místo toho, postranní řetězce Lys⁶³ a Lys²⁷⁵ stabilizují gama fosfátovou skupinu ATP a tím nahrazují roli Mg²⁺ iontů. Z těchto interakcí enzymu s fosfátovými skupinami z ATP vyplývá zdůvodnění preference ATP a ADP jako substrátů před AMP u rostlinných IPT. Z hlediska preference substrátu IPT váže nukleotidové substráty v tomto pořadí: ATP > dATP ≈ ADP > GTP > CTP > UTP (Chu et al., 2010; Miyawaki et al., 2006; Sakakibara, 2006).

1.2.1.3 Ostatní enzymy biosyntetické dráhy

Po vzniku iPR fosfátu je syntéza tZ katalyzována cytochromem P450 monoxygenasou. U *Arabidopsis* byly nedávno nalezeny dva takové enzymy (CYP735A1 a CYP735A2). Hodnoty kinetických konstant v tomto ohledu naznačují preferenční působení CYP735A na iPRMP a iPRDP než na iPRTP.



Obrázek 7: Biosyntetická dráha pro iP, tZ a cZ. CYP735A, cytochrom P450 monoxygenasa; iPRMP, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin ribosid 5'-monofosfát; iPRDP, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin ribosid 5'-difosfát; iPRTP, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin ribosid 5'-trifosfát; tZRMP, *trans*-zeatin ribosid 5'-monofosfát; iPRMP, N⁶-(Δ^2 -

isopentenyl)adenin ribosid; cZRMP, *trans*-zeatin ribosid 5'-monofosfát; iP, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin; tZ, *trans*-zeatin; cZ, *cis*-zeatin; iPR, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin ribosid; tZR, *trans*-zeatin ribosid; cZR, *cis*-zeatin ribosid (Frébort et al., 2011; Sakakibara, 2006).

Tuto skutečnost je možné ovšem velmi snadno kompenzovat působením fosfatas, které převádějí iPRTP, iPRDP, tZRTP a tZRDP na příslušné monofosfáty (Sakakibara, 2006; Takei et al., 2004).

Z hlediska syntézy volných bází je proces realizován působením enzymu fosforibohydrolasy (LOG), který převádí iPRMP, tZRMP a cZRMP na příslušné volné báze. Za alternativní možnost syntézy je pokládána i cesta realizována působením 5'-ribonukleotidfosfohydrolasy převádějícím iPRMP, tZRMP a cZRMP na příslušné ribosidy za odštěpení fosfátu, které jsou následně adenosin nukleosidasou převedeny na aktivní volné báze. V neprospěch této cesty ovšem mluví afinita těchto enzymů k příslušným substrátům v kontrastu s působením LOG (Frébort et al., 2011; Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006).

Často opomíjenou syntetickou cestou se v tomto ohledu stává degradace *cis*-prenyl-tRNA na *cis*-zeatin ribosid 5'-monofosfát (cZRMP), který je následně enzymaticky převeden až na cZ. Důležitost této biosyntetické dráhy potvrzuje fakt, že velká část postranního řetězce cZ u *Arabidopsis* je odvozena právě z této syntetické cesty. Přes svou důležitost hraje degradace tRNA v *Arabidopsis* pouze druhotnou roli. Pro větší přehlednost jsou enzymatické reakce popsané v tomto oddílu zobrazeny ve schématu na Obr. 7 (Chen, 1997; Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006).

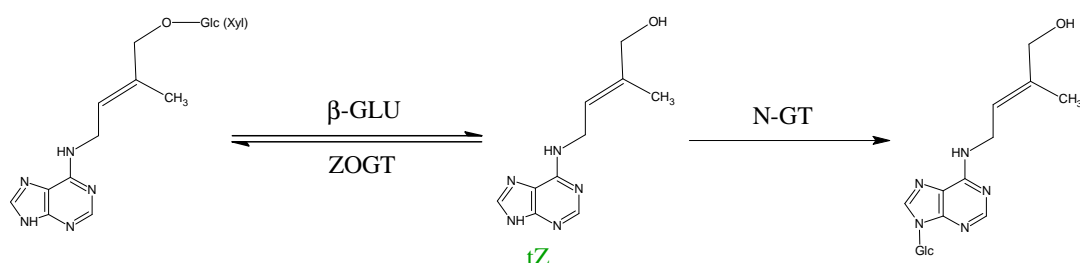
1.2.2 Degradace cytokininů

Jelikož jsou cytokininy využívány jako signální látky, je třeba velmi citlivě regulovat jejich hladinu v rostlinném pletivu. Z toho důvodu se vyvinulo několik metod degradace aktivních cytokininů. Degradáčnı́ proces můžeme z hlediska reverzibility rozdělit na vratný a nevratný (Frébort et al., 2011).

1.2.2.1 Vratná inaktivace cytokininů

Reverzibilní degradace cytokininů je realizována na základě konjugace aktivní cytokininové molekuly obvykle se sacharidovou molekulou, případně s aminokyselinou. Z pohledu vratné inaktivace se ještě u tZ nabízí možnost snížení aktivity převedením na cZ isomerací, případně převedením redukcí dvojné vazby v isopentenylové části molekuly na DHZ (Frébort et al., 2011; Mok & Mok, 2001).

Z pohledu využitelnosti hrají v tomto ohledu hlavní úlohu dva typy enzymů a sice O-glukosyltransferasy a O-xylosyltransferasy. Do úvahy připadají také N-glukosyltransferasy, ovšem enzymy umožňující vratnou přeměnu N⁷ a N⁹ glukosidů na volné báze nebyly dosud nalezeny (Frébort et al., 2011). Působení obou enzymů je zobrazeno na Obr. 8.



Obrázek 8: Reverzibilní inaktivace *trans*-zeatinu. N-GT, N-glukosyltransferasa; ZOGT, zeatin O-glukosyltransferasa; β -GLU, β -glukosidasa; tZ, *trans*-zeatin. (Frébort et al., 2011).

Působením enzymu zeatin O-glykosyltransferasy vzniká O-glucosylzeatin, který se zdá být všudypřítomný metabolit v rostlinách oproti O-xylosylzeatinu, který je méně častý. O-glucosylzeatin je odolný vůči degradaci cytokinin oxidasou/dehydrogenasou a může být přeměněn na aktivní cytokinin pomocí enzymu β -glukosidasy. Podařilo se izolovat enzymy odpovídající za tuto konverzi a sice O-xylosyltransferasu (EC 2.4.1.204) z *Phaseolus vulgaris*, a O-glukosyltransferasu (EC 2.4.1.203) z *Phaseolus lunatus*.

Geny, které kódují zeatin O-glucosyl- a O-xylosyltransferasu byly naklonovány z *Phaseolus lunatus* a *Phaseolus vulgaris*, kdy oba tyto geny neobsahují žádné introny a kódují polypeptidy o délce 459 a 454 aminokyselin s hmotností cca 51 kDa.

Již zmíněným enzymem pro reaktivaci cytokininů je β -glukosidasa (EC 3.2.1.21). Kukuřičné β -glukosidasy mají přibližnou hmotnost 60 kD s funkcí reaktivace konjugovaných cytokininů. Gen kodující tento enzym v kukuřici je asi 5 kbp dlouhý

a skládá se z 12 exonů oddělených 11 introny (Frébort et al., 2011; Mok & Mok, 2001; Turner et al., 1987; Veach et al., 2003).

1.2.2.2 Nevratná inaktivace cytokininů – cytokinin oxidasa/dehydrogenasa

Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKX) je enzym ireverzibilně degradující cytokininy odštěpením N⁶-isoprenoidního postranního řetězce za vzniku adeninu a příslušného aldehydu (Mok & Mok, 2001). Aktivita tohoto enzymu byla nalezena u mnoha druhů rostlin a v menší míře byla aktivita také nalezena v několika dalších organismech, a to u *Funaria hygrometrica* a *D. discoideum* (Gerhäuser & Bopp, 1990; Armstrong & Firtel 1989).

Většina, ale ne všechny z těchto enzymů, jsou glykoproteiny, s optimálním pH v rozmezí 6,0 až 9,0 (Armstrong, 1994; Kamínek & Armstrong, 1990). Reakční proces cytokininové oxidace probíhá přes iminový intermediát, kdy elektronový akceptor přijme dva elektrony z enzymového flavinového kofaktoru. Po mnoho let se předpokládalo, že pro enzymatickou činnost je nezbytný molekulární kyslík, ale později byly zjištěny jiné variace elektronového akceptoru a to zejména chinonového typu, které byly efektivnější než kyslík (Galuszka et al., 2001; Frébortová et al. 2004). Z tohoto důvodu byl enzym překlasifikován na dehydrogenasu EC 1.5.99.12 (Galuszka et al., 2001).

Na základě srážení enzymu kyselinou trichloroctovou bylo zjištěno, že enzym váže enzymový kofaktor kovalentní vazbou z důvodu, že nebylo možné provést oddělení kofaktoru od enzymu. Na základě dalších experimentů bylo zjištěno, že CKX obsahuje kovalentně vázaný FAD, který usnadňuje redoxní katalýzu vlivem oxidační síly flavinu (Bilyeu et al., 2001; Frébortová et al., 2004).

Kukuřičná CKX, klasifikována jako ZmCKX1 byla lokalizována v aleuronové vrstvě v zrnech a ve floémových buňkách stonků, kdy v zrnech z hlediska exprese enzymu byla zjištěna časově dynamická a prostorově diferenciovaná závislost (Bilyeu et al., 2003; Frébort et al., 2011).

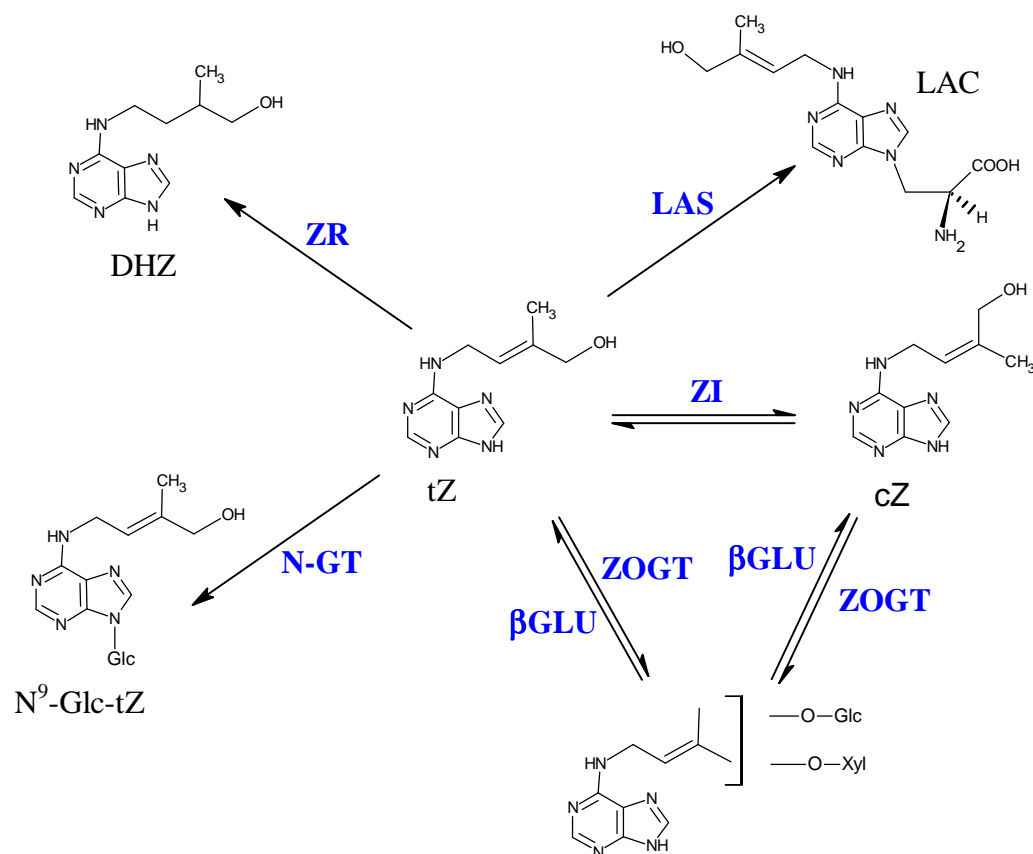
Kompletní CKX enzymy se skládají z domény pro vazbu FAD a substrátového vazebného místa. Asi jedna třetina všech aminokyselin tvořící protein, je vysoce konzervovaná u jednotlivých CKX enzymů. FAD-vazebné domény obsahují velké množství konzervovaných regionů, což naznačuje jejich možný funkční význam ve vazbě substrátu a transportu elektronů (Bilyeu et al., 2001).

Pokud se zaměříme na substrátovou specifitu CKX, *trans*-zeatin, isopentenyldenin a isopentenyldenosin slouží jako dobré substráty a štěpení zeatin ribosidu a *cis*-zeatinu bylo zjištěno za přítomnosti velkého množství enzymu. Jako nevhodné substráty pro CKX se ukázal dihydrozeatin, kinetin a benzylaminopurin společně se zeatin-9-glukosidem. Na základě kinetických parametrů je isopentenyldenin preferovaný substrát v závěsu s *trans*-zeatinem. Mezi některé substráty pro CKX lze zařadit N⁶-(4-methoxybenzyl)adenin, N⁶-benzyladenin, ortho-topolin, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin, kinetin a tZ (Bilyeu et al., 2001; Frébort et al., 2011).

1.3 Enzymy konvertující *trans*-zeatin

Trans-zeatin (tZ) je jedním z dominantních aktivních cytokininů isoprenoidního typu. Jeho syntéza probíhá standardním procesem pro syntézu cytokininu. Vzhledem k tomu, že ve své struktuře obsahuje dvojnou vazbu, je schopen tvořit dva izomery (*cis* a *trans*). Z hlediska biologické aktivity je mnohonásobně více aktivní *trans* izomer, což ovšem neubírá *cis* izomeru na důležitosti. Enzymy, které konvertují tZ včetně možných produktů, jsou přehledně zobrazeny na Obr. 9.

Jelikož je tZ biologicky aktivním cytokininem, je schopen podléhat degradaci zapříčiňující ztrátu aktivity, která může být realizována vratně nebo nevratně. Obě varianty jsou probrány v předcházející kapitole o syntéze a degradaci.



Obrázek 9: Enzymy (modře) konvertující *trans*-zeatin a jejich produkty. tZ, *trans*-zeatin; DHZ, dihydrozeatin; LAC, 3-[N⁶-(4-hydroxyisopentenyl)adeninyl]-L-alanin; cZ, *cis*-zeatin; N⁹-Glc-tZ, N⁹-glukosyl-*trans*-zeatin; ZR, zeatin reduktasa; LAS, 9-aminokarboxyethyltransferasa; ZI, zeatin *cis-trans* isomerasa; N-GT, N-glukosyltransferasa; ZOGT, zeatin-O-glukosyltransferasa; βGLU, β-glukosidasa. (Frébort et al., 2011; Sakakibara, 2006).

V tomto směru lze krátce zmínit, že ireverzibilní degradace je realizována CKX a reverzibilní degradace je realizována pomocí konjugace se sacharidem (zeatin-O-glukosyl transferasou, EC 2.4.1.203) případně konjugací s aminokyselinou, která je realizována enzymem 9-aminokarboxyethyl-transferasou, EC 2.5.1.50 (Frébort et al., 2011; Mok & Mok, 2001).

Další možností modifikace tZ struktury, pokud pomineme již zmíněnou izomeraci realizovanou zeatin isomerasou, je redukce dvojné vazby procesem hydrogenace realizované pomocí zeatin reduktasy (EC 1.3.1.69; Frébort et al., 2011).

1.3.1 Zeatin *cis-trans* isomerasa

Hlavním produktem biosyntetické dráhy cytokininů využívající tRNA je *cis*-zeatin ribosid (cZR), který je ovšem minimálně 100 krát méně aktivní než tZ ve srovnání biologických vzorků tabákového kalusu (Bassil et al., 1993). Komplexní analýzy suchozemských rostlin ukazují, že se cZ typ CK vyskytuje všude v rostlinné říši, přičemž jejich hladiny se mohou v průběhu života rostliny značně měnit (Gajdošová et al., 2011; Suttle & Banowitz, 2000). Mezi některé rostliny, které patří mezi ty s výskytem cZ a cZR, lze zařadit lilek brambor, tabák, rýži, pšenici a oves. Pokud chce rostlina získat biologicky aktivní *trans*-zeatin z méně aktivní cZ formy je třeba využít enzymatickou konverzi, jelikož přirozená konverze je v biologických podmínkách v potřebné míře velmi nepravděpodobná (Bassil et al., 1993).

Enzym, který zajišťuje tuto konverzi je nazýván zeatin *cis-trans* izomerasa, jehož činnost byla poprvé popsána v roce 1993 a byla provedena jeho částečná izolace z nezralých semen *Phaseolus vulgaris* (Bassil et al., 1993). Zakoncentrování enzymu z biologického materiálu bylo realizováno pomocí chromatografických technik, ze kterých byla také použita chromatografická kolona obsahující konkanavalin A, kdy skutečnost, že enzym lze pomocí této kolony částečně purifikovat vede k předpokladu, že se jedná o glykoprotein (Bassil et al., 1993).

Tento enzym jako svůj substrát využívá jak cZ tak i jeho ribosid (cZR) i když v menší míře. U tohoto enzymu bylo rovněž ověřeno, že je možná i zpětná konverze z tZ na cZ, ale konverze cZ na tZ je v tomto ohledu favorizovaná.

Z hlediska zdárného průběhu izomerace je zapotřebí, aby enzym měl k dispozici světlo, flavinový kofaktor a v případě experimentu in vitro i dithiothreitol (Bassil et al., 1993; Frébort et al., 2011).

1.3.2 Zeatin reduktasa

Přeměna tZ na dihydrozeatin (DHZ) je katalyzována enzymem zeatin reduktasou (EC 1.3.1.69). Tato enzymatická přeměna byla postupně detekována v listech hrachu (*Pisum sativum*) a embryích *Phaseolus coccineus* a *Phaseolus vulgaris*, ale nikoliv v *Phaseolus lunatus* (Gaudinová et al., 2005; Martin et al. 1989).

Metabolická funkce tohoto enzymu může souviset s regulací hladin cytokininů v rostlinných tkáních z důvodu, že cytokininy s nenasyceným N⁶- postranním řetězcem jsou mnohem aktivnější než jejich protějšky. Kromě toho nasycené cytokininy jsou odolné proti aktivitě degradačních enzymů a proto rychlá přeměna tZ na dihydrozeatin by mohla zachovávat biologickou aktivitu cytokininů, aniž by bylo třeba provést ireverzibilní degradaci působením CKX (Gaudinová et al., 2005; Martin et al., 1989; Mok & Mok, 2001). Cytokininy DHZ typu s největší pravděpodobností přispívají k celkovému obsahu cytokininů v rostlinách, ale zatím nebyl předložen žádný důkaz, že by regulovaly nějaké fyziologické procesy (Gaudinová et al., 2005).

S postupem času byly provedeny pokusy o charakterizaci a částečnou purifikaci tohoto enzymu z embryí *Phaseolus vulgaris* a z hlediska reakčních podmínek bylo zjištěno pH optimum v rozmezí 7,5 až 8,0 s nutnou přítomností NADPH jako kofaktoru (Frébort et al., 2011; Martin et al., 1989). Rovněž byly provedeny experimenty se snahou zjistit, zda je možný zpětný převod z DHZ na tZ, ovšem bez pozitivního výsledku (Martin et al., 1989). Enzym izolovaný z *Phaseolus vulgaris* nevyžadoval ATP ani kationty, ale enzym z *Pisum sativum* byl inhibován přidáním diethyldithiokarbamátu, jako chelatačního činidla, což naznačuje, že u něj může být nutná přítomnost kovového kofaktoru (Gaudinová et al. 2005).

Zajímavou vlastností zeatin reduktasy je její vysoká specifita, kdy jediný známý substrát je tZ ale ostatní látky jako cZ, tZR, iP nebo zeatin O-glykosidy nebyly jako substráty využity.

Za pomocí gelové filtrační chromatografie byly nalezeny dva izoenzymy zeatin reduktasy pojmenované jako HMW a LMW o přibližné Mr 25 kDa a 55 kDa (Martin et al., 1989; Mok & Mok, 2001). Molekulární hmotnost HMW izoenzymu byla přibližně dvakrát větší než LMW izoenzymu, což svědčí o rozdílu v počtu podjednotek mezi těmito dvěma izoenzymy (Martin et al., 1989).

1.4. Analýza cytokininů

Cytokiny se jako rostlinné růstové regulátory vyskytují v jednotlivých rostlinných pletivech a orgánech většinou ve velmi nízkých koncentracích (řádově pmol - fmol.g⁻¹ čerstvé hmoty). Tato skutečnost ve spojení s pouze malým množstvím vzorku, které je k dispozici, zvyšuje potřebu po citlivých a komplexních analytických přístupech, které dokážou s vysokou přesností tyto hladiny stanovit.

Jako nejlepší řešení se jeví spojení vhodné separační techniky s citlivou analytickou koncovkou. Z hlediska separace je primárním požadavkem vysoká efektivita procesu a minimalizace pravděpodobnosti degradace stanovovaného analytu. V procesu extrakce a purifikace se jako základní opatření využívá například vhodné extrakční činidlo, většinou ve spojení s prováděním celého procesu za snížené teploty, obvykle mezi 4°C a -20°C (Tarkowski et al., 2004). Pokud se zaměříme na následné analytické stanovení lze uvést několik metod, které jsou pro tyto účely vhodné.

Jako typické příklady lze uvést radioimunoanalýzu (RIA) nebo stanovení ELISA založenou na interakci analytu s protilátkou. U těchto metod se ovšem vyskytuje celá řada problémů, které snižují jejich využití pro tento druh stanovení, zvláště pokud se jedná o velký počet vzorků, kdy je třeba dívat se na analýzu i z ekonomického hlediska, nehledě na to, že protilátky potřebné pro stanovení ELISA mohou za určitých okolností zkříženě reagovat s jinými složkami, které se vyskytují ve zkoumané směsi (Izumi et al., 2009). Z těchto důvodů se od těchto metod stále více upouští.

Dnešní nejpoužívanější metody analýzy cytokininů jsou chromatografické techniky ve spojení s vhodným detektorem. První metoda tohoto typu byla bezesporu tenkovrstvá papírová chromatografie (TLC), která byla později nahrazena technikami HPLC nebo GC s následně umístěným detektorem, kde lze uvést například UV/VIS detektor, nebo různé druhy hmotnostní spektrometrie (MS) (Tarkowski et al., 2004). Z hlediska použitelnosti a přesnosti se ovšem jako lepší analyzátor jeví detekce pomocí MS z důvodu, že v případě UV/VIS je možná přítomnost dalších fotoaktivních látek ve frakci stanovovaného analytu, což může vést ke zkreslení stanovení (Thomas et al., 1975).

1.4.1 Systém GC/MS

Před zavedením systému HPLC/MS se jednalo o nejpoužívanější metodu analýzy cytokininů v biologických materiálech. Jelikož cytokininy nepatří mezi těkavé látky pro jejich analýzu systémem GC/MS je nutná derivatizace, která také tvoří hlavní nevýhodu této metody oproti HPLC/MS (Tarkowski et al., 2004). Pokud se derivatizace vynechá, dochází ke vzniku nereprodukovatelných spekter. Kromě této nevýhody je rovněž komplikace ve vysokých teplotách, které panují při provádění separace analytů, kdy může dojít k tepelnému rozpadu termolabilních sloučenin (Izumi et al., 2009). Mezi účinné derivatizace pro GC lze zahrnout tvorbu permetylovaných nebo trifluoroacetylových derivátů cytokininů (MacLeod et al., 1976).

1.4.2 Techniky s využitím kapalinové chromatografie

Techniky využívající forem kapalinové chromatografie jsou často spojovány s hmotnostním spektrometrem, který může využít různé typy ionizace a to od ionizace termosprejem (TSI), ionizace elektrosprejem (ESI), ionizaci rychle letícími atomy (FAB) až po chemickou ionizaci za atmosferického tlaku (APCI). Přes mnoho typů ionizací jsou některé z nich méně vhodné, kdy sem lze zařadit ionizaci termosprejem u které se vyskytuje vysoká citlivost termospreje na změnu složení mobilní fáze (Tarkowski et al., 2004).

Jednou z prvních technik pracujících s tímto typem chromatografie je systém využívající kapalinové chromatografie za atmosférického tlaku ve spojení s chemickou ionizační hmotnostní spektrometrií (LC/APCI-MS), kdy tato technika ve srovnání s metodou ELISA vykazovala velmi podobné výsledky a tudíž je vhodná pro stanovování rostlinných hormonů v biologickém materiálu (Yang et al., 1993).

S nástupem vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) došlo k výraznému zvětšení efektivity analýzy, kdy jako analyzátor lze například použít již zmíněný UV/VIS detektor nebo častěji MS detekci.

Příkladem systému využívaného pro analýzu cytokininů je HPLC/ESI-MS/MS u kterého bylo pro cytokininy dosaženo detekčních limitů kolem 1 pmol. Doba analýzy jednoho vzorku pomocí tohoto systému byla 4 minuty, což umožňuje provést i 150 analýz denně. Efektivitu chromatografické separace lze také zvýšit použitím předkolony, která umožňuje nástřik většího množství vzorku i na kolony o malém

průměru. V tomto uspořádání je možné dosáhnout i femtomolárních detekčních limitů (Tarkowski et al., 2004).

Ve vztahu k provedení chromatografické části lze říci, že pokud je použita gradientová eluce dochází ve srovnání s elucí isokratickou k mnohem efektivnějšímu oddělení analytu. S touto úpravou lze dosáhnout více jak 1 000 krát větší citlivosti s dosažením linearit v rozmezí 1 fmol – 5 pmol s využitím systému HPLC/ESI-MS/MS (Prinsen et al., 1998).

Další příklad analytického uspořádání, kterého lze využít je HPLC/ESI-MS/MS využívající ionizaci termosprejem. Pokud přihlídneme k uvedenému nedostatku termosprejové ionizace, bylo zde dosaženo detekčních limitů od jednotek po desítky pmol v závislosti na sledovaném metabolitu (Tarkowski et al., 2004). V poslední době rovněž roste potřeba stanovovat několik tříd rostlinných hormonů současně a to z důvodu vzájemné interakce mezi jednotlivými skupinami. Pro tyto účely se jako velmi efektivní ukazují metody využívající propojení velmi účinné kapalinové chromatografie (UPLC) ve spojení s tandemovým kvadrupolovým hmotnostním spektrometrem s elektrosprejovou ionizací (UPLC-ESI-qMS/MS). Pomocí této metody je možné měřit několik tříd hormonů současně a to s mezí stanovitelnosti v jednotkách až desetínách fmol (Kojima et al., 2009).

Velkou výhodou využití HPLC nebo UPLC ve spojení s MS detektorem je množství vzorku, které je nutné pro danou analýzu, přičemž je zde závislost na povaze tkání a druhu stanovovaných hormonů, nicméně se toto množství pohybuje v jednotkách případně desítkách mg čerstvé hmoty (Tarkowski et al., 2004; Kojima et al., 2009).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál, chemikálie a roztoky

2.1.1 Biologický materiál

Výchozím biologickým materiálem pro prováděné experimenty byly lusky Fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*), vzorky z Kukuřice seté (*Zea mays*) odrůda Cellux v různém stádiu vývoje a listy jednotlivých druhů a odrůd hrachu a fazolí, které jsou pro větší přehlednost uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Názvy a odrůdy použitého rostlinného materiálu.

n	Český druhový název rostliny	Latinský název	Odrůda
1			Dita
2			Katka
3	Fazol keříčkový	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>var. nanus</i>	Luna
4			Zuzka
5			Japonský
6	Fazol popínavý	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>var. vulgaris</i>	Borlotto di Vigevano
7			Alderman
8	Hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	Gloriosa
9			Zázrak z Kelvedonu

Biologický materiál byl uchováván ve zmraženém stavu při teplotě -70°C.

2.1.2 Chemikálie

K ₂ HPO ₄	Hydrogenfosforečnan draselný
KH ₂ PO ₄	Dihydrogenfosforečnan draselný
100% EtOH	Ethanol
MeOH	Metanol pro HPLC (Lachner, Česká republika)
HCOOH	Kyselina mravenčí
NH ₃ (26%)	Amoniak (26% vodný roztok)
Na ₂ EDTA	Disodná sůl kyseliny ethyldiaminotetraoctové

Glycerol
DTT (200 mmol.l⁻¹) Dithiothreitol
Triton X-100
Inhibitor proteas cocktail (Sigma-Aldrich, USA)
(NH₄)₂SO₄ Síran amonný
NADP⁺ (Sigma-Aldrich, USA)
tZ *trans*-zeatin (Olchemin, Česká republika)
Modified Lowry Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, USA)
2N Folin-Ciocalteu Phenol Reagent (Thermo Scientific, USA)
Albumin Standard Ampules (Thermo Scientific, USA)
Scintilační koktejl Ultima Gold (Packard Bioscience, USA)

2.1.3 Technické vybavení

Mixér

Dispergátor

HPLC Nexera (Shimadzu, Japonsko) s kolonou Eclipse Plus C18, Ø 2,1 x 50 mm
(Agilent Technologies, USA)

Iontový scintilační detektor Beckman LS 6500 (Beckman Coulter, USA)

Inkubátor

Preparativní HPLC Waters 1525 s detektorem UV/VIS Waters 2487 (Waters, USA)
a kolonou XBridge Prep C18, Ø 10 x 100 mm (Waters, USA)

Filtrační kolonky (10 kDa filtr)

Centrifuge Tube Filters, 0.22 µm Pore CA Membrane, Nonsterile (Corning, USA)

Vymrazovací koncentrátor SpeedVac SPD III (THERMO Electron Corporation, USA)

Automatické pipety

Spektrofotometr

Centrifuga

Nízkotlaký kapalinový chromatograf Bio-Logic LP (Bio-Rad, USA) s kolonou Octyl
Sephrose 4 Fast Flow

pH metr

2.1.4 Příprava pufrů a ostatních roztoků

Extrakční pufr A

0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH = 7,3); 0,5 mmol.l⁻¹ Na₂EDTA; 20% Glycerol;
5,0 mmol.l⁻¹ DTT; 0,3 % Triton X-100 a 1,33 ml.l⁻¹ Inhibitor proteas cocktail.

Pufr B

0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH = 7,3); 0,5 mmol.l⁻¹ Na₂EDTA; 20% Glycerol;
5,0 mmol.l⁻¹ DTT a 20% (NH₄)₂SO₄.

Pufr C

0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH = 7,3); 0,5 mmol.l⁻¹ Na₂EDTA; 5,0 mmol.l⁻¹ DTT.

Reakční pufr

0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH = 8,0).

Mobilní fáze pro HPLC

566 ul HCOOH (100%) do cca 500 ml destilované H₂O. Titrace roztokem NH₃ (26%)
na pH = 4,0. Doplnit do 1 litru destilovanou vodou.

2.2 Metodika

2.2.1 Částečná izolace enzymu produkujícího neznámý produkt z fazolových lusků

Vzorek fazolových lusků zmražených na -70°C o hmotnosti 258 g byl homogenizován v mixéru s extrakčním pufrem A (složení viz chemikálie) v poměru 1:1,4 (m:V). Extrakce byla prováděna po dobu 60 minut za občasné homogenizace směsi pomocí dispergátoru při 4°C . Následovala centrifugace po dobu 20 minut při 9 600 g, supernatant byl oddělen a precipitát byl rozsuspendován ve stejném objemu extrakčního pufru A a identickým postupem byla provedena druhá extrakce.

Po spojení supernatantů z obou extrakcí bylo provedeno vysolení na 20% pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (114g na 1 litr extraktu) s následnou centrifugací při 9 600 g. Supernatant byl zbaven tuhých částic a následně podroben nízkotlaké chromatografii na koloně Octyl-Sepharose 4FF, která byla nejprve promyta 500 ml pufru B a následně na ní byl nanesen plný objem vzorku. Kolona byla dále promyta asi 200 ml roztoku 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v pufru B a z kolony byla získávána frakce 1.

Postupně byly z kolony získány další 3 frakce, kdy byla kolona promývána postupně cca 200-250 ml 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v pufru B (frakce 2), samotným pufrem B bez $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (frakce 3) a nakonec pouze destilovanou vodou (frakce 4). Celkem byly získány 4 frakce, u kterých byly následně nastaveny enzymové reakce. Postup nastavení je uveden v podkapitole 2.2.2. Celá procedura byla prováděná při teplotě 4°C .

Frakce 2 a 3 byly následně zahušťovány na filtračních kolonkách s filtrem na 10 kDa na objem cca 10 ml.

2.2.2 Nastavení enzymových reakcí

Pro činnost enzymu produkující neznámý produkt byla použita reakční směs o složení:

- K-fosfátový pufr o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (pH = 8,0)
- rostlinný extrakt
- roztok NADP^+ o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$
- roztok *trans*-zeatinu o koncentraci 10 mmol.l^{-1}

Roztok *trans*-zeatinu je zde používán jako substrát pro enzymovou reakci. Standardní nastavení pro enzymové reakce bylo 68,6 μl pufru; 20 μl roztoku tZ; 1,4 μl roztoku NADP^+ a 20 μl rostlinného extraktu. Finální koncentrace jednotlivých komponent byla

1,27 mmol.l⁻¹ NADP⁺ a 1,82 mmol.l⁻¹ tZ. Případné modifikace ve složení reakční směsi jsou uvedeny u výsledků jednotlivých experimentů. Standardní objem celé reakční směsi je 110 µl. Reakční směsi byly inkubovány v mikrozkuvkách o objemu 1,5 ml při 28°C po dobu 24 hodin.

2.2.3 Postup zpracování vzorků pro HPLC-UV/VIS a následná analýza

Enzymová reakce byla zastavena přidavkem 100% ethanolu ve dvojnásobném objemu pro vysrážení proteinů. Vzorky byly centrifugovány 5 minut při 14 000 g s následným oddělením supernatantu a převedením do mobilní fáze HPLC, kdy byl k supernatantu přidán roztok mravenčanu amonného o koncentraci 15 mmol.l⁻¹ a pH = 4,0 v poměru 1:5,7 vzhledem k objemovému množství supernatantu. Následovala filtrace do mikrozkuvek o objemu 1,5 ml, přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm a po přenesení filtrátu do vialek následovala analýza na HPLC v methanolovém gradientu s nástřikem vzorku o objemu 20 µl. Mobilní fáze zde byla tvořena 100% MeOH (složka A) a roztokem mravenčanu amonného o koncentraci 15 mmol.l⁻¹ (složka B). Analýza probíhala v rostoucím methanolovém gradientu (Tab. 2) s teplotou pece 40°C.

Tabulka 2: Složení mobilní fáze v průběhu analýzy systémem HPLC-UV/VIS.

Čas	Složka A [%]	Složka B [%]
0	5	95
7	5	95
22	25	75
47	80	20
50	100	0
53	100	0
56	5	95
65	5	95

Proces trval 65 minut a byl sledován na detektoru UV/VIS, kdy sledované vlnové délky byly 268 nm a 300 nm.

2.2.4 Analýza enzymových reakcí s radioaktivně značeným substrátem

Příslušné vzorky byly standardním způsobem analyzovány dle podkapitoly 2.2.3 a frakcionovány na 4 minutové a 1 minutové frakce (od 20 do 24 minuty dle retenčního času) na HPLC. Objem 100 µl z každé frakce byl následně smíchán s 2 ml scintilačního koktejlu a měřen na iontovém scintilačním detektoru. Získaná data byla analyzována ve srovnání s výstupem UV-VIS detektoru HPLC.

2.2.5 Příprava vzorků listů různých druhů a odrůd fazolí a hrachu a vzorků kukuřice v různém stádiu vývoje

Vzorky zamražené na -70°C byly rozdrčeny za pomoci třecí misky s tloučkem a kapalného dusíku, přemístěny do vhodných nádob a následně podrobeny extrakci pomocí pufru A v poměru 1:2 (m:V). Celý proces extrakce byl prováděn za chlazení ledem. Po následné centrifugaci při 14 000 g po dobu 20 minut byly nastaveny enzymatické reakce dle podkapitoly 2.2.2.

2.2.6 Lowryho metoda stanovení koncentrace proteinů

Stanovení bylo prováděno na základě srovnání s albuminem jako standardem, kdy 200 µl vhodně naředěného vzorku nebo standardu bylo smícháno s 1 ml roztoku Modified Lowry Protein Assay Reagent. Roztok byl ponechán 10 minut v klidu a následně k němu bylo přidáno 100 µl roztoku 2N Folin-Ciocalteu Phenol Reagent zředěného vodou v poměru 1:1. Po 30 minutové inkubaci v temnu byly vzorky analyzovány na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm.

2.3 Výsledky a diskuze

2.3.1 Stanovení neznámého produktu v různých druzích a odrůdách fazolí a hrachu

Vzorky byly zpracovány dle postupu, který je uveden v podkapitole 2.2.5 a byly u nich nastaveny reakce, podle postupu z podkapitoly 2.2.2, za předpokladu, že reakční směs obsahovala 74,6 μl reakčního pufru; 10,0 μl rostlinného extraktu; 1,4 μl roztoku NADP^+ s finální koncentrací 1,273 mmol.l^{-1} ; 20,0 μl roztoku tZ s finální koncentrací 1,820 mmol.l^{-1} a 4,0 μl roztoku DTT s finální koncentrací 7,273 mmol.l^{-1} . U zbytkového množství extraktu bylo provedeno stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou dle podkapitoly 2.2.6.

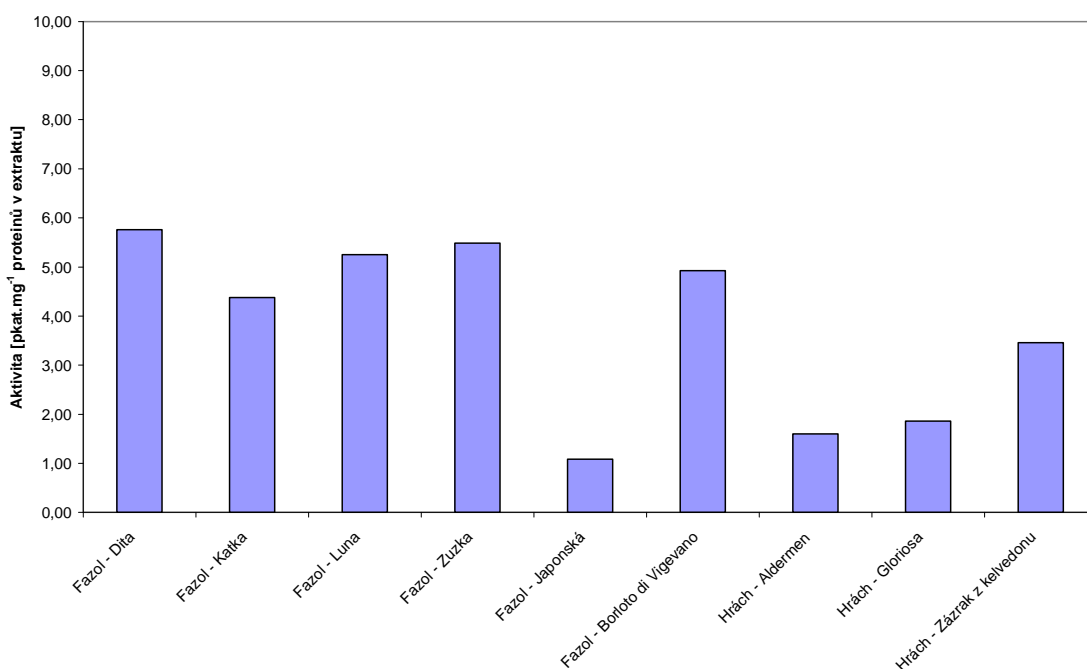
Po 24 h byla probíhající reakce zastavena a dle návodu z oddílu 2.2.3, byly vzorky analyzovány na HPLC-UV/VIS. Získaná data jsou shrnuta do Tab. 3.

Tabulka 3: Koncentrace tZ a neznámého produktu, specifická enzymová aktivita a koncentrace proteinů jednotlivých vzorků listů fazolí a hrachu stanovené Lowryho metodou.

Vzorek	Odrůda	tZ [mmol.l^{-1}]	Neznámý produkt [mmol.l^{-1}]	Specifická enzymová aktivita [pkat.mg^{-1}]	C_{proteinu} [mg.ml^{-1}]
Fazol keříčkový	Dita	0,932	1,108	5,763	12,239
	Katka	0,930	0,907	4,376	13,198
	Luna	1,045	0,851	5,252	10,311
	Zuzka	1,066	1,117	5,486	12,962
	Japonská	1,734	0,416	1,084	24,416
Fazol Popínavý	Borloto di Vigevano	0,547	1,283	4,922	16,594
Hrách setý	Alderman	2,270	0,302	1,600	12,012
	Gloriosa	2,371	0,330	1,862	11,267
	Zázrak z kelvedonu	2,059	0,806	3,460	14,822

Ze získaných dat je patrné, že aktivita vedoucí ke vzniku neznámého produktu je přítomná jak v listech hrachu, tak i v listech fazolí. S přihlédnutím k době průběhu enzymatické reakce, nejvyšší konverzi vykazovaly listy fazolí ve srovnání s listy hrachu, kdy vzhledem k odrůdě fazole nejmenší konverze byla nalezena u listů Fazole keříčkové „Japonské“, u které je aktivita ve srovnání s ostatními vzorky fazolí 4-5x menší. Hodnoty koncentrací izolovaných proteinů se pohybují mezi 10-16 mg.ml⁻¹, kdy výjimku tvoří pouze Fazole keříčková „Japonsko“, u které je tato hodnota téměř dvojnásobná ve srovnání s ostatními vzorky. Pro větší přehlednost jsou údaje z Tab. 3 zahrnuty do grafu (Obr. 10).

Získané výsledky tedy ukazují na druhovou diferenciaci v přítomnosti enzymu konvertujícího tZ na neznámý produkt. Ve zkoumaných vzorcích byla také nalezena přítomnost cZ a DHZ, ovšem jejich hladiny ukazují více na jejich endogenní přítomnost v původním extraktu, než na proběhnutí příslušných enzymatických reakcí v průběhu experimentu.



Obrázek 10: Grafické znázornění specifické enzymové aktivity enzymu konvertujícího tZ na neznámý produkt u jednotlivých vzorků listů fazole a hrachu.

2.3.2 Analýza vzorků kukuřice v různém stádiu vývoje na přítomnost neznámého produktu

Vzorky byly zpracovány na základě postupu uvedeném v podkapitole 2.2.5. Reakce byly nastaveny podle postupu v podkapitole 2.2.2 a analyzovány podle návodu v podkapitole 2.2.3. U enzymatických reakcí byla použita standardní reakční směs a reakce byla analyzována po 24 hodinách.

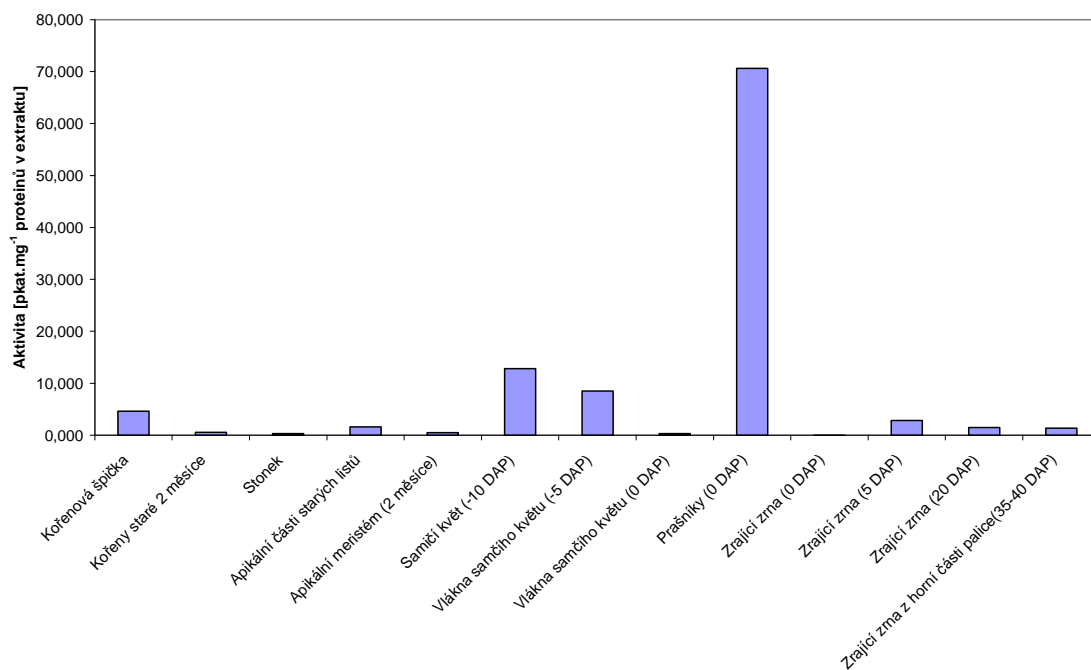
U zbytkového množství extraktu bylo provedeno stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou dle podkapitoly 2.2.6. Data získaná z HPLC-UV/VIS a Lowryho metody jsou uvedena v Tab. 4.

Tabulka 4: Koncentrace tZ a neznámého produktu, specifická enzymová aktivita a koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích kukuřice v různém stádiu vývoje. DAP, dnů po opylení; ND, nedetekováno.

Vzorek	tZ [mmol.l ⁻¹]	Neznámý produkt [mmol.l ⁻¹]	Specifická enzymová aktivita [pkat.mg ⁻¹]	C _{proteinu} [mg.ml ⁻¹]
Kořenová špička	9,138	0,108	4,595	1,500
Kořeny staré 2 měsíce	8,138	0,118	0,567	13,290
Stonek	10,375	0,068	0,328	13,140
Apikální části starých listů	12,143	0,127	1,617	5,000
Apikální meristém (staré 2 měsíce)	9,872	ND	ND	0,580
Samičí květ (-10 DAP)	7,741	0,181	12,829	0,900
Vlákna samčího květu (-5 DAP)	9,585	0,257	8,510	1,920
Vlákna samčího květu (0 DAP)	9,935	ND	ND	1,010
Prašníky (0 DAP)	7,110	0,666	70,637	0,600
Zrající zrna (0 DAP)	10,055	ND	ND	8,460
Zrající zrna (5 DAP)	11,777	0,130	2,833	2,920
Zrající zrna (20 DAP)	9,874	0,377	1,500	15,980
Zrající zrna z horní části palice (35-40 DAP)	7,973	0,215	1,352	10,130

Podle získaných údajů je patrný výskyt zkoumané enzymatické reakce téměř ve všech vzorcích s výjimkou apikálního meristému, zrajících zrn (0 DAP) a vláken samčího květu (0 DAP). Nejvíce překvapivý je výskyt neznámého produktu v prašnicích, kde se vyskytuje v největší míře. Pro větší přehlednost byly údaje o aktivitě enzymu převedeny do grafu (Obr. 11).

Ve vzorcích byly také měřeny koncentrace tZ. Navzdory skutečnosti, že v reakční směsi měla být výchozí koncentrace tZ $1,82 \text{ mmol.l}^{-1}$, změřené hodnoty v mnoha případech tuto hladinu dalece přesahovaly. Tuto skutečnost lze zdůvodnit kombinací endogenního výskytu a nesprávně zvoleného ředění vzorku pro stanovení tZ vzhledem k tomu, že maximální koncentrace u kalibrační řady pro tZ v reakční směsi byla $2,00 \text{ mmol.l}^{-1}$.



Obrázek 11: Grafické znázornění specifických enzymových aktivit u jednotlivých vzorků kukuřice v různém stádiu vývoje.

2.3.3 Stanovení distribuce radioaktivity v rostlinných extraktech po enzymatické reakci s radioaktivně značeným tZ [^3H]

Se vzorky uvedenými v Tab. 5 byly nastaveny standardní reakce dle postupu uvedeném v podkapitole 2.2.2, ke kterým bylo navíc přidáno 5 μl radioaktivně značeného tZ s finální koncentrací 2,091 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. K některým reakcím bylo také přidáno 4,0 μl roztoku DTT s finální koncentrací 7,273 mmol.l^{-1} , nebo byla provedena záměna NADP^+ za NADPH (Tab. 5). U radioaktivně značeného tZ byly tritiem nahrazeny všechny vodíkové atomy na purinovém skeletu.

Analýzy byly prováděny dle postupu, který je uveden v podkapitole 2.2.4. Z datových výstupů z UV-VIS detektoru a iontového scintilačního detektoru byl pro každý vzorek sestrojen graf (Obr. 12-18). Jednotlivé reakční podmínky společně s výsledky, které vyplývají z jednotlivých grafických vyhodnocení, jsou uvedeny v Tab. 5.

Tabulka 5: Zobrazení výsledků vyplývajících z analýzy radioaktivity ve spojení s UV/VIS detektorem v závislosti na druhu vzorku a reakčních podmínkách. tZ, *trans*-zeatin; cZ, *cis*-zeatin; tZ-9G, *trans*-zeatin N⁹-glukosid; DHZ-9G, dihydrozeatin N⁹-glukosid.

Číslo vzorku	Vzorek	Reakční podmínky	Primární produkty konverze tZ
1	Obilky – kukuřice (10 DAP)	NADP^+	tZ-9G; cZ
2	Obilky – kukuřice (10 DAP)	NADPH, DTT	tZ-9G; DHZ-9G
3	Květ - kukuřice	NADP^+	tZ-9G; cZ
4	Květ - kukuřice	NADPH, DTT	DHZ-9G
5	Hrách – nadzemní část	NADP^+	DHZ-9G; cZ
6	Hrách – nadzemní část	NADPH, DTT	DHZ-9G
7	Kontrola - Hrách – nadzemní část	NADPH, DTT	-

Na základě dat uvedených v tabulce je patrné, že u vzorků s NADPH se vyskytuje jako jeden z primárních produktů DHZ-9G, což naznačuje výskyt zeatin N-glukosyl transferasy, která ovšem prekurzor DHZ-9G, kterým je DHZ musí někde získávat. Jelikož docházelo k distribuci radioaktivity právě do těchto sloučenin, lze si tento jev

vysvětlit tak, že značený tZ byl zeatin reduktasou konvertován na DHZ, který byl následně okamžitě převáděn na DHZ-9G zeatin N-glukosyl transferasou.

Anomálie, která se v tomto ohledu vyskytuje u hrachu, kdy reakce probíhá i v přítomnosti NADP⁺, může být vysvětlena zbytkovou existencí enzymového kofaktoru v reakční směsi.

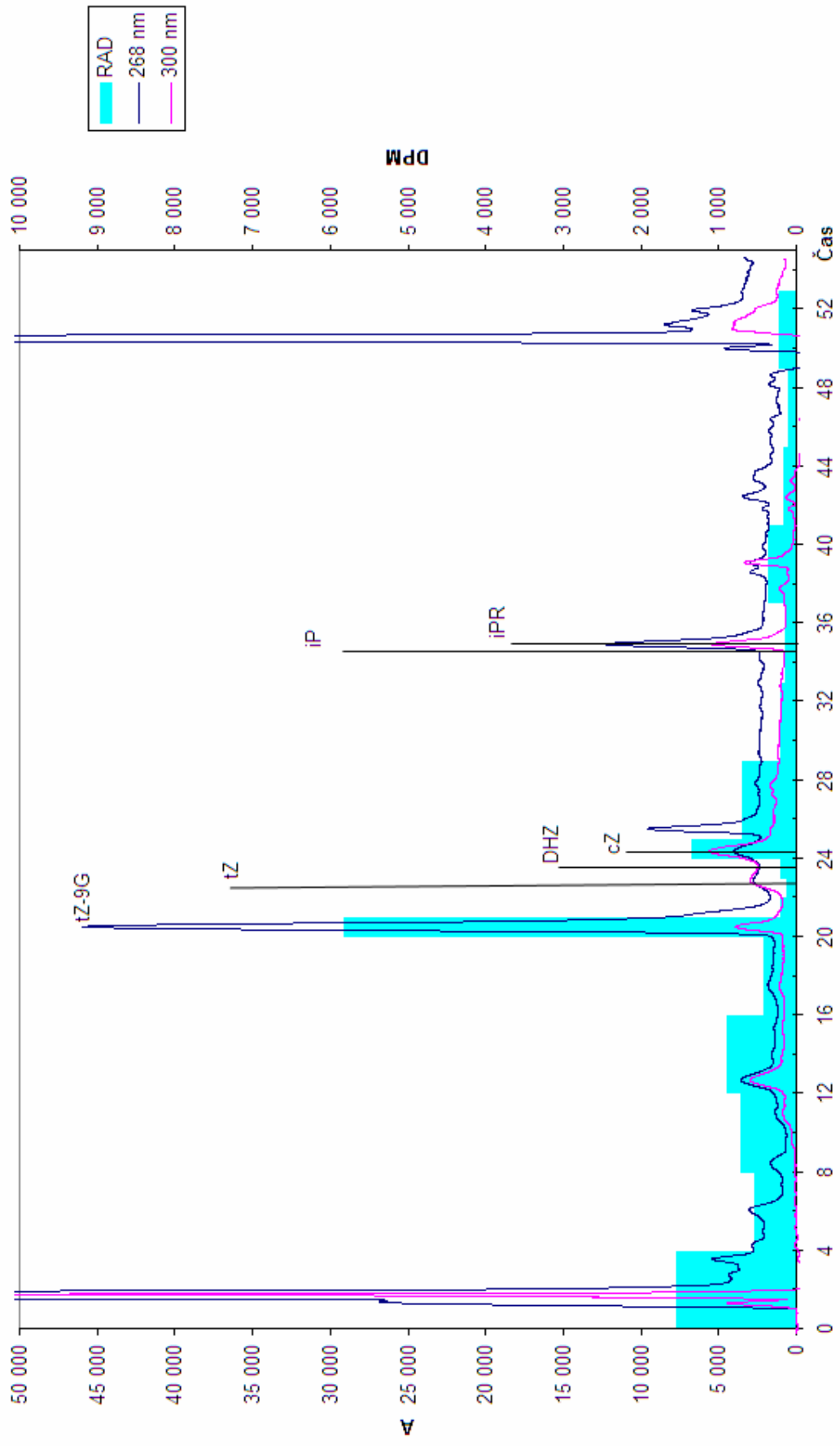
V mnoha vzorcích se vyskytuje rovněž také tZ-9G což je vzhledem k výskytu DHZ-9G očekávané. Ovšem vzhledem k tomu, že tyto dva možné produkty mají své retenční časy od sebe vzdálené méně než jednu minutu, pak také nelze s jistotou říci, do kterého z nich přešla majoritní část radioaktivity, vzhledem k tomu, že radioaktivita byla v dané oblasti měřena v 1 minutových frakcích.

U třech vzorků byl patrný výskyt cis-zeatinu, který ovšem vznikal v mnohem menší míře. U většiny vzorků lze rovněž předpokládat degradaci vzniklých tZ metabolitů na adenin, ovšem vzhledem k retenčnímu času adeninu (3,731 minut) nelze toto tvrzení potvrdit ani vyvrátit, jelikož není možné uspokojivě rozlišit, zda radioaktivita dané frakce pochází z adeninu nebo z nečistot vyplavených z kolony.

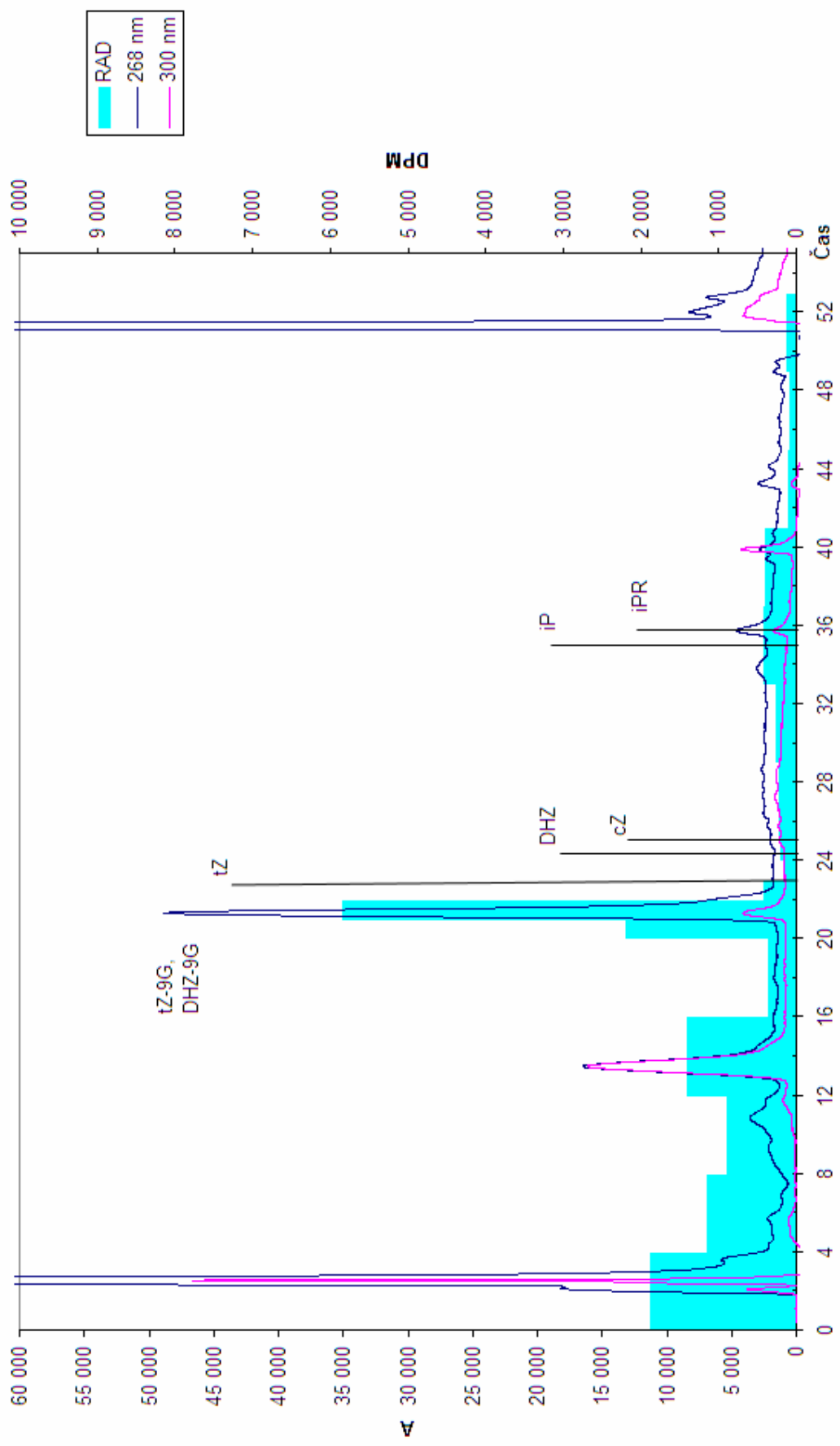
U vzorku číslo 6 (Tab. 5; Obr. 17) lze pozorovat distribuci radioaktivity do píků s retenčním časem v rozmezí 28–34 minut. Tuto skutečnost lze vyložit jako možnou konverzi radioaktivně značeného tZ na neznámé látky, nebo nedokonalé rozdělení vzorku na analytické koloně. Pro potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy je ovšem třeba provést opakování experimentu.

Z hlediska vzniku neznámého produktu, kterým se tato práce zabývá, lze říci, že ve zkoumaných vzorcích se tento metabolit vyskytoval ve velmi malém až nedetekovatelném množství a tudíž ho ve zkoumaných vzorcích nelze zařadit mezi majoritní metabolity.

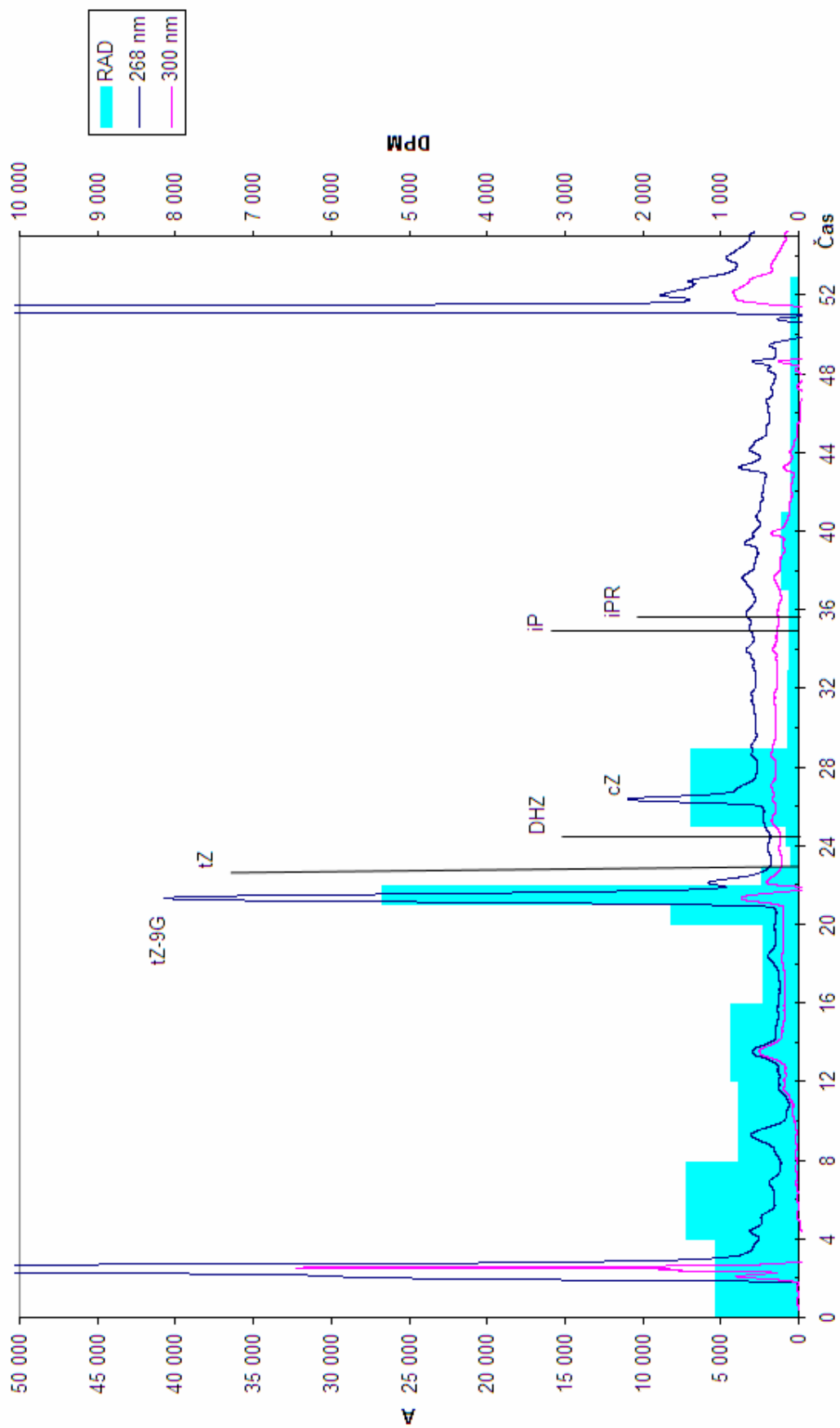
Pomocí kontroly zde bylo rovněž ověřeno, že nedochází ke vzniku artefaktů, jelikož pokud byla reakční směs vystavena varu, který denaturoval enzymy, majoritní složka analýzy byla tZ.



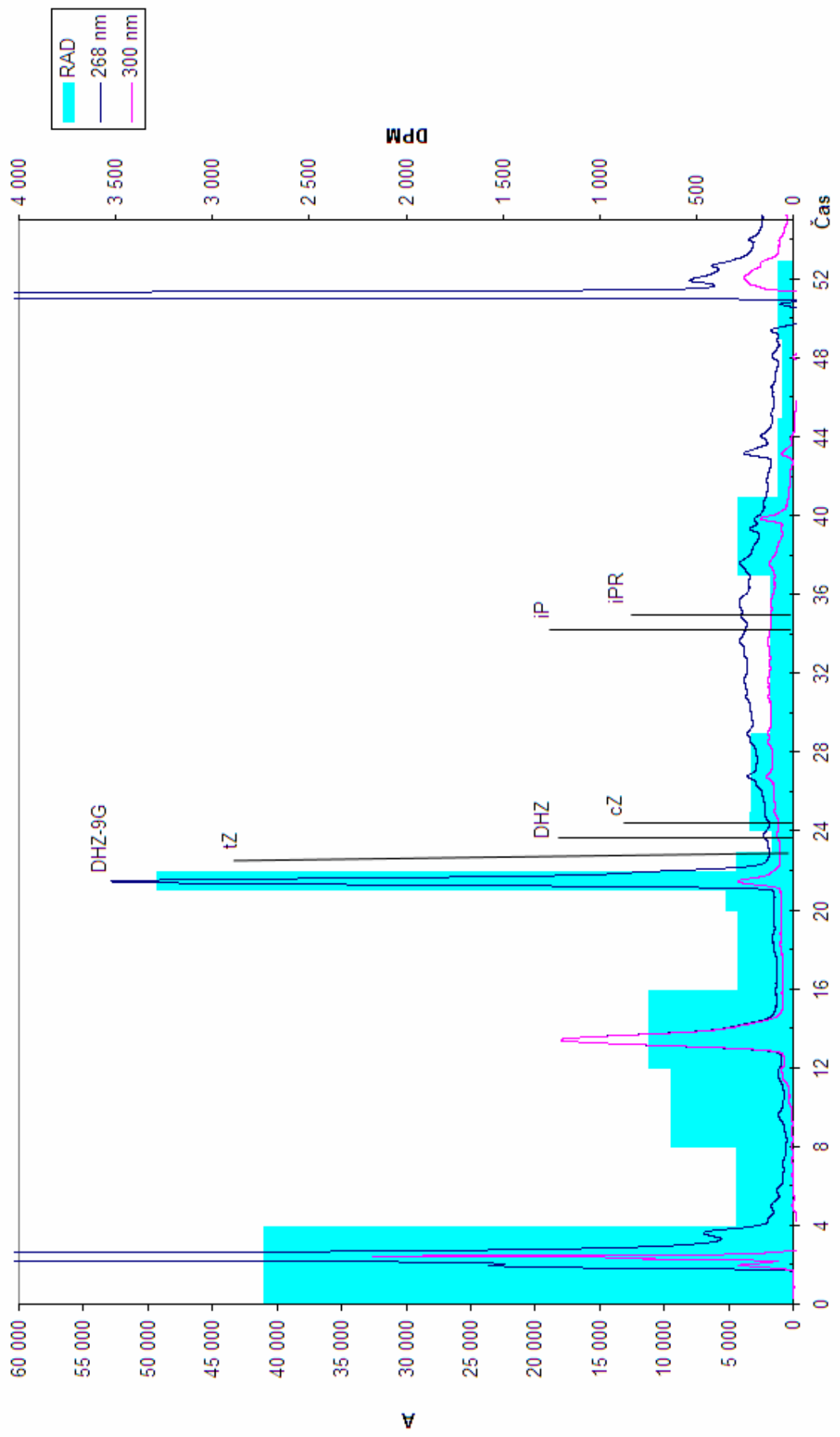
Obrázek 12: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 1, obilky kukuřice (10 DAP) s NADP⁺.



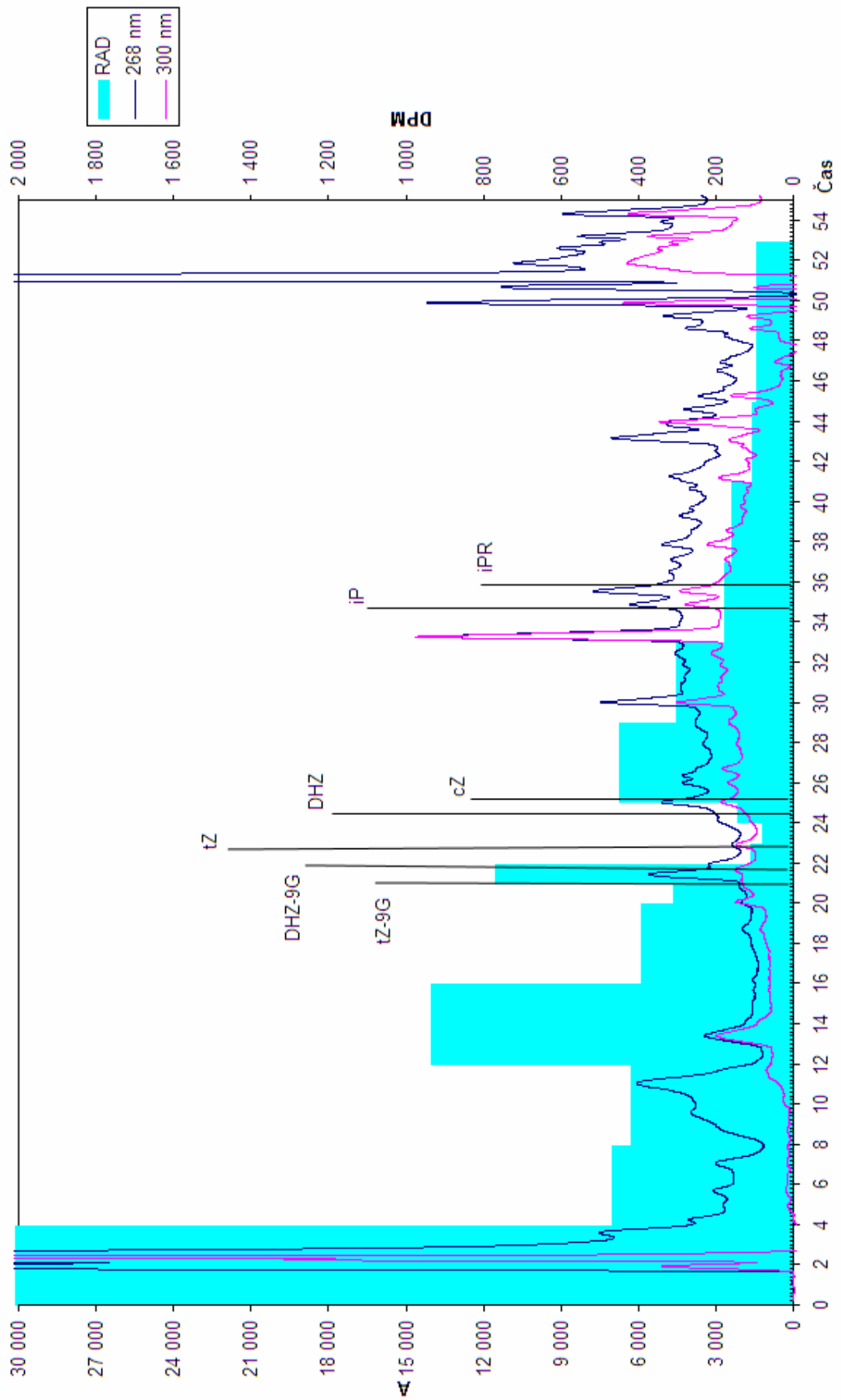
Obrázek 13: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 2, obilky kukuřice (10 DAP) s NADPH a DTT.



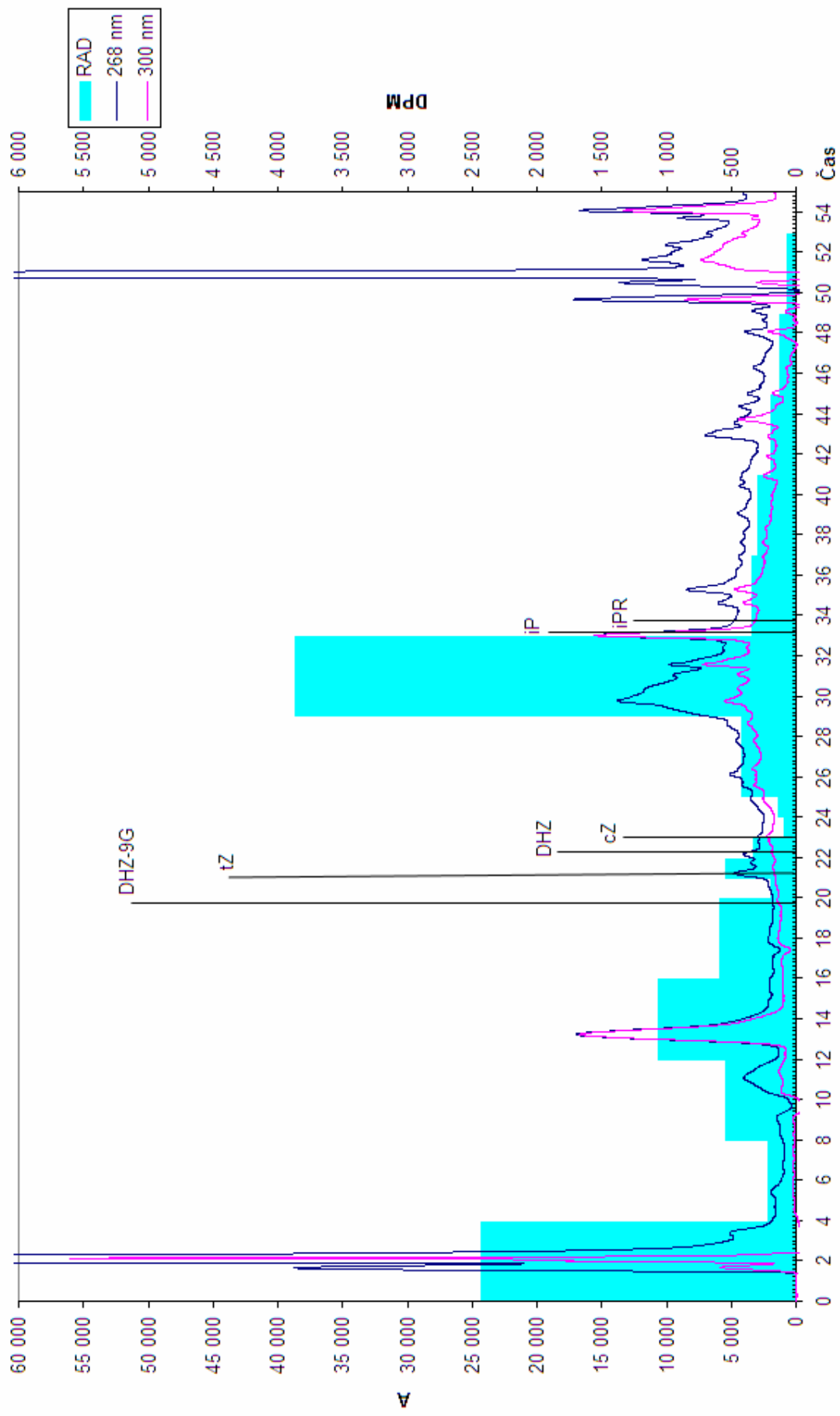
Obrázek 14: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 3, květ kukuřice s NADP*.



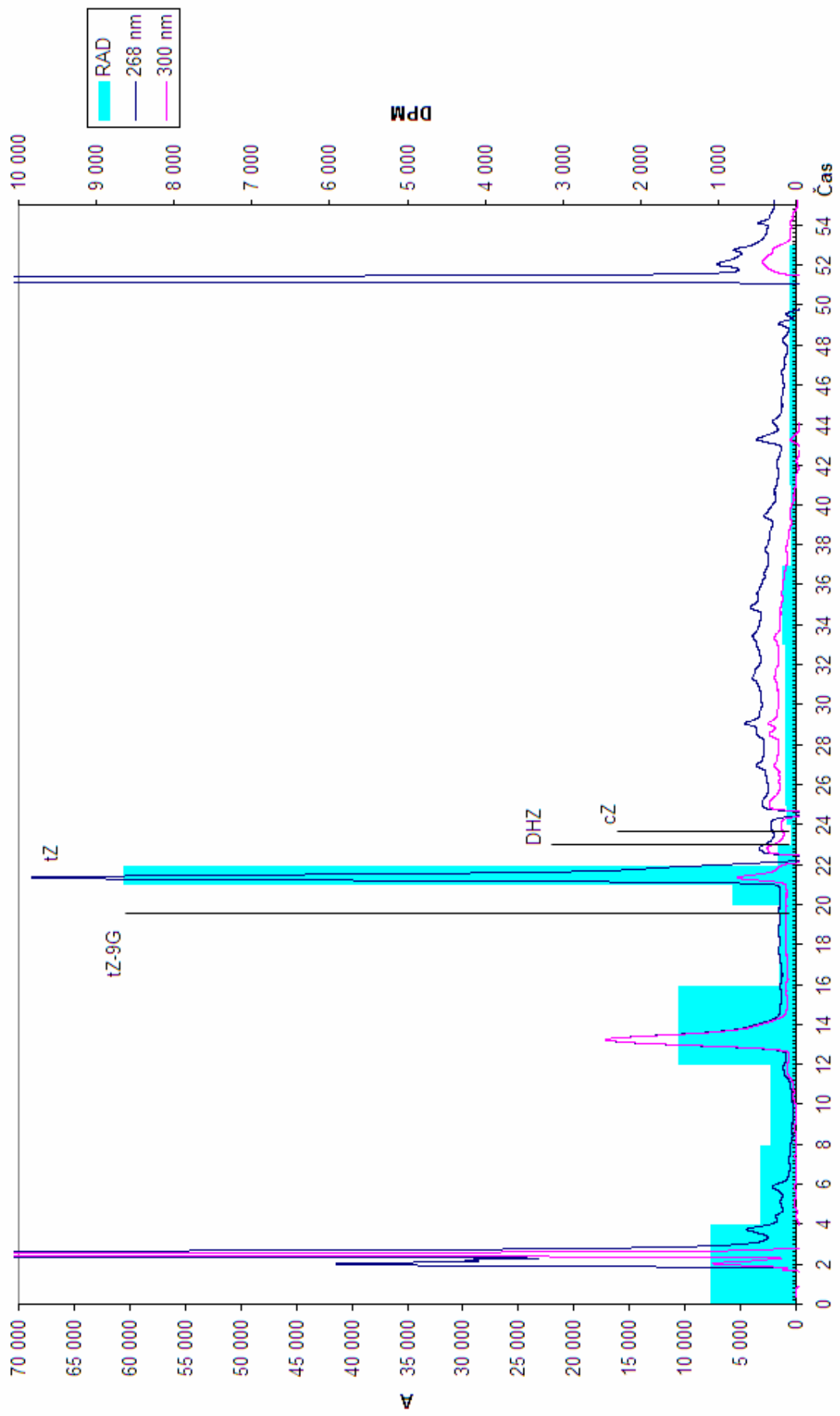
Obrázek 15: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 4, květ kukuřice s NADPH a DTT.



Obrázek 16: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 5, nadzemní část hrachu s NADP*.



Obrázek 17: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 6, nadzemní část hrachu s NADPH a DTT.



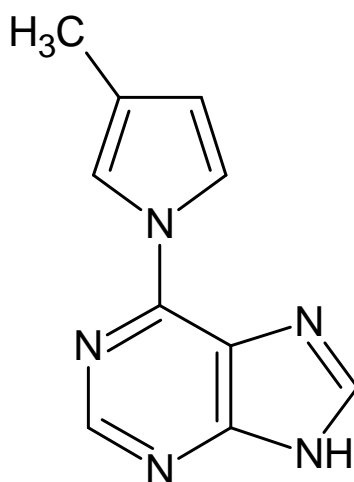
Obrázek 18: Grafické vyhodnocení analýzy radioaktivity - vzorek 7, nadzemní část hrachu s NADPH a DTT po průchodu extraktu varem.

2.3.4 Izolace a analýza NMR pro stanovení chemické struktury neznámého produktu

Enzymový extrakt, byl připraven a zpracován dle postupu uvedeném v podkapitole 2.2.1 a následně byl nanesen na nízkotlakou chromatografickou kolonu (Octyl-Sepharose 4FF), kde byl frakcionován postupným snižováním koncentrace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v promývacím roztoku (podkapitola 2.2.1).

Frakce 2 a 3 byly následně zahušťovány na kolonkách s filtrem 10 kDa a pro ověření byly nastaveny enzymatické reakce dle podkapitoly 2.2.2. Získané výsledky ukázaly 26x vyšší enzymovou aktivitu ve frakci 2 ve srovnání s frakcí 3.

S frakcí 2 bylo dle postupu uvedeném v podkapitole 2.2.2 nastaveno cca 350 enzymatických reakcí. Po 24 hodinách byly reakce zastaveny přidavkem 100% ethanolu ve dvojnásobném nadbytku s následnou centrifugací po dobu 5 minut při 14 000 g. Veškeré supernatanty byly spojeny a postupně nanášeny na preparativní HPLC analytickou kolonu s nástřikem 500 μl . Kolona pracovala v methanolovém gradientu a získané frakce obsahující neznámý produkt byly spojeny a následně zahuštěny pomocí vakuové odparky s následnou krystalizací neznámé látky. Hmotnost získaného krystalického produktu činila cca 7 mg.



Obrázek 19: Struktura neznámého produktu s chemickým názvem 6-(3-methylpyrrol-1-yl)purin.

Vzorek byl podroben analýze NMR na přístroji Bruker AVANCE III 600 MHz. Proces měření a vyhodnocení byl proveden Markem Kuzmou Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AVČR, který určil strukturu neznámého produktu (Obr. 19) a jehož chemický

název je 6-(3methylpyrrol-1-yl)purin. Zjištěním chemické struktury této sloučeniny byl zároveň splněn primární cíl této bakalářské práce. Tuto chemickou sloučeninu lze uměle nasyntetizovat na základě příslušného laboratorního postupu (Haidoune et al., 1990).

2.4 Závěr:

Bakalářská práce byla věnována získávání nových poznatků o cytokininovém metabolismu v zemědělských plodinách kukuřici, hrachu a fazoli.

Teoretická část této práce byla věnována vypracování literární rešerše, která v sobě v první části zahrnuje komplexní a stručný přehled historie objevu cytokininů, objasnění jejich struktury, signalizace a transportu v rostlinách. Další části práce se věnují přehlednému zobrazení metabolismu isoprenoidních cytokininů z hlediska jejich syntézy a degradace. Rovněž je blíže specifikován metabolismus cytokininů zeatinového typu, včetně stručné charakteristiky enzymů, které se na něm podílejí. Poslední kapitola teoretické části se snaží shrnout metody přístupu k analýze cytokininů a poukázat na výhody a nevýhody jednotlivých postupů.

Experimentální část práce byla sestavena ve snaze charakterizovat výskyt a chemickou strukturu neznámého produktu, který byl nalezen v rostlinných extraktech kukuřice a fazolí (Dr. Dana Tarkowská, Laboratoř růstových regulátorů PřF UP, nepublikovaná data). Praktická část se zabývá kvalitativním a kvantitativním srovnáním výskytu enzymové aktivity vedoucí ke vzniku neznámého metabolitu v listech fazolí a hrachu a rovněž mapuje jeho výskyt v jednotlivých časových intervalech růstu kukuřice. Výsledky naznačují, že aktivita vedoucí ke vzniku metabolitu se z kvantitativního hlediska vyskytuje více v listech fazolí oproti listům hrachu. U kukuřice se metabolit pravděpodobně vyskytuje v menší míře v celém spektru sledovaných částí rostlin s kvantitativní variabilitou. Vyjímkou jsou zrající zrna 0 dnů po opylení, apikální meristém a vlákna samčího květu 0 dnů po opylení, kde enzymová aktivita vedoucí k jeho vzniku nebyla detekována. Velmi znatelný výskyt byl ovšem nalezen v prašnicích.

Za pomocí analýzy NMR byla sestavena chemická struktura neznámého metabolitu jako derivátu adeninu s chemickým názvem 6-(3methylpyrrol-1-yl)purin. Ačkoliv je nyní známá jeho chemická struktura, jeho funkční zapojení v cytokininovém metabolismu zemědělských plodin je dosud stále neznámé a mělo by se stát předmětem dalšího výzkumu interakcí těchto rostlinných hormonů v zemědělských plodinách.

Seznam použité literatury

- Argueso C.T., Ferreira F.J., Kieber J.J. (2009) Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ.* **32**, 1147-1160.
- Armstrong D.J. (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, (D.W.S. Mok, M.C. Mok, ed.), pp. 139–154, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Armstrong D.J., Firtel R.A. (1989) Cytokinin oxidase activity in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **136**, 491–499.
- Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N-H., Sandberg G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14778-14783.
- Barciszewski J., Massino F., Clark B.F.C. (2007) Kinetin - A multiactive molecule. *Int. J. Biol. Macromol.* **40**, 182–192.
- Barciszewski J., Siboska G.E., Pedersen B.O., Clark B.F.C., Rattan S.I.S. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett.* **393**, 197-200.
- Bassil N.V., Mok D.W.S., Mok M.C. (1993) Partial purification of a cis- trans-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **102**, 867-872.
- Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**, 378–386.
- Bilyeu K.D., Laskey J.G., Morris R.O. (2003) Dynamics of expression and distribution of cytokinin oxidase/dehydrogenase in developing maize kernels. *Plant Growth Regul.* **39**, 195–203.

- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W.B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 13–26.
- Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W.B. (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol.* **148**, 1857–1867.
- Dobrev P., Motyka V., Gaudinová A., Malbeck J., Trávníčková A., Kamínek M., Vaňková R. (2002) Transient accumulation of *cis*- and *trans*-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 333–337.
- Emery R.J.N., Leport L., Barton J.E., Turner N.C., Atkins C.A. (1998) *Cis*-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiol.* **117**, 1515–1523.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**(8), 2431–2452.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121–130.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P.I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J. Exp. Bot.* **62**(8), 2827–2840.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001). Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *J. Biochem.* **268**, 450–461.

- Gan S., Amasino R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986–1988.
- Gaudinová A., Dobrev P.I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Friedecký D., Motyka V. (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in Pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Plant Growth Regul.* **24**, 188–200.
- Gerhäuser D., Bopp M. (1990). Cytokinin oxidases in mosses. 2. Metabolism of kinetin and benzyladenine *in vivo*. *J. Plant Physiol.* **135**, 714–718.
- Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W.B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291–300.
- Haidoune M., Mornet R., Laloue M. (1990) Synthesis of 6-(3-methylpyrrol-1-yl)-9- β -D-ribofuranosyl purine a novel metabolite of zeatin riboside. *Tetrahedron Lett.* **31**, 1419-1422.
- Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* **138**, 196–206.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75–83.
- Chen Chong-maw. (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiol. Plant.* **101**, 665–673.
- Chu H.-M., Ko T.-P., Wang A.H.-J. (2010) Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1738–1748.

- Izumi Y., Okazawa A., Bamba T., Kobayashi A., Fukusaki E. (2009) Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **648**, 215–225.
- Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* **116**, 233-239.
- Kamínek M. (1982) Mechanisms preventing the interference of tRNA cytokinins in hormonal regulation. In *Plant Growth Substances* (P.F. Wareing, ed.), pp. 215–224, Academic Press, New York, USA.
- Kamínek M., Armstrong D.J. (1990) Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. *Plant Physiol.* **93**, 1530–1538.
- Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H. (2009) Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* **50**(7), 1201–1214.
- MacLeod J. K., Summons R. E., Letham D. S. (1976) Mass-spectrometry of cytokinin metabolites - Per(trimethylsilyl) and permethyl derivatives of glucosides of zeatin and 6-benzylaminopurine. *J. Org. Chem.* **41**, 3959-3967.
- Martin R.C., Mok M.C., Shaw G., Mok D.W.S. (1989) An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiol.* **90**, 1630-1635.
- Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Saltz M.H.V., Strong F.M. (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**(7), 1375–1380.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP

- isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16598–16603.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **52**, 89-118.
- Nomura T., Tanaka Y., Abe H., Uchiyama M. (1977) Cytokinin activity of discadenine: a spore germination inhibitor of *Dictyostelium discoideum*. *Phytochemistry* **16**, 1819–1820.
- Prinsen E., Van Dongen W., Esmans E.L., Van Onckelen H.A. (1998) Micro and capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *J. Chromatogr. A* **826**, 25-37.
- Quesnelle P.E., Emery R.J.N. (2007) cis-Cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth in vitro. *Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot.* **85**, 91–103.
- Rubio V., Bustos R., Irigoyen M., Cardona-López X., Rojas-Triana M., Paz-Ares J. (2009) Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol.Biol.* **69**, 361-373.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, Biosynthesis and Translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431–449.
- Sakakibara H., Kudo T., Kiba T. (2010) Metabolism and Long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**(1), 53–60.
- Séguéla M., Briat J-F., Vert G., Curie C. (2008) Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J.* **55**, 289-300.
- Skoog F. Schmitz R.Y., Hecht S.M., Frye R.B. (1975) Anticytokinin activity of substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**(9), 3508-3512.

- Sondheimer E., Tzou D.-S. (1971) The metabolism of hormones during seed germination and dormancy II. The metabolism of 8-¹⁴C-zeatin in bean axes. *Plant Physiol.* **47**, 516–520.
- Suttle J.C., Banowitz G.M. (2000) Changes in cis-zeatin and cis-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiol. Plant.* **109**, 68–74.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866–41872.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* **45**, 1028–1036.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy* **98**, 834-841.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.
- Thomas T.H., Carroli J.E., Isenberg F.M.R., Pendergrass A., Howell L. (1975) A Simple, inexpensive, high pressure liquid chromatographic method for separating cytokinins in plant extracts. *Plant Physiol.* **56**, 410-414.
- To J.P., Kieber J.J. (2008) Cytokinin signaling: two-komponents and more. *Trends Plant Sci.* **13**, 85–92.
- Turner J.E., Mok D.W.S., Mok M.C., Shaw G. (1987) Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3714–3717.
- Veach Y. K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňkova R., Mok M.C. (2003) O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol.* **131**, 1374–1380.

Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10487–10492.

Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.

Yang Y.Y., Yamaguchi I., Kato Y., Weiler E.W., Murofushi N., Takahashi N. (1993) Qualitative and semiquantitative analyses of cytokinins using LC APCI-MS in combination with ELISA. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 21-25.