

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Screening methylovaných cytokininů v kultivačním  
médiu bakterie *Rhodococcus fascians* a rostlinách**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Štěpán Kouřil</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.</b>
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 1. 5. 2015

Děkuji svému školiteli Petru Tarkowskému za odborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a pozitivní přístup. Experimentální část práce byla realizována v Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (Centrální laboratoře a podpora výzkumu).

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Štěpán Kouřil
Název práce	Screening methylovaných cytokininů v kultivačním médiu bakterie <i>Rhodococcus fascians</i> a rostlinách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

### Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na methylované cytokininy v rostlinách a bakterii *Rhodococcus fascians*. Teoretická část je převážně věnována rostlinným hormonům cytokininům a bakterii *Rhodococcus fascians*. Dále jsou zmíněny methyltransferasy, jakožto enzymy katalyzující metylaci daného substrátu. Experimenty prokázaly, že SPE kolony MCX jsou vhodné pro purifikaci methylzeatinu (návrstnost 60 %) a dále, že imunoafinitní purifikace pomocí kolon NZRD obsahujících protilátky proti *o*-topolinu vhodná není (návrstnost menší než 10 %). Vyvinutá LC-MS metoda má srovnatelné analytické parametry jako dříve používaná metoda pro analýzu klasických cytokininů. Limit detekce je 0,3 fmoI a metoda je lineární minimálně v rozsahu 10 fmoI až 10 pmol. S využitím výše uvedených metod byl proveden screening methylovaných cytokininů v kultivačním médiu bakterie *Rhodococcus fascians*, huseníčku rolním, kukuřici seté, hrachu setém, tabáku virginském a širší kolekci sinic a řas. Screening odhalil možnou přítomnost 1'-methylzeatinu a methylisopentenyladeninu v rostlinných vzorcích. Musí být ovšem provedena řádná identifikace s použitím většího množství výchozího materiálu. V kultivačním médiu žádného z testovaných kmenů *Rhodococcus fascians* nebyl pozorován signál methylovaných cytokininů.

Klíčová slova	Cytokininy, methyltransferasy, <i>Rhodococcus fascians</i> , screening, rostliny, SPE, UHPLC-MS/MS
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Štěpán Kouřil
Title	Screening for methylated cytokinins in culture medium of bacterium <i>R. fascians</i> and plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2015

### Abstract

This bachelor thesis deals with methylated cytokinins in plants and bacterium *Rhodococcus fascians*. Theoretical part is mainly devoted to plant hormones cytokinins and bacterium *Rhodococcus fascians*. Methyltransferases as the enzymes catalyzing the methylation of the substrate are also described in this part. The experiments have shown that the SPE columns MCX are suitable for purification of mZ (recovery 60 %) but purification by immunoaffinity columns NZRD containing antibodies against *o*-topolin is not suitable (recovery less than 10%). The developed LC-MS method has comparable analytical parameters as previously used method for the analysis of classical cytokinins. The detection limit is 0,3 fmol and the method is linear in the range of at least from 10 fmol to 10 pmol. Using the methods mentioned above, methylated cytokinins secreted into the cultivation medium of bacterium *Rhodococcus fascians*, and tissues of *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Pisum sativum*, *Nicotiana tabacum* and wider collection of cyanobacteria and algae were screened. Screening for methylated cytokinins revealed the possible presence of 1'-methylzeatin and methylisopentenyladenin in the plant samples. However, proper identification must be performed with a larger amount of starting material. In culture medium of *R. fascians* (all strains) signals of methylated cytokinins were not detected.

Keywords	Cytokinins, methyltransferases, <i>Rhodococcus fascians</i> , screening, plants, SPE, UHPLC-MS/MS
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

## **Cíle práce**

1. Vypracování literární rešerše obsahující klíčová slova: cytokininy, *Rhodococcus fascians* a methyltransferasy.
2. Vývoj metody pro purifikaci a analýzu methylovaných cytokininů.
3. Screening methylovaných cytokininů v kultivačním médiu bakterie *Rhodococcus fascians* a vybraných rostlinách.

## Obsah:

1 ÚVOD .....	8
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	9
2.1 Rostlinné hormony .....	9
2.2 Cytokininy .....	11
2.2.1 Výskyt a biologická aktivita .....	11
2.2.2 Biosyntéza a metabolismus .....	14
2.2.3 Přenos cytokininového signálu .....	16
2.2.4 Metody chemické analýzy cytokininů .....	19
2.3 <i>Rhodococcus fascians</i> .....	20
2.3.1 Biosyntéza cytokininů v bakterii <i>Rhodococcus fascians</i> .....	22
2.4 Methyltransferasy .....	24
2.4.1 Methylace a rostlinné hormony .....	25
6 ZÁVĚR .....	53
7 LITERATURA .....	54
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	59

## 1 ÚVOD

Cytokininy, látky patřící do skupiny rostlinných hormonů, hrají spolu s auxiny důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Podílí se například na regulaci buněčného dělení, diferenciaci, ovlivňují apikální dominanci a opad listů. Dále byla prokázána funkce cytokininů v patogenezi bakterie *Rhodococcus fascians*, která využívá tyto fytohormony k narušení hormonální rovnováhy v rostlině. To následně vede k rozvoji infekce a dalších symptomů.

Od objevení prvního cytokininu již uběhla celá řada let, přesto zůstává ještě mnoho otázek nezodpovězených. Díky stále se zlepšujícím analytickým technikám, jako je například ultraúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí, máme nyní účinnější a efektivnější nástroje pro analýzu těchto látek, což nám otevírá nové možnosti a směry dalšího výzkumu.

V této bakalářské práci se zabývám extrakcí, purifikací a analýzou methylovaných cytokininů obsažených v rostlinném pletivu a kultivačním médiu bakterie *R. fascians*, o kterých toho zatím není mnoho známo. Hlavním cílem této práce je vyvinout metodu pro purifikaci a analýzu methylovaných cytokininů, v případě pozitivních výsledků poté stanovit obsah cytokininu methylzeatinu v rostlinném pletivu a kultivačním médiu bakterie *R. fascians*.



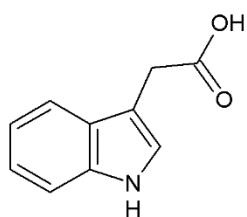
## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rostlinné hormony

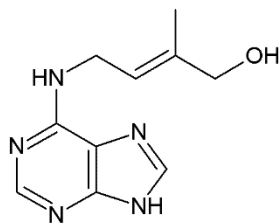
Stejně jako živočichové využívají hormony při regulaci metabolických procesů ve svém těle, tak i rostliny mají své hormony – tzv. fytohormony. I když funkce a základní principy působení živočišných a rostlinných hormonů jsou velice podobné (působí v nízkých koncentracích, každý hormon má svůj receptor, většinou organické nízkomolekulární látky, ovlivňují růst a vývoj), existuje také mnoho odlišností. Rostliny například nemají specializované orgány pro sekreci hormonů (endokrinní systém), fytohormony jsou méně specifické a působí s větší komplexitou. Rostlinné hormony jsou dále charakteristické kooperativním působením, častěji synergickým, popřípadě antagonistickým účinkem. Fytohormony mohou působit jak v místě, kde jsou syntetizovány, tak mohou být do místa působení transportovány.

V dnešní době známe velké množství rostlinných hormonů. Prvním objeveným a izolovaným rostlinným hormonem byla kyselina indolyl-3-octová (IAA, Kögl a Kostermans, 1934), které se říká také auxin a dala jméno celé skupině fytohormonů. Dále následoval objev giberelinů a cytokininů. První přirozený cytokinin zeatin byl nalezen až v druhé polovině 20. století v nezralém endospermu kukuřice (Letham, 1963). Zatím posledními nově identifikovanými fytohormony byly strigolaktony (Umehara *et al.*, 2008).

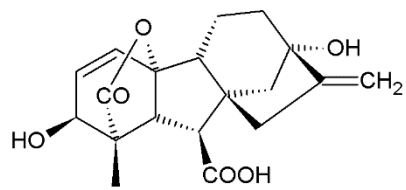
Na základě chemické struktury rozdělujeme rostlinné hormony do několika skupin: auxiny, cytokininy (CK), gibereliny, ethylen, kyselina abscisová, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a strigolaktony (Obr. 1) (Tarkowská *et al.*, 2014). Někteří autoři řadí mezi rostlinné hormony také látky s regulační aktivitou (např. polyaminy), ty by se ale do této skupiny řadit neměly, jelikož nesplňují některá kritéria pro zařazení mezi rostlinné hormony.



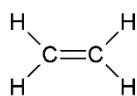
Kyselina indol-3-octová  
Auxin



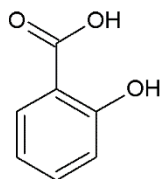
Zeatin  
Cytokinin



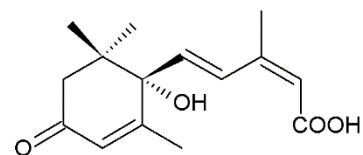
Kyselina gibberelová  
Giberelin



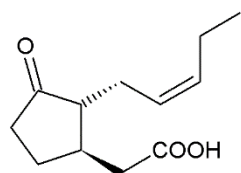
Ethylen



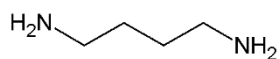
Kyselina salicylová



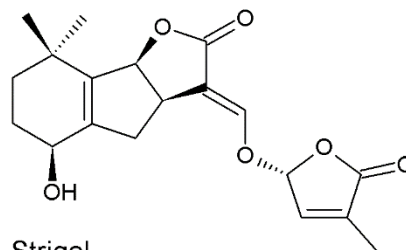
Kyselina abscisová



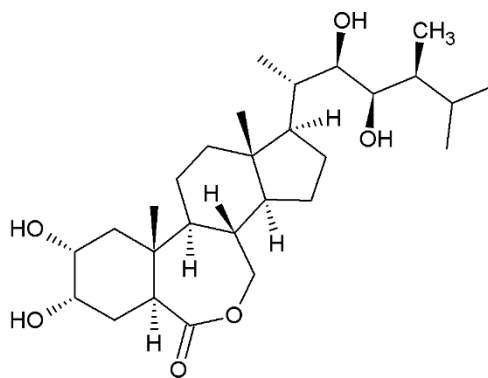
Kyselina jasmonová  
Jasmonát



Putrescin  
Polyamin



Strigol  
Strigolakton



Brassinolid  
Brassinosteroid

Obr. 1 Strukturální vzorce vybraných fytohormonů a látek s regulační aktivitou.

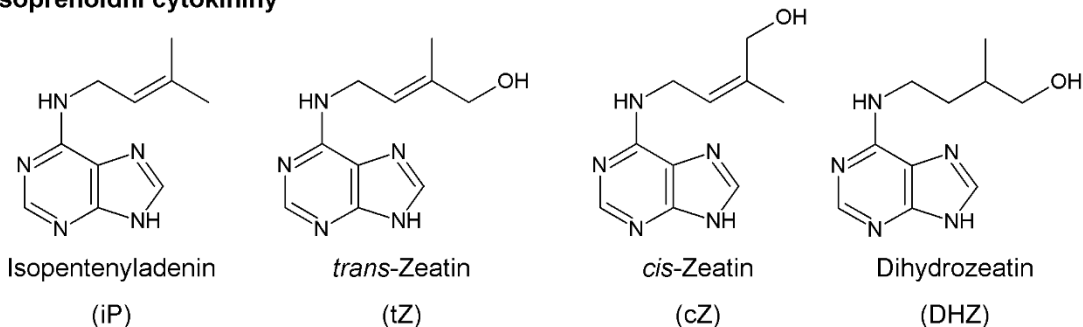
## 2.2 Cytokininy

Cytokininy patří spolu s auxiny mezi nejdůležitější rostlinné hormony, jelikož regulují řadu významných procesů v rostlině. Již od poloviny dvacátého století byla známa základní funkce CK – stimulace buněčného dělení, podle které získaly cytokininy také svůj název. Cytokininy byly definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu stimulují buněčné dělení. Od dob objevení kinetinu Millerem a Skoogem (Miller *et al.*, 1955) této definici vyhovovalo stále více látek. Dnes již mezi cytokininy řadíme jak přirozeně se vyskytující deriváty adeninu, tak synteticky připravené deriváty fenyльмоčoviny, ale také strukturně podobné sloučeniny, nehledě na to, jakou mají cytokininovou aktivitu (Frébort *et al.*, 2011).

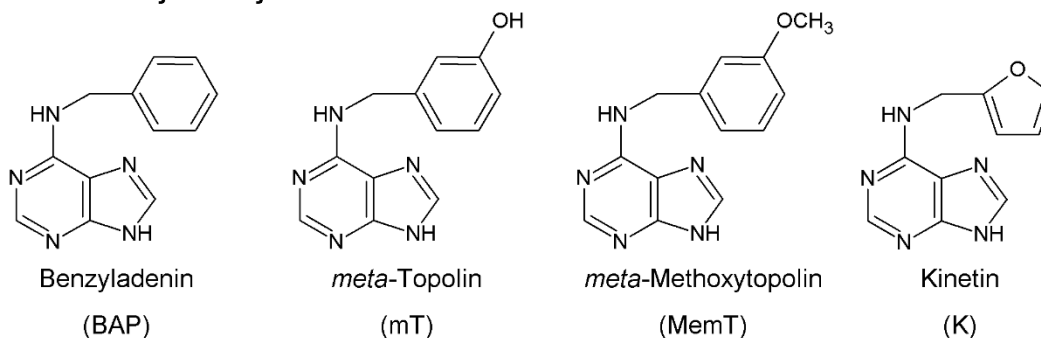
### 2.2.1 Výskyt a biologická aktivita

Přirozeně se vyskytující cytokininy řadíme mezi deriváty adeninu substituované v N<sup>6</sup> poloze. Ty můžeme rozdělit podle charakteru postranního řetězce na isoprenoidní a aromatické (Obr. 2). Isoprenoidní řetězec může být dále hydroxylován za tvorby *cis*-zeatinu (*cZ*) nebo *trans*-zeatinu (*tZ*), popřípadě může být dvojná vazba redukována za vzniku dihydrozeatinu. Hydroxylací benzenového jádra u aromatických derivátů získáme *ortho*, *meta* nebo *para* topolin. Hydroxylace může proběhnout také přímo na purinovém skeletu, nejčastěji v poloze 2. Další významnou skupinou přirozeně se vyskytujících CK jsou methyl-thio deriváty, které mají navázanou CH<sub>3</sub>-S- skupinu také na uhlíku číslo 2 (Tarkowski, 2011).

### Isoprenoidní cytokininy

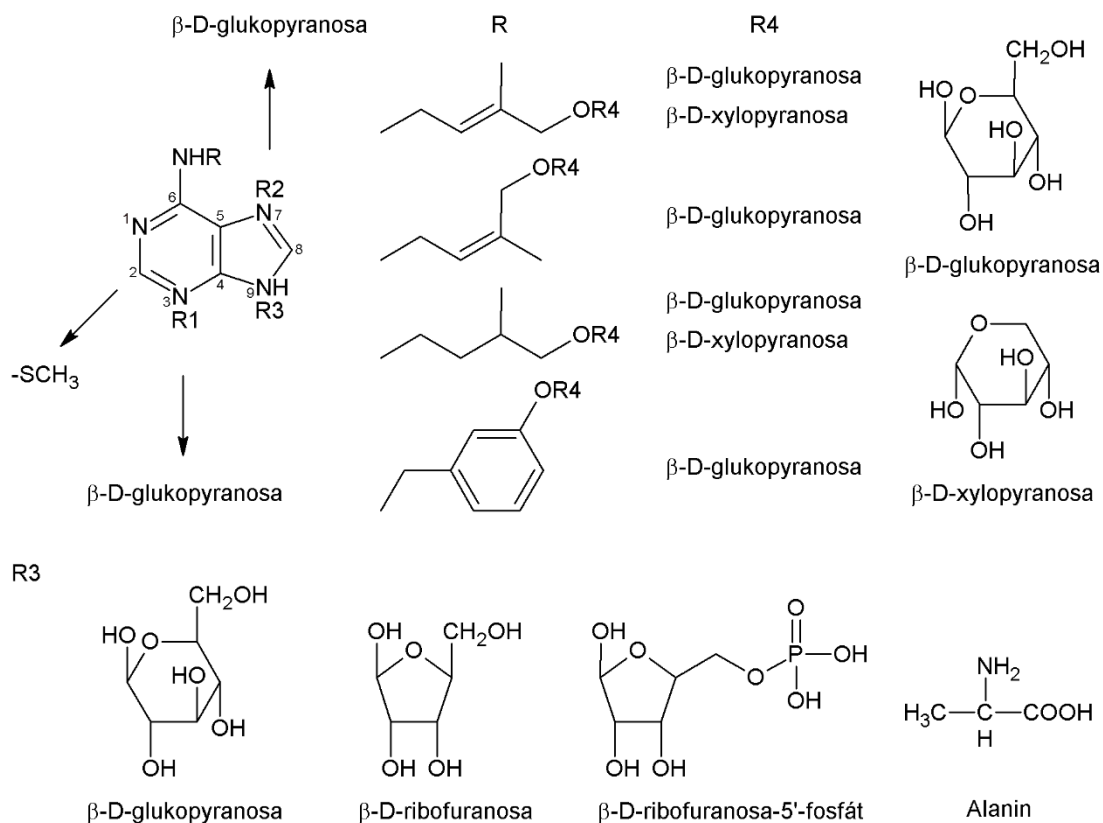


### Aromatické cytokininy



Obr. 2 Strukturální vzorce a názvy vybraných cytokininů (převzato z Frébortová, 2008).

Cytokininy se nevyskytují pouze jako volné báze, ale také jako nukleosidy, nukleotidy, popřípadě konjugáty s aminokyselinami (Obr. 3). Volné báze mají nejvyšší biologickou aktivitu a jsou považovány za hlavní aktivní formu cytokininů. Naproti tomu nukleotidy jsou považovány za produkty biosyntézy CK s malou biologickou aktivitou, ribosidy za transportní formy a glykosidy buď za dočasně, nebo trvale inaktivní formy CK (trvalá *N*-glykosylace v polohách 3, 7 nebo 9, dočasná *O*-glykosylace postranního řetězce) (Sakakibara, 2006). Zeatin může být také konjugován s alaninem v poloze 9 za tvorby kyseliny lupinové (Parker *et al.*, 1975; MacLeod *et al.*, 1975), stejně tak může dojít ke konjugaci alaninu s benzyladeninem (Letham *et al.*, 1979).



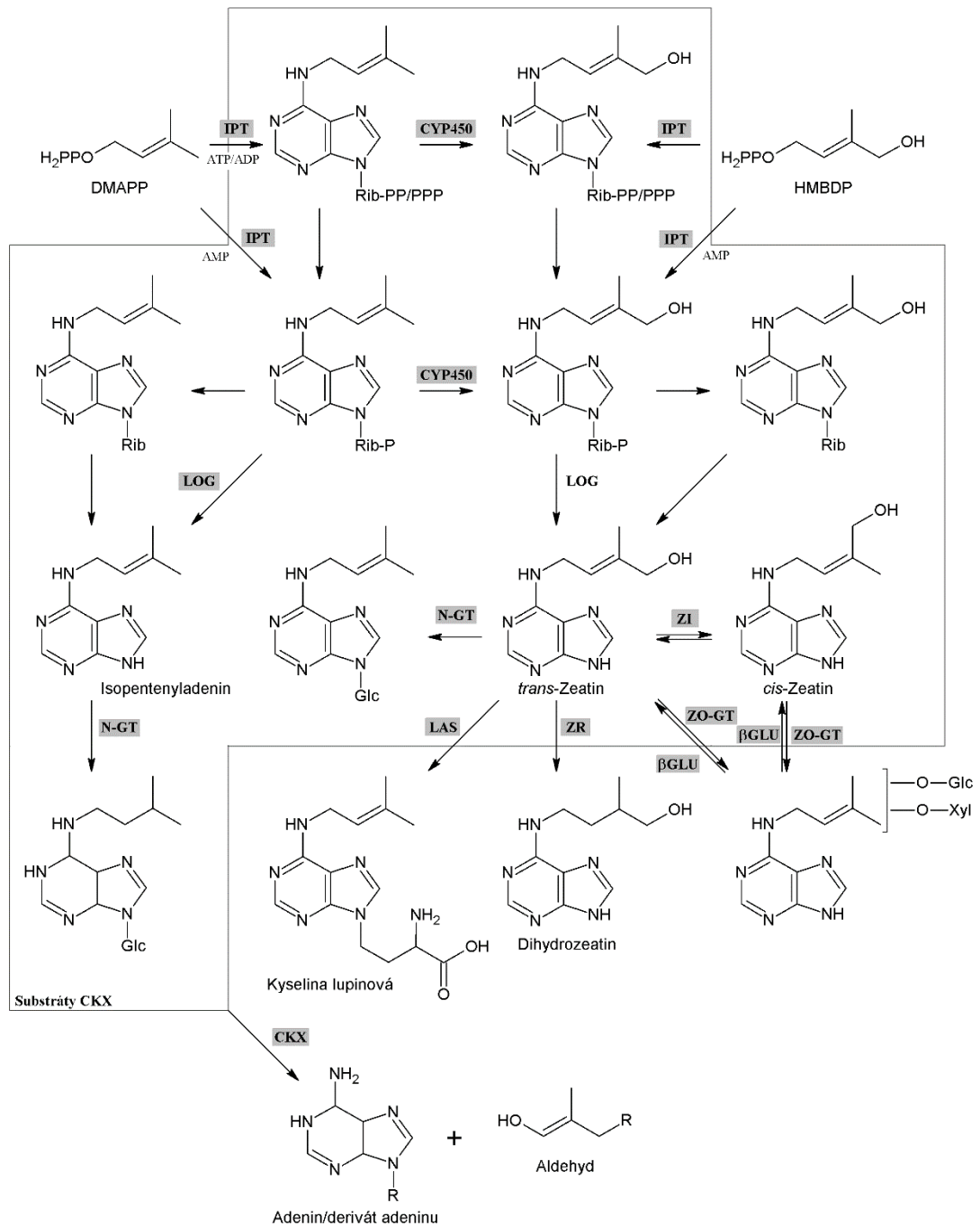
Obr. 3 Modifikace cytokininové molekuly (převzato z Frébortová, 2008).

CK se nevyskytují pouze u rostlin, ale také u organismů, které mají svůj životní cyklus úzce spjat s rostlinami, jako jsou například některé fytopatogenní bakterie nebo houby. Biosyntéza CK probíhá u vyšších rostlin, mechů, řas, bakterií, hub a dokonce u některého hmyzu parazitujícího na rostlinách (Romanov, 2009; Taiz a Zeiger, 2010).

### 2.2.2 Biosyntéza a metabolismus

Pro růst a vývoj rostliny je důležitá aktuální hladina aktivních forem cytokininů. Jejich obsah se liší v jednotlivých orgánech, pletivech, v průběhu buněčného cyklu a v průběhu vývoje rostliny. Je také ovlivňován řadou vnějších faktorů, jako je minerální výživa a stres. Hladina aktivních forem CK je prostorově a časově regulována pomocí biosyntézy, interkonverze, transportu, inaktivace a degradace (Kakimoto, 2003; Tarkowski, 2011).

Doposud známe dvě biosyntetické dráhy CK isoprenoidního typu (Obr. 4). Biosyntéza začíná přenosem isoprenoidního postranního řetězce na adenin ve formě nukleotidu nebo na adenin navázaný v tRNA. Tato reakce je katalyzovaná enzymem isopentenyltransferasou, popřípadě tRNA isopentenyltransferasou (IPT; EC 2.5.1.27; tRNA-IPT; EC 2.5.1.8; Sakakibara, 2006). Donorem isoprenoidního postranního řetězce je buď dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP; isopentenyladenin-dependentní dráha), nebo 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát (HMBDP; Krall *et al.*, 2002; isopentenyladenin-independentní dráha). V případě prenylace pomocí DMAPP může být vedlejší řetězec dále hydroxylován za katalýzy enzymu cytochrom P450 monooxygenasy (CYP450; EC 1.14.-.-.; Takei *et al.*, 2004). Nukleotidy lze následně převést na volné báze hydrolýzou pomocí enzymu cytokinin fosforibohydrolasy (LOG; EC 3.2.2.n1; Kurakawa *et al.*, 2007). Biosyntéza aromatických cytokininů nebyla doposud objasněna. Předpokládá se ale, že vychází z metabolismu fenolových sloučenin (Strnad, 1997).



Obr. 4 Klíčové enzymy metabolismu cytokininů (převzato z Frébort *et al.*, 2011). IPT – isopentenyltransferasa; CYP450 – cytochrom P450 monooxygenasa; LOG – cytokinin fosforibohydrolasa; N-GT – cytokinin *N*-glukosyltransferasa; βGLU – β-glukosidasa; CKX – cytokinindehydrogenasa; ZOGT – zeatin-*O*-glukosyltransferasa; ZI – zeatin *cis-trans* isomerasa; ZR – zeatinreduktasa; LAS – zeatin 9-aminokarboxyethyltransferasa.

Vzniklé cytokininy mohou být přeměňovány řadou enzymů (Obr. 4). Zeatin *cis-trans* isomerasa (Bassil *et al.*, 1993) katalyzuje přeměnu *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin. Existence tohoto enzymu není ovšem zcela prokázána a některé studie hovoří spíše proti, popřípadě se přiklání k jeho velice nízké aktivitě (Miyawaki *et al.*, 2006). Zeatinreduktasa (EC 1.3.1.69; Martin *et al.*, 1989) katalyzuje redukci zeatinu na dihydrozeatin, glykosylace je katalyzována enzymy *O*-glukosyltransferasou (EC 2.4.1.203; Martin *et al.*, 1999; EC 2.4.1.215; Veach *et al.*, 2003), *O*-xylosyltransferasou (EC 2.4.2.40 Turner *et al.*, 1987),  $\beta$ -glukosidasou (EC 3.2.1.21; Brzobohatý *et al.*, 1993) a cytokinin *N*-glukosyltransferasou (EC 2.4.1.118; Hou *et al.*, 2004). Konjugaci alaninu s *trans*-zeatinem katalyzuje enzym zeatin 9-aminokarboxyethyltransferasa (EC 2.5.1.50, Parker *et al.*, 1986) (Frébort *et al.*, 2011).

Degradace CK je katalyzovaná enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.12; Galuszka *et al.*, 2001). Jedná se o oxidativní štěpení N<sup>6</sup> postranního řetězce a tento proces je nevratný. Nukleotidy, *O*-glukosidy, dihydrozeatin a jeho konjugáty tomuto štěpení nepodléhají (Taiz a Zeiger, 2010).

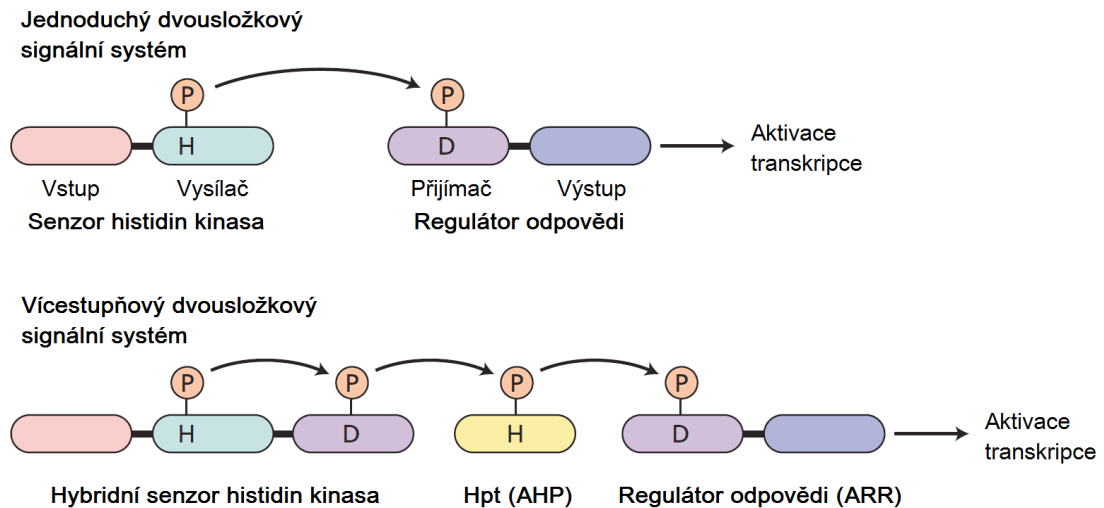
### 2.2.3 Přenos cytokininového signálu

V cytoplasmatické membráně rostlinné buňky se nachází transmembránové proteiny, které slouží jako receptory pro vazbu cytokininů. Doposud byly objeveny tři typy těchto receptorů – v roce 2001 receptor CRE1/AHK4 (cytokinin response 1/Arabidopsis histidine kinase; Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001), dále následovaly receptory AHK2 a AHK3 (Yamada *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2004). Jedná se o histidin kinasy, které jsou součástí dvousložkového signálního systému histidin-aspartyl fosfátové signální kaskády (Obr. 5).

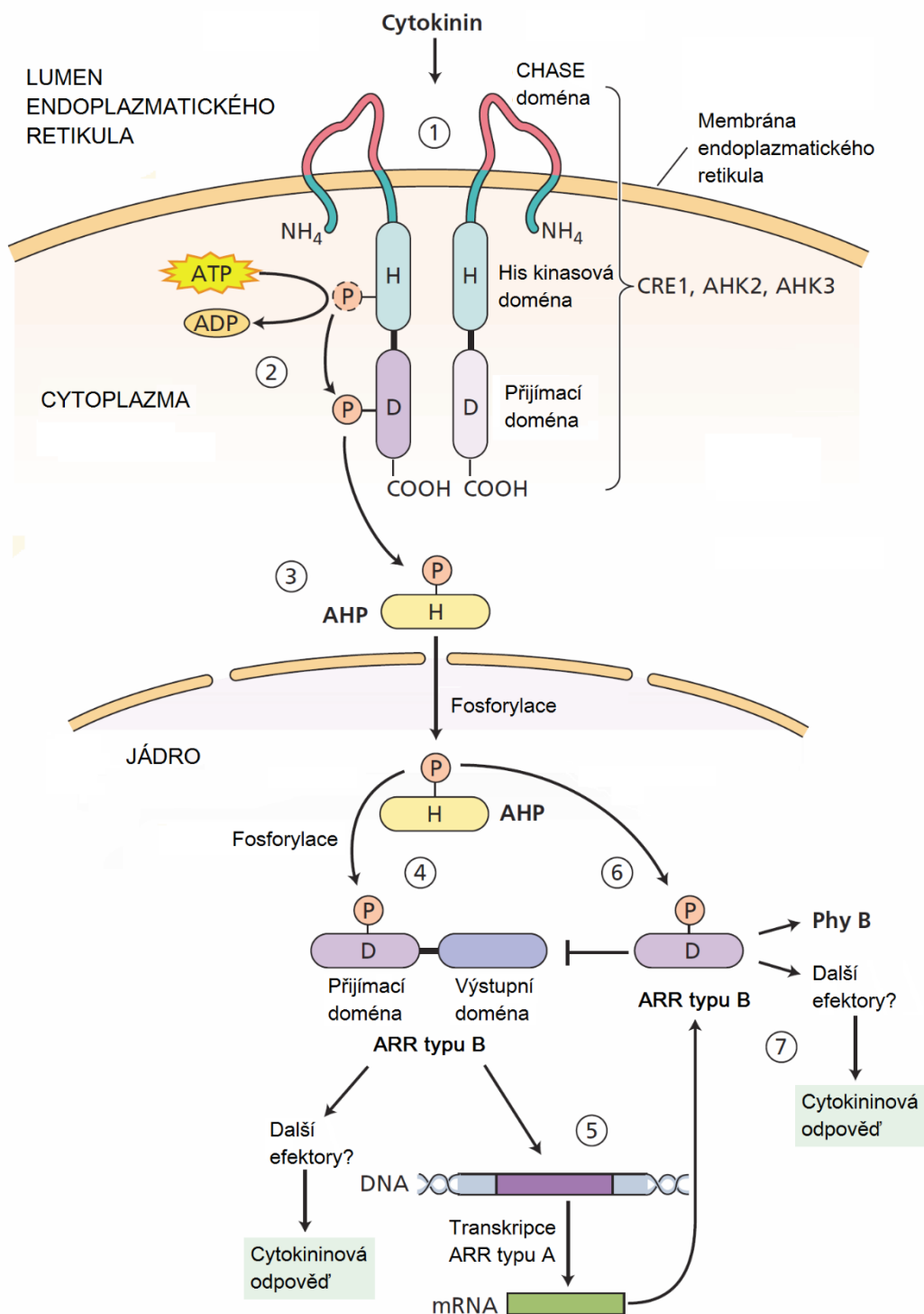
Rostlinný hormon je rozpoznán CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular) doménou lokalizovanou v blízkosti N-konce proteinu (Anantharaman a Aravind, 2001; Mougél a Zhulin, 2001), která je orientovaná směrem do lumen endoplazmatického retikula (Caesar *et al.*, 2011) (Obr. 6). Dochází k autofosforylaci histidinového zbytku histidin kinasové domény, orientované směrem do cytoplazmy, a následnému přenesení fosfátu na aspartátový zbytek intracelulární přijímací domény. Fosfát je poté přenesen na histidin-fosfotransferový protein (AHP;



Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer protein) a nakonec na regulátor odpovědi (ARR; Arabidopsis response regulator) typu B. Ten aktivuje expresi genů primární cytokininové odpovědi spolu s ARR typu A, který zpětně reguluje signalizaci cytokininů. Z AHP může být také fosfát přenesen přímo na ARR typu A, který posléze reguluje expresi dalších genů a aktivitu různých cílových proteinů (Taiz a Zeiger, 2010).



Obr. 5 Schéma jednoduchého a víceúrovňového dvousložkového signálního systému (převzato z Taiz a Zeiger, 2010). HPT – histidin-fosfotransferový protein – histidine phosphotransfer protein, AHP – histidin-fosfotransferový protein u *Arabidopsis* – Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer protein; ARR – regulátor odpovědi u *Arabidopsis* – Arabidopsis response regulator.



Obr. 6 Schéma signální dráhy cytokininů (převzato z Taiz a Zeiger, 2010). 1 – Vazba cytokininu na extracelulární CHASE doménu; 2 – Aktivace histidin kinasové aktivity a přenos fosfátu na aspartát přijímací domény; 3 – Přenos fosfátu na histidin-fosfotransferový protein (AHP); 4 – Fosforylace přijímací domény regulátoru odpovědi (ARR) typu B; 5 – Aktivace transkripce genů kódujících ARR typu A; 6 – Fosforylace ARR typu A; 7 – Exprese genů primární cytokininové odpovědi.

## 2.2.4 Metody chemické analýzy cytokininů

Cytokiny se stejně jako ostatní fytohormony vyskytují v rostlinách ve velmi nízkých koncentracích, obvykle řádově fmol-pmol·g<sup>-1</sup> čerstvé hmoty. Vzhledem k nízké koncentraci, přítomnosti sloučenin s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, odlišné polaritě a dalším faktorům je jejich analýza značně obtížná. Pro jejich stanovení jsou vyžadovány analytické metody, které jsou dostatečně citlivé a selektivní (Tarkowski *et al.*, 2004).

Prvním krokem analýzy endogenních CK, bez ohledu na metodu koncové analýzy, je extrakce CK z rostlinného materiálu a následná purifikace. Pro extrakci se nejčastěji používá methanol nebo modifikovaná vícesložková extrakční směs podle Bielského (methanol-kyselina mravenčí-voda; 15:1:4; Hoyerová *et al.*, 2006). Purifikace se běžně provádí pomocí extrakce na pevné fázi (SPE; solid phase extraction) s využitím různých sorbentů v závislosti na stanovovaném analytu (nepolární C18 sorbenty, iontoměniče, popřípadě směsné sorbenty). Náplňové kolony pro SPE mohou být nahrazeny křemennými kapilárami obsahujícími polymerní monolyty (PMME; polymer monolith microextraction, Zhang *et al.*, 2006), popřípadě může být sorbent umístěn přímo v pipetovací špičce (pipette tip SPE, tzv. StageTip, Svačinová *et al.*, 2012). Pokud je zapotřebí vyšší účinnost purifikace, využívá se metody imunoafinitní extrakce (IAE; immunoaffinity extraction), případně kombinace SPE a IAE (Podlešáková *et al.*, 2012; Tarkowski, 2011).

Nejpoužívanější techniky koncové analýzy fytohormonů jsou plynová a kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS; LC-MS), radioimunoanalýza (RIA) a enzymová imunoanalýza (ELISA). Hlavní nevýhodou plynové chromatografie je nutnost derivatizace, která u kapalinové chromatografie není nutná, a proto se vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), eventuálně ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) uplatňuje v dnešní době častěji. Pro separaci cytokininů je u kapalinové chromatografie nejvhodnější systém reverzních fází, kdy je jako stacionární fáze použit nepolární sorbent, například C18. Pro spojení s hmotnostní spektrometrií se nejhojněji využívá ionizace elektrosprejem (ESI), jako analyzátor pak trojitý kvadrupólový analyzátor. Mezi přednosti spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie patří vysoká separační účinnost LC a citlivost a selektivita MS detekce. Imunochemické metody využívají vazbu specifických protilátek a jsou vhodné pro stanovení distribuce CK na celulární

a subcelulární úrovni (Podlešáková *et al.*, 2012; Tarkowski *et al.*, 2009; Tarkowski, 2011).

### 2.3 *Rhodococcus fascians*

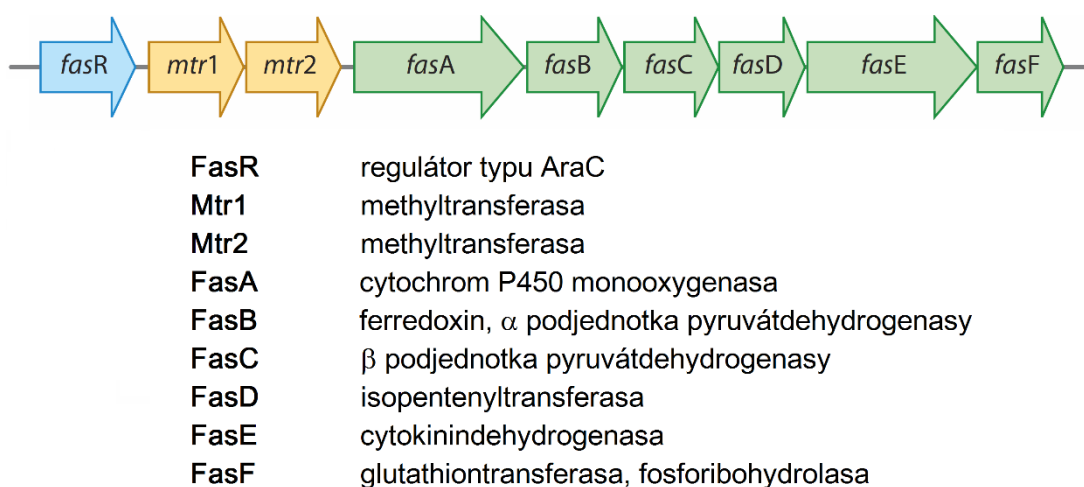
*Rhodococcus fascians* (RF) je aerobní, pleomorfní, nepohyblivá, nesporující, gram-positivní bakterie, která při růstu na agaru tvoří oranžové kolonie. Řadí se do kmene aktinobakterie (*actinobacteria*) a jako fytopatogen napadá jak dvouděložné, tak jednoděložné rostliny. Napadení rostliny RF vede k tvorbě nádorů na listech, takzvaných „leafy galls“ (proliferace buněk za vzniku nefunkčních výhonků v místě infekce) (Obr. 7). Dále může docházet k fasciaci, ztrátě apikální dominance a tím ke keřovitému vzhledu rostliny („witches’ broom“), vytváření malých a deformovaných listů, snížené produkci květů a zakrnělému růstu (Tarkowski a Vereecke, 2014; Depuydt *et al.*, 2008). Pro přetrvání symptomů je důležitá přítomnost bakterie (Vereecke *et al.*, 2000).



Obr. 7 Typické symptomy infekce bakterií *Rhodococcus fascians* (převzato z Putnam a Miller, 2007). A – „Leafy gall“ na listu krásnoočka (*Coreopsis*); B – proliferace stonku srdcovky (*Dicentra*); C – deformace listu paznehtníku měkkého (*Acanthus mollis*); D – fasciace lýkovce vonného (*Daphne odora*; bez přítomnosti RF).

Geny způsobující patogenitu virulentního kmene D188 se nacházejí na konjugativním lineárním plazmidu pFiD188 (plazmid indukující fasciaci; fasciation inducing plasmid; Francis *et al.*, 2007). Na plazmidu pFiD188 byly identifikovány tři lokusy *fas*, *att* a *hyp*, které jsou nezbytné pro interakci mezi rostlinou a patogenem. Nejlépe prozkoumaný a asi nejdůležitější lokus *fas* obsahuje operon šesti genů kódujících isopentenyltransferasu a další enzymy nezbytné pro produkci cytokininů (Obr. 8). Lokus *fas* také obsahuje regulační gen *fasR* a geny *mtr1* a *mtr2* kódující methyltransferasy. Zbylé dva lokusy na pFiD188 jsou zodpovědné za vyváženou virulenci (jejich mutace způsobily hypervirulenci nebo atenuaci virulence; Crespi *et al.*, 1992). Dále byl nalezen chromozomální lokus *vicA* nezbytný pro přežití bakterie v infikované rostlině, jelikož kóduje enzym pro odstraňování toxického glyoxylátu (Vereecke *et al.*, 2002).

Hlavním mechanismem patogenního účinku RF je produkce cytokininů a následné narušení rovnováhy rostlinných hormonů v rostlině. Virulentní kmen D188 produkuje šest různých synergicky působících CK (iP, tZ, cZ, 2MeSiP, 2MeStZ, 2MeScZ) důležitých pro virulenci. Zvýšená hladina CK vede k aktivování homeostatických mechanismů v rostlině (zastavení biosyntézy CK, exprese CKX genů; Depuydt *et al.*, 2008) a degradaci CK pomocí CKX. V huseníčku nejsou 2MeScZ a cZ dostatečně účinně odbourávány pomocí CKX, a proto dochází k jejich akumulaci v rostlinném pletivu. Tyto CK poté stimulují proliferaci a rozvoj dalších symptomů. (Pertry *et al.*, 2009).



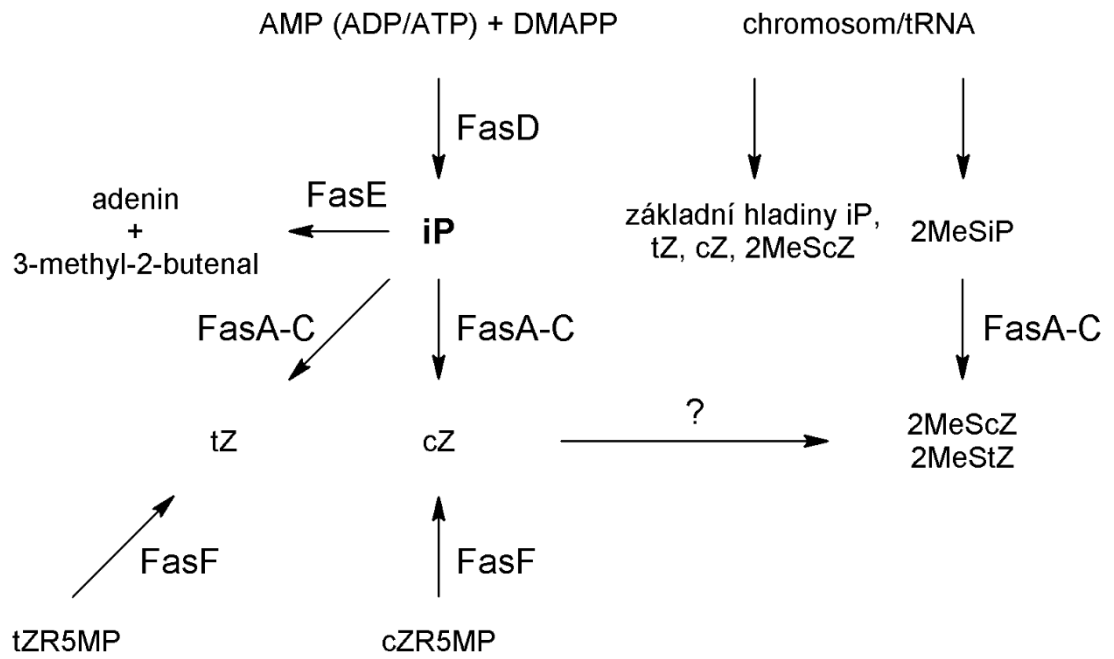
Obr. 8 Schéma lokusu *fas* a předpokládaných funkcí jednotlivých genů (převzato z Stes *et al.*, 2011). *Fas* operon je vyznačený zeleně.

Nezbytnost celého *fas* operonu pro patogenitu byla nedávno zpochybněna, stejně tak mechanismus působení směsi šesti cytokininů. Pomocí horizontálního transferu genů bylo zjištěno, že pro vyvolání infekce postačuje pouze syntéza isopentenyladeninu pomocí IPT a jeho aktivace enzymem fosforibohydrolasou. Isopentenyladenin se poté hromadí v pletivu a stimuluje proliferaci. Předpokládá se, že pro vyvolání infekce jsou dostačující pouze čtyři funkce zahrnující sekundární metabolismus (*att*), transkripci genů (*fasR*), biosyntézu cytokininů (*fasD*) a jejich aktivaci (*fasF*). Enzymatické funkce zbylých proteinů kódovaných *fas* operonem jsou zřejmě pro patogenitu postradatelné, ale mohou být využity pro účinnější biosyntézu a aktivaci CK (Creason *et al.*, 2014).

### 2.3.1 Biosyntéza cytokininů v bakterii *Rhodococcus fascians*

*Fas* operon obsahuje šest genů kódujících proteiny zapojené do biosyntézy CK. Jejich exprese je vyvolaná extrakty z infikovaného pletiva, nikoliv z neinfikované rostliny (Crespi *et al.*, 1992), je regulována jak na úrovni transkripce, tak translace a je závislá na podmínkách prostředí (pH, zdroje uhlíku a dusíku, obsah kyslíku a fosforu, hustota buňky) a na aktivitě regulačních proteinů. Na plazmidu pFiD188 byl objeven gen *fasR*, který reguluje expresi *fas* operonu a je nezbytný pro virulenci (Temmerman *et al.*, 2000).

Syntéza CK v bakterii *R. fascians* může probíhat dvěma způsoby. Degradací tRNA nebo *de novo* za katalýzy IPT a dalších enzymů (Obr. 9). Transferová RNA RF obsahuje řadu cytokininů (Matsasubara *et al.*, 1968) a je považována za jejich důležitý zdroj (nejspíše i hlavní zdroj cZ a 2MeScZ). Vyšší hladiny CK a zejména isopentenyladeninu jsou syntetizovány *de novo*. Klíčovým enzymem celé biosyntézy je isopentenyltransferasa (*fasD*) syntetizující iP, který je prekurzorem pro další cytokininy. *FasA* působí nejspíše jako cytochrom P450 monooxygenasa a hydroxyluje iP za tvorby tZ a cZ, dále také 2MeSiP za tvorby 2MeScZ a patrně i 2MeStZ. *FasB* a *fasC* jsou pravděpodobně pomocné proteiny a dodávají energii k hydroxylacím. Enzym *fasF* uvolňuje cytokininy z jejich nukleotidů za tvorby volných bází, tudíž působí jako fosforibohydrolasa. Funkcí *fasE*, cytokinin dehydrogenasy, je degradace CK a tento enzym má největší afinitu k CK iP typu (Pertry *et al.*, 2010).



Obr. 9 Model biosyntézy cytokininů prostřednictvím *fas* operonu (převzato z Pertry *et al.*, 2010).

## 2.4 Methyltransferasy

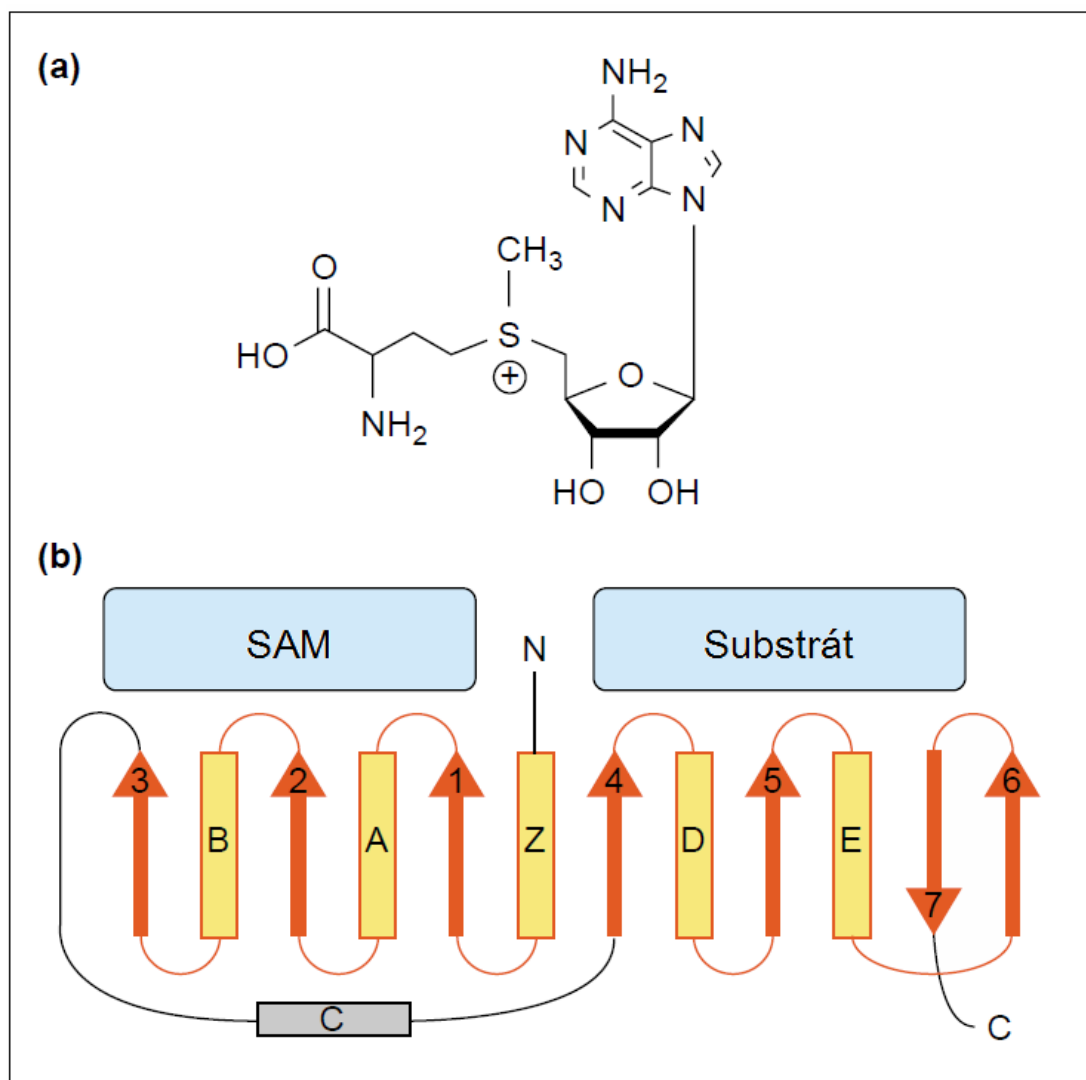
Transfer methylu na molekulu substrátu je katalyzován enzymy methyltransferasami (MTs, EC 2.1.1.-). Donorem methylové skupiny může být celá řada sloučenin (např. methanol, methyltetrahydrofolát, methylaminy, methylthiol, chlormethan), avšak nejčastějším donorem je *S*-adenosylmethionin (SAM; Cheng a Roberts, 2001) (Obr. 10). Methylace za účasti koenzymu SAM probíhá nejčastěji mechanismem nukleofilní substituce ( $S_N2$ ), kdy jako nukleofil působí atom síry, kyslíku, dusíku, popřípadě uhlíku, selenu, arsenu či halogenid (O'Hagan a Schmidberger, 2010; Schmidberger *et al.*, 2010), nicméně známy jsou i methyltransferasy využívající radikálový mechanismus (Zhang *et al.*, 2012).

Navázání methylové skupiny na molekulu biologicky aktivní látky, jako například hormonu, neurotransmiteru, lipidu, proteinu nebo nukleové kyseliny, způsobí změnu v jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, a proto patří k zásadním modifikacím těchto sloučenin. Methylace má velmi široké spektrum funkcí zahrnujících biosyntézu, metabolismus, detoxifikaci, transdukcii signálu, translokaci proteinů a procesování nukleových kyselin (Martin a McMillan, 2002).

První struktura SAM-dependentní methyltransferasy, HhaI DNA MT, byla určena v roce 1993 (Cheng *et al.*, 1993). Doposud je známo velké množství rozdílných SAM-dependentních methyltransferas, které řadíme do 5 tříd podle jejich strukturních rysů (Schubert *et al.*, 2003). Navzdory nízké podobnosti v aminokyselinové sekvenci mají methyltransferasy relativně vysokou strukturní podobnost. Nejhojněji zastoupená je třída první, která vykazuje motiv  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ , který se nazývá Rossmannův fold a tvoří vazebná místa pro nukleotidy (Rao a Rossmann, 1973) (Obr. 10).

Díky mnoha funkcím a velkému vlivu na vlastnosti substrátu jsou methyltransferasy v poslední době centrem zájmu nejen biomedicínského výzkumu. Jejich strukturní a funkční rozmanitost zapříčiňuje širokou možnost využití při biokatalytických methylacích pestré škály jak syntetických, tak přírodních látek, které mohou být dále použity jako léčiva, agrochemikálie, chemicky čisté látky či biopaliva (Nawabi *et al.*, 2011; Struck *et al.*, 2012). Dále se studuje jejich uplatnění při bioremediacích (LeDuc *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2006) a značení proteinů a nukleových kyselin (Klimašauskas a Weinhold, 2007).





Obr. 10 (a) – Strukturní vzorec *S*-adenosylmethioninu (SAM) (b) – Schématické znázornění Rossmannova foldu u první třídy methyltransferas (převzato z Martin a McMillan, 2002). Modře vyznačena vazebná místa pro SAM a substrát; žlutě  $\alpha$ -helixy, červeně  $\beta$ -skládané listy; šedě je vyznačený C  $\alpha$ -helix, který v jádře proteinu není vždy přítomen.

### 2.4.1 Methylace a rostlinné hormony

Methyltransferasy hrají důležitou roli v metabolismu a homeostáze celé řady rostlinných hormonů. Například methylací IAA vzniká methylester-IAA, který je nepolární a může být snáze transportován přes membránu. Díky tomu vykazuje vyšší aktivitu při biotestech a je využíván jako analog IAA. Navíc narušení exprese IAA karboxyl methyltransferasy vede k fenotypickým změnám dokazujícím roli této methyltransferasy při vývoji listů (Qui *et al.*, 2005; Bajzug a Piotrowska, 2009).

Karboxyl methyltransferasa kyseliny salicylové katalyzuje metylaci kyseliny salicylové za vzniku methyl-salicylátu, který je důležitou vonnou složkou v květinách. K jeho akumulaci dochází při poranění rostliny a díky vysoké těkavosti slouží jako vzduchem přenášený signál indukující obranné mechanismy v neporaněných místech a okolních rostlinách, kde je převáděn zpět na kyselinu salicylovou (Ross *et al.*, 1999; Shulaev *et al.*, 1997).

Dále byla prokázána klíčová role karboxyl methyltransferasy kyseliny jasmonové při reakcích rostlin regulovaných jasmonáty. Těkavý methyl-jasmonát může působit jako intra/intercelulární regulátor, popřípadě jako vzduchem přenášený signál zprostředkávající komunikaci mezi rostlinami (Seo *et al.*, 2001; Farmer a Ryan, 1990).

Význam methyltransferas pro metabolismus cytokininů nebyl ještě zcela objasněn, bylo však objeveno několik methylovaných cytokininů v různých organismech, například 1'-methylzeatin (Evidente *et al.*, 1986), 2-hydroxy-1'-methylzeatin a 2-hydroxy-6-methylaminopurin (Farooqui *et al.*, 1990). My se zajímáme o methylované CK, protože lokus *fas* bakterie *Rhodococcus fascians* obsahuje oblast kódující methyltransferasy (*mtr1* a *mtr2*) dosud neznámého významu. Navíc existuje domněnka, že tyto MTs mohou methylovat atom dusíku na molekule cytokininu, jelikož se vyskytují ve stejném klastru fylogenetického stromu jako N-methyltransferasy z kukuřice a huseníčku (Pertry, 2009).

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je věnována methylovaným cytokininům v kultivačním médiu bakterie *Rhodococcus fascians* a rostlinách. V teoretické části bylo pojednáno o rostlinných hormonech cytokininech, bakterii *Rhodococcus fascians* a enzimech methyltransferasách. V rámci experimentální části byla vyvinuta purifikační a LC-MS metoda pro analýzu methylovaných cytokininů v biologickém materiálu a dále byl proveden screening methylovaných cytokininů v kultivačním médiu bakterie *Rhodococcus fascians* a rostlinách.

V rámci screeningu bylo provedeno orientační stanovení obsahu 1'-methylzeatinu v rostlinném materiálu, přičemž koncentrace byla řádově desítky  $\text{fmol}\cdot\text{g}^{-1}$ . Přítomnost tohoto cytokininu bude ovšem nutné potvrdit změřením hmotnostního spektra nebo alespoň přidáním konfirmačních MRM přechodů do metody koncové analýzy, na což bude potřeba přečistit větší množství rostlinného materiálu. Dále byl detekován signál v SIM módu pro  $m/z$  218, který by mohl svým retenčním časem odpovídat methylisopentenyadeninu, pro bližší identifikaci bude nutné změřit hmotnostní spektrum tohoto signálu. V kultivačním médiu žádného z testovaných kmenů bakterie *R. fascians* nebyl pozorován signál methylovaných cytokininů, na metodě pro jejich identifikaci v tomto médiu bude potřeba ještě nadále pracovat.

## 7 LITERATURA

- Anantharaman V., Aravind L. (2001): The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 579–582.
- Bajguz A., Piotrowska A. (2009): Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.
- Barták P., Pěchová D., Tarkowski P., Bednář P., Kotouček M., Stránský Z., Vespalec R. (2000): Determination of the first dissociation constant of 6-benzylaminopurine A comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* **421**, 221-229.
- 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 Physiology* **102**, 867-872.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a betaglucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051–1054.
- Caesar K., Thamm A.M.K., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horák J., Harter K. (2011): Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5571–5580.
- Cavaleri L.F., Bendich A., Tinker J.F., Brown G.B. (1948): Ultraviolet absorption spectra of purines, pyrimidines and triazolopyrimidines. *Journal of the American Chemical Society* **70**, 3875-3880.
- Creason A.L., Vandeputte O.M., Savory E.A., Davis II E.W., Putnam M.L., Hu E., Swader-Hines D., Mol A., Baucher M., Prinsen E., Zdanowska M., Givan S.A., El Jaziri M., Loper J.E., Mahmud T., Chang J.H. (2014): Analysis of genome sequences from plant pathogenic *Rhodococcus* reveals genetic novelties in virulence loci. *PLoS One* **9**, 1-17. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0101996>
- Crespi M., Messens M., Caplan A.B., van Montagu M., Desomer J. (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO Journal* **11**, 795-804.
- Depuydt S., Doležal K., van Lijsebettens M., Moritz T., Holsters M., Vereecke D. (2008): Modulation of the hormone setting by *Rhodococcus fascians* results in ectopic KNOX activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 1267-1281.
- Dobrev P.I., Kamínek M. (2002): Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**, 21-29.
- Evidente A., Surico G., Iacobellis N.S., Randazzo G. (1986): 1'-methyl-zeatin, an additional cytokinin from *pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytochemistry* **25**, 525-526.
- Evidente A., Fujii T., Iacobellis N.S., Riva S., Sisto A., Surico G. (1991): Structure-activity relationship of zeatin cytokinins produced by plant pathogenic *Pseudomonades*. *Phytochemistry* **30**, 3505-3510.
- Farmer E.E., Ryan C.A. (1990): Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7713-7716.
- Farooqi A.H.A., Shukla Y.N., Shukla A., Bhakunia D.S. (1990): Cytokinins from marine organisms. *Phytochemistry* **29**, 2061-2063.
- Francis I., Gevers D., Karimi M., Holsters M., Vereecke D. (2007): Linear plasmids and phytopathogenicity. In: *Microbiology Monographs 7: Microbial Linear Plasmids*. Vol 7 (Meinhardt F., Klassen R. eds.), Springer, Berlin, 99-115.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- Frébortová J. (2008): *Metabolické přeměny cytokininů*. Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- 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. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 188-200.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822–47832.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P.I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151-1159.
- Cheng X., Kumar S., Posfai J., Pflugrath J.W., Roberts R.J. (1993): Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* **74**, 299-307.
- Cheng X., Roberts R.J. (2001): AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3784-3795.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233-239.
- Klimašauskas S., Weinhold E. (2007): A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends in Biotechnology* **25**, 99-104.
- Kögl F., Kostermans D.G.F.R. (1934): Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **228**, 113-121.
- Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters* **527**, 315-318.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyozuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- LeDuc D.L., Tarun A.S., Montes-Bayon M., Meija J., Malit M.F., Wu C.P., AbdelSamie M., Chiang C.Y., Tagmount A., deSouza M., Neuhierl B., Böck A., Caruso J., Terry N. (2004): Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation. *Plant Physiology* **135**, 377-383.
- Letham D.S. (1963): Zeatin, a Factor Inducing Cell Division Isolated from *Zea Mays*. *Life Sciences* **2**, 569–573.
- Letham D.S., Summons R.E., Parker C.W., MacLeod J.K. (1979): Regulators of cell division in plant tissues XXVII. Identification of an amino-acid conjugate of 6-benzylaminopurine formed in *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Planta* **146**, 71-74.
- MacLeod J.K., Summons R.E., Parker C.W., Letham D.S. (1975): Lupinic acid, a purinyl amino acid and a novel metabolite of zeatin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **19**, 809-810.
- Martin J.L., McMillan F.M. (2002): SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 783-793.
- Martin R.C., Mok M.C., Mok D.W.S. (1999): Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 284–289.
- 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 Physiology* **90**, 1630–1635.
- Matsasubara S., Armstrong D.J., Skoog F. (1968): Cytokinins in tRNA of *Corynebacterium fascians*. *Plant Physiology* **43**, 451-453.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392.

- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16598-16603.
- Mougel C., Zhulin I.B. (2001): CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 582–584.
- Nawabi P., Bauer S., Kyrpides N., Lykidis A. (2011): Engineering *Escherichia coli* for biodiesel production utilizing a bacterial fatty acid methyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 8052-8061.
- Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004): Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Astot C., Sandberg G., Moritz T. (2004): Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Analytical Chemistry* **15**, 2869-2877.
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- O'Hagan D., Schmidberger J.W. (2010): Enzymes that catalyse S<sub>N</sub>2 reaction mechanisms. *Natural Product Reports* **27**, 900–918.
- Parker C.W., Entsch B., Letham D.S. (1986): Inhibitors of two enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochemistry* **25**, 303–310.
- Parker C.W., Letham D.S., Wilson M.M., Jenkins I.D., MacLeod J.K., Summons R.E. (1975): The identity of two new cytokinin metabolites. *Annals of botany* **39**, 375-376.
- Pertry I. (2009): *How the fas locus contributes to Rhodococcus fascians cytokinin production: an in-depth molecular and biochemical analysis*. Habilitační práce, Ghent University, Ghent.
- Pertry I., Václavíková K., Depuydt S., Galuszka P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmölling T., Kakimoto T., van Montagu M.C.E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009): Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 929-934.
- Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuszka P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmölling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vereecke D. (2010): *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1164-1174.
- Podlešáková K., Tarkowská D., Pěničik A., Oklešťková J., Turečková V., Floková K., Tarkowski P. (2012): Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy* **106**, 373-379.
- Putnam M.L., Miller M.L. (2007): *Rhodococcus fascians* in Herbaceous Perennials. *Plant Disease* **91**, 1064-1076.
- Qin G., Gu H., Zhao Y., Ma Z., Shi G., Yang Y., Pichersky E., Chen H., Liu M., Chen Z., Qu L.J. (2005): An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **17**, 2693-2704.
- Qin J., Rosen B.P., Zhang Y., Wang G., Franke S., Rensing C. (2006): Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2075-2080.
- Rao S.T., Rossmann M.G. (1973): Comparison of super-secondary structures in proteins. *Journal of Molecular Biology* **76**, 241-256.
- Romanov G.A. (2009): How Do Cytokinins Affect the Cell?. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 268-290.

- Ross J.R., Nam K.H., D'Auria J.C., Pichersky E. (1999): S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **367**, 9-16.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.
- Seo H.S., Song J.T., Cheong J.J., Lee Y.H., Lee Y.W., Hwang I., Lee J.S., Choi Y.D. (2001): Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4788-4793.
- Shulaev V., Silverman P., Raskin I. (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**, 718-721.
- Schmidberger J.W., James A.B., Edwards R., Naismith J.H., O'Hagan D. (2010): Halomethane biosynthesis: structure of a SAM-dependent halide methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Angewandte Chemie* **122**, 3728– 3730; *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 3646 –3648.
- Schubert H.L., Blumenthal R.M., Cheng X. (2003): Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 329-335.
- Stes E., Vandeputte O.M., El Jaziri M., Holsters M., Vereecke D. (2011): A successful bacterial coup d'état: how *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 69-86.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Plant Physiology* **101**, 674-688.
- Struck A.W., Thompson M.L., Wong L.S., Micklefield J. (2012): S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *ChemBioChem* **13**, 2642 – 2655.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001): The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107-113.
- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012): A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**, 17.  
<http://www.plantmethods.com/content/8/1/17>
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*, 5th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 782 stran.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014): Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55-76.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy* **98**, 834-841.
- Tarkowski P., Ge L., Yong J.W.H., Tan S.N. (2009): Analytical methods for cytokinins. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 323-335.
- Tarkowski P., Floková K., Václavíková K., Jaworek P., Raus M., Nordström A., Novák O., Doležal K., Šebela M., Frébortová J. (2010): An improved in vivo deuterium labeling method for measuring the biosynthetic rate of cytokinins. *Molecules* **15**, 9214-9229.
- Tarkowski P. (2011): *Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace*. Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Tarkowski P., Vereecke D. (2014): Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* **32**, 215-229.
- Temmerman W., Vereecke D., Dreesen R., van Montanu M., Holsters M., Goethals K. (2000): Leafy gall formation is controlled by fasR, an AraC-Type regulatory gene in *Rhodococcus fascians*. *Journal of Bacteriology* **182**, 5832-5840.
- 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.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3714–3717.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyoizuka J., Yamaguchi S. (2008): Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200.
- van Rhijn J.A., Heskamp H.H., Davelaar E., Jordi W., Leloux M.S., Brinkman U.A.Th. (2001): Quantitative determination of glycosylated and aglycon isoprenoid cytokinins at sub-picomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **929**, 31-42.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M.C. (2003): *O*-Glucosylation of *cis*-Zeatin in Maize. Characterization of Genes, Enzymes, and Endogenous Cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374-1380.
- Vereecke D., Burssens S., Simón-Mateo C., Inzé D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M. (2000): The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* **210**, 241-251.
- Vereecke D., Cornelis K., Temmerman W., Jaziri M., van Montagu M., Holsters M., Goethals K. (2002): Chromosomal locus that affects pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. *Journal of Bacteriology* **184**, 1112-1120.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell biology* **42**, 1017-1023.
- Zhang M., Wei F., Zhang Y-F., Nie J., Feng Y-Q. (2006): Novel polymer monolith microextraction using a poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1102**, 294-301.
- Zhang Q., van der Donk W.A., Liu W. (2012): Radical-mediated enzymatic methylation: a tale of two SAMs. *Accounts of Chemical Research* **45**, 555-564.



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AHK2	arabidopsis histidin kinasa 2
AHK3	arabidopsis histidin kinasa 3
AHP	arabidopsis histidin-fosfotransferový protein
ARR	arabidopsis regulátor odpovědi
BAP	benzyladenin
CE	kolizní energie
CHASE	cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular
CK	cytokinin
CKX	cytokinindehydrogenasa
CRE1/AHK4	cytokinin response 1/ arabidopsis histidine kinase 4
CYP450	cytochrom P450 monooxygenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
C18	oktadecyl
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyl pyrofosfát
DMF	N,N-dimethylformamid
ESI	ionizace elektrosprejem
HMBDP	4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát
IAA	indolyl-3-octová kyselina
IAE	imunoafinitní extrakce
iP	isopentenyladenin
IPT	isopentenyltransferasa
LAS	zeatin 9-aminokarboxyethyltransferasa
LOG	cytokinin fosforibohydrolasa
MRM	multiple reaction monitoring
MT	methyltransferasa
MS-sůl	Murashige a Skoog sůl
mZ	methylzeatin
N-GT	cytokinin <i>N</i> -glukosyltransferasa
PMME	mikroextrakce polymerním monolitem
RF	<i>Rhodococcus fascians</i>
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionin
SIM	single ion monitoring
SPE	extrakce na pevné fázi
tZ	<i>trans</i> -zeatin
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
ZI	zeatin <i>cis-trans</i> isomerasa
ZOGT	zeatin- <i>O</i> -glukosyltransferasa
ZR	zeatinreduktasa
βGLU	β-glukosidasa