

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava a charakterizace fluorescenčně značených cytokininových derivátů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Karolina Kubiasová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Szüčová, Ph.D.
Odborný konzultant:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	7. 5. 2012

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

V Olomouci dne 2. 5. 2012

Děkuji Mgr. Lucii Szüčové, Ph.D. za odborné vedení a vstřícnou pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Za cenné rady a trpělivost bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, zejména Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. a Mgr. Tomáši Pospíšilovi, D.E.A., Ph.D. Další, komu bych chtěla poděkovat, je RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D. z Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, a to za pomoc při zpracování cytokininových receptorových testů.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Karolina Kubiasová
Název práce	Příprava a charakterizace fluorescenčně značených cytokininových derivátů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Szüčová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	Práce je zaměřena na syntézu a studium biologické aktivity fluorescenčně značených derivátů N^6 -isopentenyladeninu. V teoretické části byla provedena literární rešerše cytokininů, jejich biologické aktivity, signální kaskády a přehledu malých organických fluorescenčních značek. V praktické části byly připraveny dva deriváty N^6 -isopentenyladeninu substituované v poloze C2 na purinovém skeletu alifatickým postranním řetězcem zakončeným primární aminoskupinou. Na tyto prekurzory bylo připojeno pět různých fluoroprob. Dále byly vybrané připravené látky testovány na cytokininovou aktivitu ve standardním amaranthovém biotestu a na interakci s cytokininovými receptory (CRE1/AHK4, ZmHK1, ZmHK3a).
Klíčová slova	cytokininy, deriváty cytokininů, syntéza, fluorescenční značení, biologická aktivita, kumarin, Rhodamin B, dansyl, fluorescein, 7-nitrobenzooxadiazol
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Karolina Kubiasová
Title	Synthesis and characterization of fluorescently labelled cytokinin derivatives
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Lucie Szüčová, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	The bachelor thesis is focused on synthesis and biological activity study of fluorescently labelled N^6 -isopentenyladenine derivatives. In the theoretical part, the literature concerning to cytokinins, their biological activity, signal pathway, and overview of small organic fluoroprobes is reviewed. The practical part deals with the synthesis of two N^6 -isopentenyladenine derivatives substituted in C2 position of the purine moiety substituted by aliphatic side chain terminated by amino group. Five different fluorescent probes were attached to the prepared derivatives and some selected compounds were screened for their cytokinin activity in the standard <i>Amaranthus</i> bioassay and for their ability to interact with cytokinin receptors (CRE1/AHK4, ZmHK1, ZmHK3a).
Keywords	cytokinins, cytokinin derivatives, synthesis, fluorescent labelling, biological activity, coumarin, Rhodamine B, dansyl, fluorescein, 7-nitrobenzoxadiazole
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	- 7 -
Teoretická část	- 8 -
1 Cytokininy	- 9 -
1.1 Struktura cytokininů	- 9 -
1.1.1 Cytokininy odvozené od adeninu	- 9 -
1.1.2 Cytokininy odvozené od fenylmočoviny	- 10 -
1.2 Biologické funkce	- 10 -
1.3 Cytokininy a fluorescence	- 12 -
1.3.1 Fluorescenční cytokininy	- 12 -
1.3.2 Fluorescenčně značené cytokininy	- 13 -
2 Cytokininová signální dráha	- 14 -
2.1 Receptory	- 15 -
2.2 AHP	- 16 -
2.3 ARR	- 16 -
2.4 CRF	- 17 -
2.5 Mechanismus signalizace cytokininů	- 17 -
3 Fluorescenční značky	- 18 -
3.1 Fluorescenční proteiny	- 19 -
3.2 Organické fluoroproby	- 19 -
3.2.1 Organické fluoroproby s emisí do 500 nm	- 20 -
3.2.1.1 Fluorescenční značky s kyslíkatými heterocykly	- 20 -
3.2.1.2 Fluorescenční značky se sírnými heterocykly	- 20 -
3.2.1.3 Fluorescenční značky s dusíkatými heterocykly	- 21 -
3.2.1.4 Fluorescenční značky s naftalenovým jádrem	- 22 -
3.2.2 Organické fluoroproby s emisí nad 500 nm	- 22 -
3.2.2.1 Fluoresceiny	- 22 -
3.2.2.2 Rhodaminy	- 23 -
3.2.2.3 Další fluorescenční značky	- 24 -
Experimentální část	- 25 -
4 Materiál a metody	- 26 -
4.1 Chemikálie	- 26 -
4.2 Metody	- 26 -
4.2.1 Cytokininové biotesty	- 27 -
4.2.2 Receptorové testy	- 27 -

4.3	Syntéza	- 28 -
4.3.1	Deriváty iP substituované na C2 atomu purinu.....	- 28 -
4.3.2	Označení C2-substituovaných derivátů iP pomocí fluorescenčních značek .	- 29 -
5	Výsledky a diskuse	- 33 -
5.1	Syntéza	- 33 -
5.1.1	Prekurzory pro fluorescenční značení	- 33 -
5.1.2	Fluorescenční značení	- 33 -
5.1.2.1	Fluorescenční značení Rhodaminem B	- 33 -
5.1.2.2	Fluorescenční značení kumarin-3-karboxylovou kyselinou.....	- 34 -
5.1.2.3	Fluorescenční značení fluoresceinem isothiokyanátem	- 35 -
5.1.2.4	Fluorescenční značení NBD-Cl.....	- 36 -
5.1.2.5	Fluorescenční značení dansyl chloridem.....	- 36 -
5.2	Biologická aktivita připravených látek.....	- 39 -
5.2.1	Amaranthový biotest	- 39 -
5.2.2	Receptorové biotesty	- 40 -
6	Závěr	- 43 -
7	Literatura.....	- 44 -
8	Seznam zkratk	- 49 -

Cíle práce

- 1) Zpracování rešerše o derivátech rostlinných hormonů cytokininů značených fluorescenčními značkami
- 2) Příprava prekurzorů pro fluorescenční značení látek odvozených od N^6 -isopentenyladeninu
- 3) Značení připravených derivátů vhodnými fluorescenčními značkami
- 4) Biologická aktivita připravených látek

Teoretická část

1 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které hrají významnou roli v regulaci buněčného cyklu a ovlivňují mnoho procesů spojených s růstem a vývojem rostlin (Davies, 2004). Byly objeveny v laboratoři F. Skooga v 50. letech minulého století jako skupina látek, které v přítomnosti jiné třídy rostlinných hormonů auxinů podporují buněčné dělení (cytokinezi) a růst kalusu.

První zástupce cytokininů byl izolován C. Millerem (Miller, 1955a, Miller, 1955b) jako degradační produkt DNA a byl pojmenován kinetin (6-furfurylaminopurin). Pojmenování získal díky své schopnosti vyvolat buněčné dělení. Zeatin (6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9H-purin), první identifikovaný přírodní cytokinin, byl získán z nezralých kukuřičných zrn (Miller, 1961).

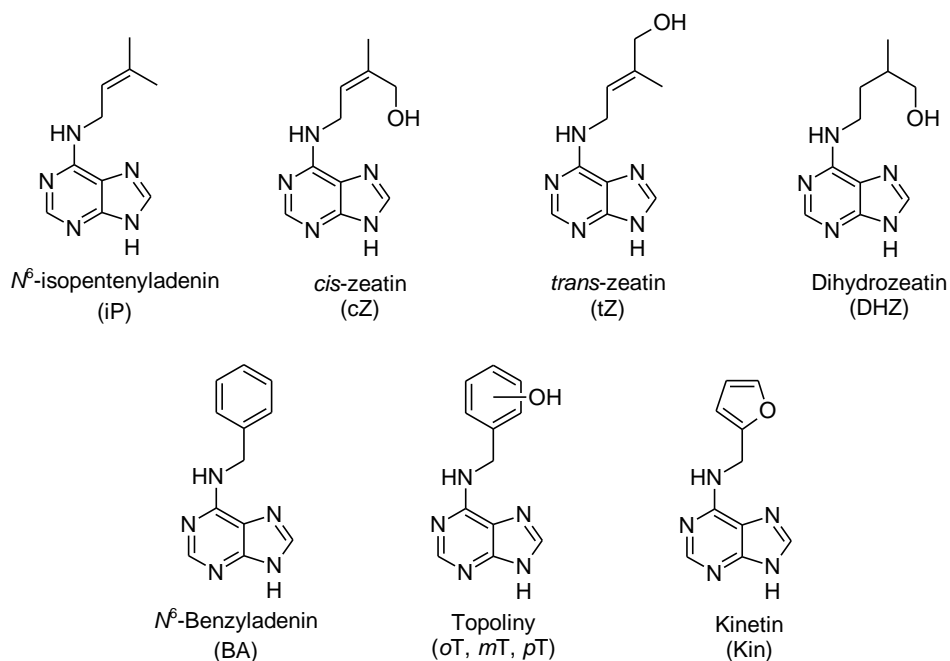
Cytokininy se vyskytují ve všech rostlinných pletivech, zejména v kořenové špičce, vrcholcích výhonků nadzemní části rostlin nebo v nezralých semenech. Kromě rostlin jsou cytokininy také produkovány cyanobakteriemi, patogenními rostlinnými bakteriemi (*Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus fascians*) nebo hlenkami (*Dictyostelium discoideum*) (Schmülling, 2004).

Společně s dalšími rostlinnými hormony jsou cytokininy hojně využívány v zahradnictví a biotechnologických aplikacích při mikropropagaci a regeneraci rostlin (van Staden et al., 2008).

1.1 Struktura cytokininů

1.1.1 Cytokininy odvozené od adeninu

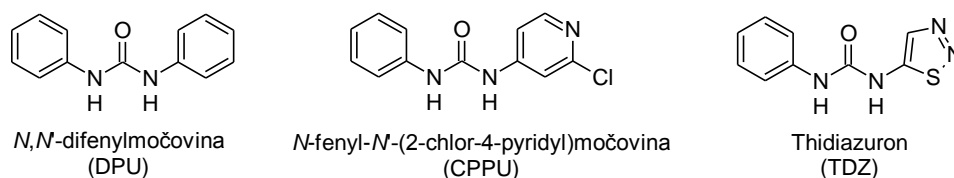
Přirozeně se vyskytující cytokininy (CK) lze definovat jako N^6 -substituované deriváty adeninu. Podle struktury postranního řetězce připojeného na dusíkový atom v pozici N^6 se dělí na dvě základní skupiny, a to na isoprenoidní (ICK) a aromatické (ACK). Mezi ICK se řadí například N^6 -isopentenyladenin, *cis*- a *trans*-zeatin a dihydrozeatin. Aromatické cytokininy pak reprezentují například N^6 -benzylaminopurin, *o*-, *m*-, *p*-topolin a kinetin (Obr. 1) (Romanov, 2009).



Obr. 1. *Struktury cytokininů odvozených od adeninu. Uvedené názvy (vyjma N⁶-benzyladeninu) jsou triviální a v závorkách jsou použity běžné zkratky.*

1.1.2 Cytokiny odvozené od fenylmočoviny

Kromě přirozeně se vyskytujících cytokininů existuje skupina látek odvozená od fenylmočoviny, které vykazují také vysokou cytokininovou aktivitu. Do této skupiny látek patří například *N,N'*-difenylmočovina, *N*-fenyl-*N'*-(2-chlor-4-pyridyl)močovina nebo thidiazuron (Obr. 2) (Schmülling, 2004).



Obr. 2. *Struktury cytokininů odvozených od fenylmočoviny. U struktur jsou uvedeny triviální názvy a jejich běžně používané zkratky.*

1.2 Biologické funkce

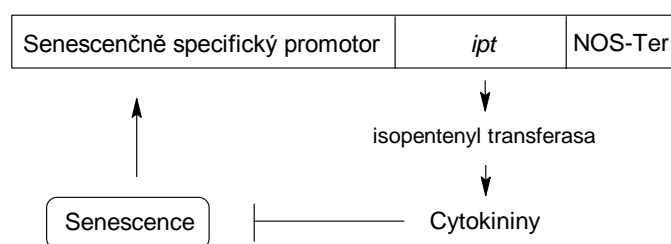
Cytokiny hrají významnou roli při regulaci růstu a vývoje rostliny během celého jejího životního cyklu. Na buněčné úrovni stimulují buněčné dělení a diferenciaci, genovou expresi, syntézu chlorofylu a vývoj chloroplastů a syntézu některých sekundárních metabolitů (betacyanin, indolové alkaloidy). Na orgánové úrovni ovlivňují řadu významných vývojových a fyziologických procesů, jakými jsou klíčení semen, expanze kotyledonu, vývoj vodivých pletiv, apikální dominance, transport živin, vývoj květů a plodů a listovou senescenci (Davies, 2004).

Listová senescence je finálním stadiem ve vývoji listu, kdy dochází ke koordinovaným změnám ve struktuře buňky, genové expresi a výraznému poklesu fotosyntetické kapacity (Quirino et al., 2000). Schopnost cytokininů ovlivňovat senescenci byla zjištěna poprvé v roce 1957 po exogenní aplikaci kinetinu na oddělené listy řepně (*Xanthium pensylvanicum*). Ošetření intaktních listů vedlo k oddálení senescence (listy zůstaly zelené) v porovnání s kontrolními listy (Richmond et Lang, 1957). Kromě listové senescence cytokininy oddalují také senescenci květů. Eisinger pozoroval prodloužení životnosti květů po aplikaci kinetinu u karafiátu (*Dianthus caryophyllus*) (Eisinger, 1976). Obdobný efekt se projevil u variety krátko-žijící růže (Golden wave), kdy po inkubaci květů s N^6 -benzyladeninem došlo k oddálení senescence (Mayak et Halevy, 1969).

Dalším důkazem vlivu cytokininů na senescenci bylo sledování hladin endogenních cytokininů během ontogeneze. Studie odhalily vztah mezi hladinou cytokininů a nástupem senescence, při které tato hladina prudce klesá (Heindl et al., 1982).

V roce 1995 byl sledován autoregulační systém inhibice senescence na transgenním tabáku, do kterého byl naklonován senescenčně specifický promotor ovlivňující expresi *ipt*. Při nástupu senescence nastává exprese *ipt* a následně dochází k syntéze cytokininů. Zvýšená hladina cytokininů brání senescenci a potlačuje aktivitu senescenčně specifického promotoru, aby nedošlo k nadprodukci cytokininů (Gan et Amasino, 1995).

A



B

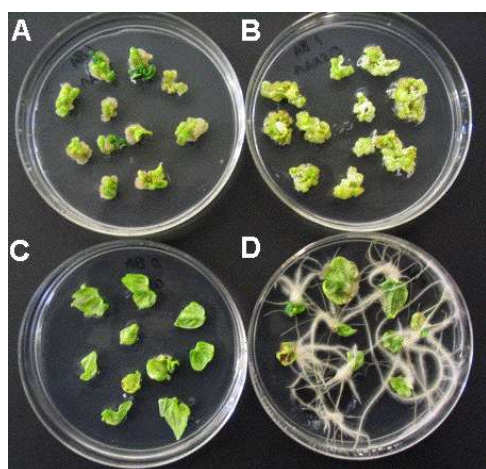


Obr. 3. Inhibice listové senescence pomocí autoregulační produkce cytokininů. A/ Exprese *ipt* pod kontrolou senescenčně specifického promotoru *SAG12*. B/ Oddálená listová senescence u transgenního tabáku (vlevo), wt (vpravo) (Gan et Amasino, 1996).

Apikální dominance je jev, při kterém terminální výhonek reguluje růst a vývoj postranních pupenů (Cline, 1991). Grayburn et al. pozorovali tvorbu pupenů po aplikaci exogenních cytokininů (BA, Kin, iP) na meristematické buňky v bazální části listu *Graptopetalum paraguayense* (Grayburn et al., 1982). V případě aplikace kinetinu na stonkové segmenty ovsa bylo zjištěno, že kinetin stimuluje vývoj pupenů (Harrison et Kaufman, 1980).

Smigocki a Owens pozorovali zeslabení apikální dominance u transgenních rostlin tabáku (*Nicotina plumbaginifolia*) s nadprodukcí cytokininů (exprese *ipt* genu pod konstitutivním 35S promotorem) (Smigocki et Owens, 1988).

Interakce cytokininů a auxinů je důležitým rysem při vývoji a růstu rostliny. Jejich role je antagonistická a změnou poměru koncentrací lze ovlivnit stimulaci růstu nadzemní či kořenové části. V případě převládajícího množství cytokininů dochází k zeslabení růstu kořenů a výrazné stimulaci nadzemní části, naopak při nedostatku cytokininů převládá úloha auxinů a nastává zvýšená tvorba kořenových vrcholů. Této skutečnosti se využívá v biotechnologiích v tkáňových kulturách při regeneraci celých rostlin z izolovaných částí (van Staden et al., 2008).



Varianta	Konc. BA [mg/L]	Konc. NAA [mg/L]
A	1	0
B	1	0,5
C	0	0
D	0	0,05

Obr. 4. Vliv koncentrace cytokininu a auxinu na morfogenezi u fazole (*Vigna radiata*). A/tvorba listů, B/ kalus, C/ kontrola, D/ tvorba kořenů. (Převzato z http://plantphys.info/plant_physiology/images/tissuehormonescu.gif).

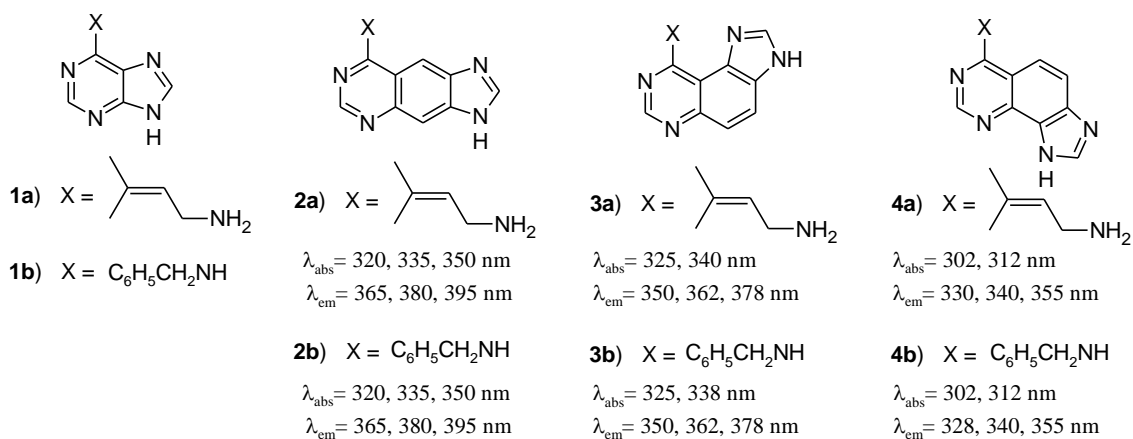
1.3 Cytokinininy a fluorescence

Přirozeně se vyskytující cytokinininy nejsou fluorescenční. Pro jejich využití k fluorescenčnímu značení je nutné je vhodně substituovat fluorescenčními značkami nebo měnit strukturu a substituce purinového skeletu. Následně lze tyto látky použít například ke studiu interakce mezi cytokinininy a jejich vazebnými proteinovými partnery (Brault, 1997).

1.3.1 Fluorescenční cytokinininy

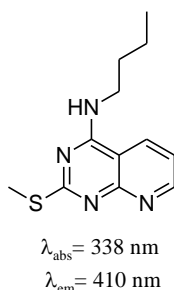
V roce 1975 byly připraveny imidazo[4,5]chinazolinová analoga cytokininů a byly stanoveny jejich aktivity v tabákovém testu. Společným prvkem připravených látek byly substituenty připojené na pyrimidinový kruh v pozici 4, a to buď benzylamin nebo 3-methylbut-2-en-1-amin (analoga iP a BA). Analoga se lišila v připojení imidazolového kruhu na chinazolinové jádro ([4,5-*f*], [4,5-*g*], [4,5-*h*]) (Obr. 5).

Sloučeniny **2a** a **2b** vykazovaly v tabákovém testu vysokou aktivitu, zatímco látky **3a** a **4a** byly aktivní jen nepatrně nebo vůbec (**3b** a **4b**). Sloučenina **2a** dosáhla 100% aktivity iP v optimální koncentraci 10^{-2} M (optimální koncentrace iP – 10^{-4} M). Sloučenina **2b** dosáhla 100% aktivity BA v optimální koncentraci 10^{-2} M (optimální koncentrace BA – 10^{-4} M) (Sprecker, 1976).



Obr. 5. Imidazo[4,5]chinazolinová analoga cytokininů. Fluorescenční vlastnosti byly měřeny ve vodě s přesností ± 2 nm.

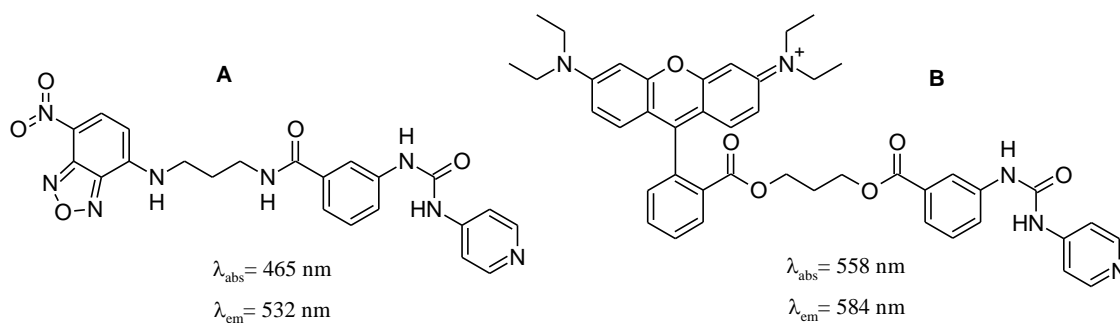
Dalším cytokininovým analogem vykazujícím vysokou fluorescenci je 4-*n*-butylamino-2-methylthiopyrido[2,3-*d*]pyrimidin (BAMPP). Bylo zjištěno, že díky svým fluorescenčním vlastnostem je BAMPP vhodný v kalusovém testu pro izolaci proteinů vázajících cytokininy (Hamaguchi et al., 1985).



Obr. 6. Cytokininový analog BAMPP.

1.3.2 Fluorescenčně značené cytokininy

V roce 2010 Zawadski et al. připravili dva fluorescenčně značené cytokininy močovinnového typu (Obr. 7). Fluorescenční markery 4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol (NBD-Cl) a rhodamin B byly připojeny k *N*-(3-karboxyfenyl)-*N'*-(pyrid-4-yl)močovinně (4PU) přes karboxylovou skupinu prostřednictvím oddalovacího ramínka o délce tří uhlíků. Při syntéze NBD-Cl značeného derivátu byl použit 1,3-diaminopropan, zatímco při značení rhodaminem B 1,3-propandiol (Zawadski et al., 2010).



Obr. 7. Fluorescenčně značený cytokinin močovinného typu. A/ 4PU značený pomocí NBD-Cl (4PU-NBD). B/ 4PU značený rhodaminem B (4PU-RhB).

Připravené fluorescenčně značené cytokininy byly použity pro studium interakce mezi ligandem a cytokinin-specifickým vazebným proteinem (VrCSBP) z fazolových klíčků (*Vigna radiata*) (Fujimoto et al., 1998). VrCSBP je homotetramer, jehož funkcí je skladování a transport cytokininů. V každé podjednotce je vazebná kapsa, do které je schopen navázat dvě molekuly zeatinu (Pasternak et al., 2006).

2 Cytokininová signální dráha

Podle dosud známých dat cytokininy prostupují přes fosforylační kinasovou dráhu, která je podobná dvou-komponentním systémům u bakterií, kterými odpovídají na stimuly z prostředí (Hwang et Sheen, 2001). Výsledkem fosforylační kinasové dráhy je aktivace transkripčních faktorů a genová exprese. Charakterizace dvou-komponentního systému u *Arabidopsis thaliana*, kukuřice a rýže ukázala, že odpověď na cytokininy je zprostředkována histidinkinasy, regulátory odpovědi (response regulators - ARR) a nově také CRF (cytokinin response factors).

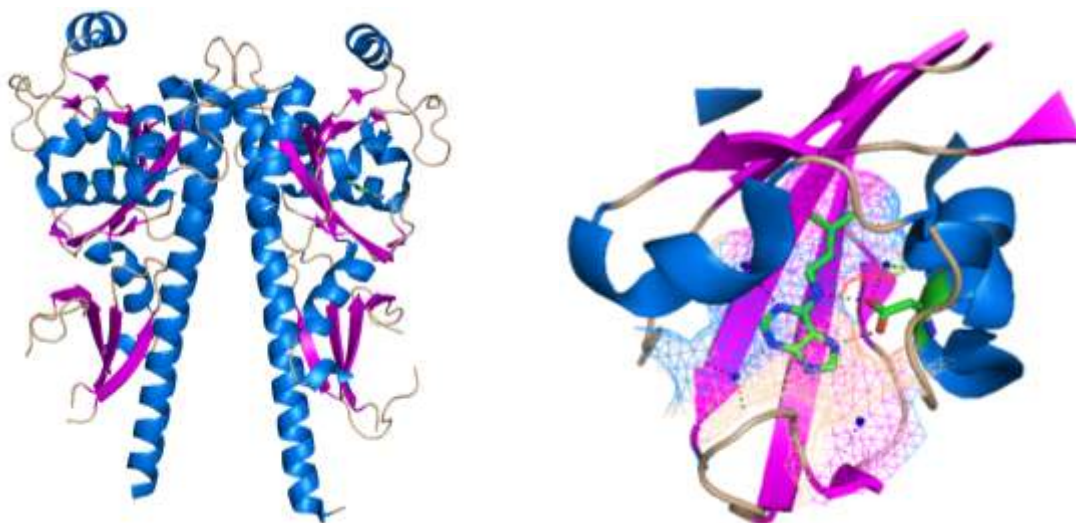
Převrat ve zkoumání cytokininové signální dráhy nastal v roce 1996 objevem *CKII*, genu pro receptorovou histidinkinasu v *A. thaliana*. Transformovaný kalus *Arabidopsis thaliana* s over-expresí *CKII* kultivovaný v nepřítomnosti cytokininů vykazoval výrazné fenotypové změny typické pro odpověď na cytokininy (proliferace, zelenání, tvorba výhonků) (Kakimoto, 1996). Tyto počáteční experimenty a identifikace genů pro regulátory odpovědi (ARR) v *Arabidopsis* (Taniguchi et al., 1998) jako prvních genů v odpovědi na cytokininy ukázaly, že histidinkinasy a jejich ostatní komponenty mohou hrát významnou roli v cytokininové signální dráze. V roce 2001 byla v *A. thaliana* objevena další histidinkinasa. Jednalo se o první skutečný cytokininový receptor pojmenovaný CRE1/AHK4 (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Ueguchi et al., 2001). Díky dostupnosti genomové sekvence *Arabidopsis* byly vzápětí objeveny další cytokininové receptory – AHK2 a AHK3. V roce 2004 Yonekura-Sakakibara et al. izolovali z kukuřice geny pro cytokininové receptory (*ZmHK1*, *ZmHK2*, *ZmHK3a*) (Yonekura-Sakakibara et al., 2004).

Cytokininová signální kaskáda je nejvíce prostudována v *A. thaliana*, proto se následující kapitoly zaměří na popis jednotlivých komponentů nacházejících se v *A. thaliana*.

2.1 Receptory

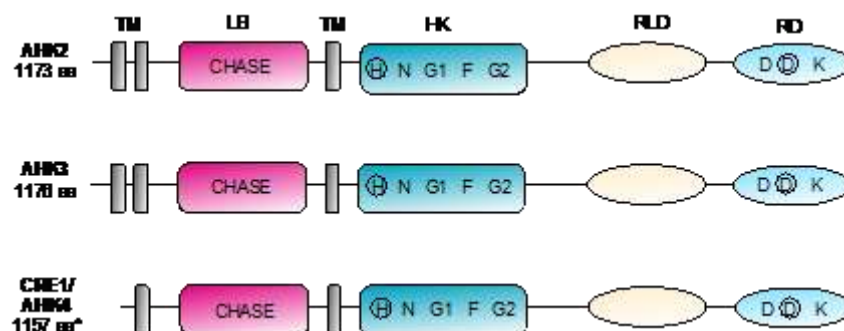
Cytokininy jsou v *Arabidopsis* vnímány přes cytokininové receptory AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Současný model cytokininové signální dráhy předpokládá lokalizaci receptorů v plasmatické membráně na základě bioinformatické analýzy, analogie s receptorovými His kinasami v bakteriích a kvasinkách a experimentálně na lokalizaci AHK3:GFP fuzního proteinu (Kim et al., 2006). Nejnovější studie zaměřené na lokalizaci cytokininových receptorů v *A. thaliana* a kukuřici (*Zea mays*) s využitím receptor:GFP fuzních proteinů ukazovaly silnou fluorescenci na endoplasmatickém retikulu (Wulfetange et al., 2011, Lomin et al., 2011).

V roce 2011 Hothorn et al. uveřejnili krystalovou strukturu sensorové domény receptoru CRE1/AHK4 v komplexu s cytokininy. Ligandy ve vazebném místě receptoru jsou vázány přímo pomocí dvou vodíkových vazeb mezi Asp262 a N⁶ a N7 atomy cytokininu nebo nepřímo prostřednictvím čtyř molekul vody. U Kin a tZ dochází k tvorbě další vodíkové vazby na postranním řetězci s Thr294 (Hothorn et al., 2011).



Obr. 8. Krystalová struktura sensorové domény receptoru CRE1/AHK4 v komplexu s iP. Vlevo – celková struktura sensorové domény, která vytváří homodimer. Vpravo – detail vazebného místa. Residua ve vzdálenosti 12 Å od substrátu, která vytváří vazebné místo. Substrát iP – modrozeleně, vody v aktivním místě – tmavě modré kuličky, vodíkové interakce – černé přerušované čáry, Asp262 spojen s N⁶ a N7 atomy iP (pdb 3T4J).

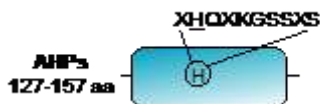
Výše zmíněné tři cytokininové receptory se liší v expresním profilu. CRE1/AHK4 je produkován převážně v kořenech, zatímco AHK2 a AHK3 jsou přítomny ve všech hlavních orgánech (Ueguchi et al., 2001). AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 se skládají z extracelulární cytokinin vázající CHASE domény, cytoplasmatické His kinasové domény, receiver domény a receiver-like domény (Obr. 9).



Obr. 9. Struktura cytokininových receptorů a dalších proteinů cytokininové signální dráhy. Aminokyseliny účastnící se přenosu fosfátu jsou označeny v kruhu. aa – aminokyselina, TM – transmembránová doména, LB – ligand-vazebná doména, HK – histidinkinasa, RLD – receiver-like doména, RD – receiver doména (podle Heyl et Schmülling, 2003).

2.2 AHP

V *A. thaliana* bylo objeveno šest AHP genů, které jsou produkovány ve všech částech rostliny a jejich transkripce není ovlivněna exogenními cytokininy (Tanaka et al, 2004). AHP jsou 12 kDa proteiny obsahující vysoce konzervovaný motiv XHQXKGSSXS odpovědný za přenos fosfátu (Obr. 10). Hlavní úlohou AHP je přenos signálu z receptoru lokalizovaného v plasmatické membráně na ARR nacházející se v jádře. Bylo zjištěno, že AHP6 (pseudo AHP) se neúčastní přenosu signálu a je považován za negativní regulátor cytokininové signální dráhy (Mähönen et al., 2006).

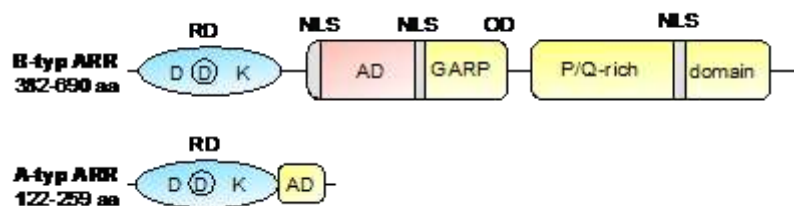


Obr. 10. Struktura AHP (podle Heyl et Schmülling, 2003).

2.3 ARR

Výstupním prvkem signální dráhy jsou response regulátory, jejichž aktivita závisí na stavu fosforylace. Analýza genomové sekvence z *Arabidopsis* odhalila existenci 21 předpokládaných genů regulátorů odpovědi (ARR) charakteristických přítomností konzervovaného aminokyselinového motivu DDK nezbytných pro příjem fosfátu (To et Kieber, 2007).

Podle struktury jsou ARR rozděleny na A-typ a B-typ. Deset A-typů ARR jsou složeny hlavně z přijímačové (receiver) domény a krátkého karboxylového konce a jejich transkripce v přítomnosti exogenních cytokininů rapidně stoupá – jsou považovány za geny primární odpovědi. Naopak 11 B-typů je kromě vysílací domény složeno z C-terminální domény a jejich transkripce není ovlivněna cytokininy (Mason et al., 2004).



Obr. 11. *Struktura A-typu a B-typu ARR. Aminokyseliny účastnící se přenosu fosfátu jsou označeny v kruhu. aa – aminokyselina, RD - receiver doména, NLS – jaderná lokalizační sekvence, OD – výstupní doména, AD – kyselá doména, GARP – DNA vázající motiv, P/Q-rich – sekvence obsahující velké množství Pro a Gln (podle Heyl et Schmülling, 2003).*

2.4 CRF

CRF z *Arabidopsis* je rodina šesti genů (*CRF1-CRF6*) patřící do skupiny rostlinných transkripčních faktorů ze třídy APETALA2. Transkripce tří ze šesti CRF genů závisí na B-typu ARR. Bylo zjištěno, že po ošetření cytokininu se CRF:GFP fuzní proteiny akumulují v jádře. Jejich hromadění závisí na AHK a AHP, ale na A- a B-typu ARR závislé není. CRF proteiny mohou být importovány do jádra za účelem transkripce cílových genů (Rashotte et al., 2006).

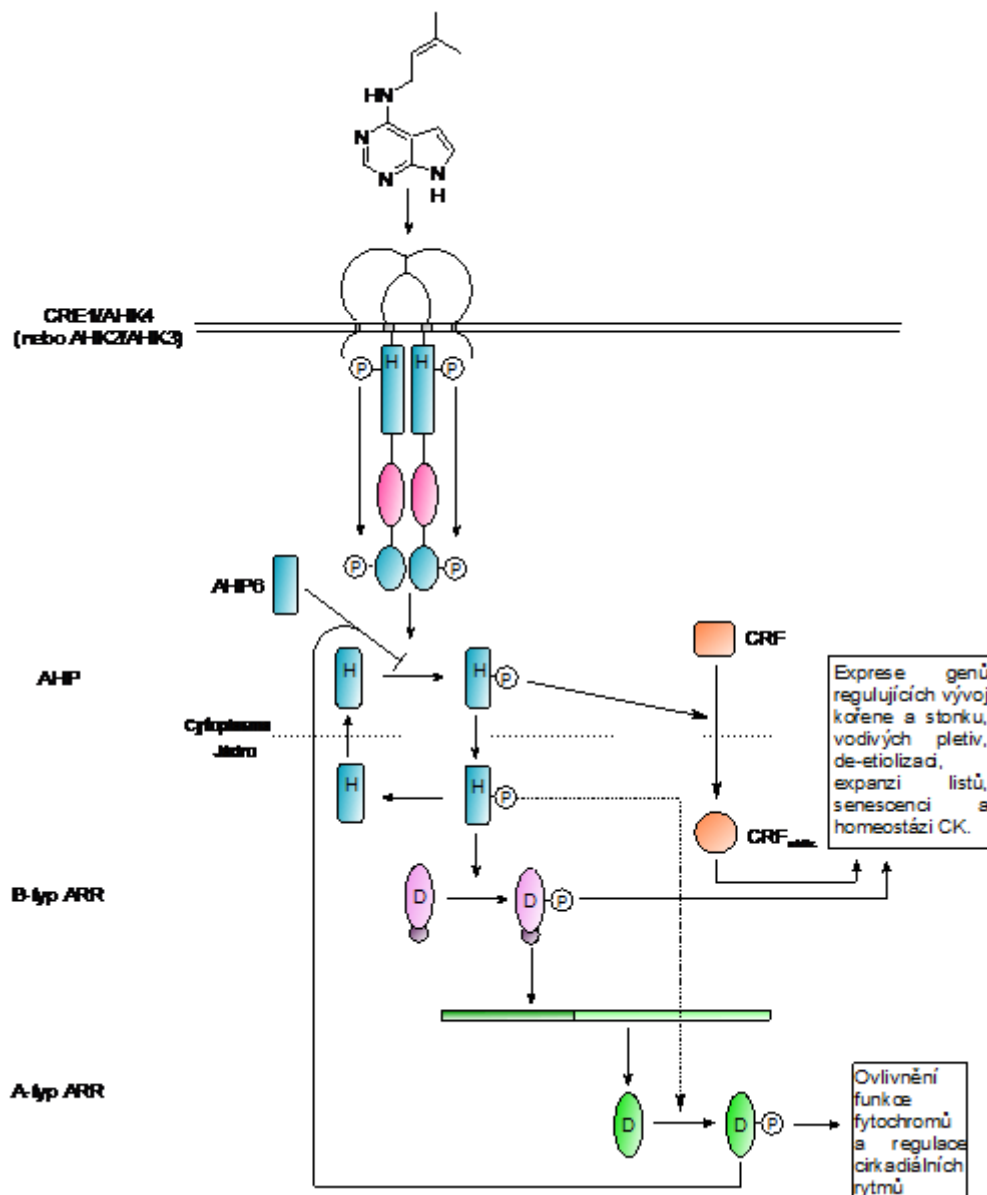
2.5 Mechanismus signalizace cytokininů

Mechanismus signalizace cytokininů spočívá v aktivaci několika krokové fosfátové kaskády a genové exprese. V prvním kroku dochází k navázání CK do ligand-vazebné domény receptoru (CHASE doména) na extracelulární straně plasmatické membrány a následné dimerizaci receptoru. Při tomto procesu dochází k autofosforylaci konzervovaného His v histidinkinasové doméně. Aktivace receptoru vede k fosforylaci konzervovaného Asp na vysílací doméně na C-terminálním konci receptoru a dále k fosforylaci AHP (AHP1 – AHP5). CRE1/AHK4, který není navázán na cytokinin, může zprostředkovat reverzní fosforylaci, což má za následek defosforylaci AHP.

Fosforylovaný AHP je následně translokován do jádra, kde přenesou fosfátovou skupinu na A- nebo B-typu ARR na konzervované residuum (Asp). Přenos fosfátové skupiny z a na AHP může být inhibováno pseudo AHP (AHP6) lokalizovaném v protoxylemu.

B-typu ARR je složen z N-koncové receiver domény a C-koncové DNA-vázající domény. V inaktivním stavu obě koncové domény spolu interagují a po fosforylaci dojde k přerušení vzájemné interakce a následné vazbě na DNA a transkripci cílových genů (A-typu ARR a CRF). CRF jsou aktivovány prostřednictvím AHP a následně dochází k jejich akumulaci v jádře a aktivaci transkripce. B-typu ARR a CRF mají částečně překryté transkripční cíle. A-typu ARR je složen z konzervované receiver domény a krátkého C-konce. Fosforylovaný A-typu ARR ovlivňuje funkce fytohormonů a regulaci cirkadiálních rytmů nebo působí jako negativní

regulátor cytokininové signální kaskády, kdy je schopen inhibovat fosforylaci AHP (To et Kieber, 2007).



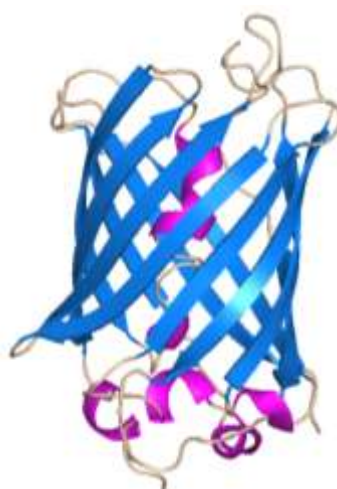
Obr. 12. Model cytokininové signální kaskády (podle Heyl et Schmölling, 2003).

3 Fluorescenční značky

Značení látek patří mezi jednu z nejpoužívanějších metod využívanou pro bioanalytické účely. K těmto reakcím lze použít radioaktivní materiály nebo sloučeniny s absorpcí a fluorescencí v rozmezí od UV po blízkou IR oblast elektromagnetického záření. Fluorescenční značení se rozkládá přes široké spektrum vlnových délek za použití polovodičových nanokrystalů, fluorescenčních proteinů a organických molekul (Gonçalves, 2009).

3.1 Fluorescenční proteiny

Jednou z nejpoužívanějších metod pro fluorescenční lokalizaci proteinů v buňce je tvorba tzv. fuzních proteinů, kdy za gen sledovaného proteinu je naklonován gen pro fluorescenční protein. První fluorescenční protein (GFP) byl izolován z *Aequorea victoria* v roce 1962 Osamou Shimomurou (Shimomura, 1962). Objev a vývoj GFP byl oceněn Nobelovou cenou za chemii v roce 2008. GFP se skládá z 238 aminokyselin tvořících β -soudek. Uvnitř struktury se nachází fluorofor (*p*-hydroxybenzylidenimidazolonin) spontánně vytvořený ze tří aminokyselin (Ser-Tyr-Gly), jehož absorpční maximum je při 400 nm a emisní maximum při 505 nm. Kromě GFP je známa celá řada dalších fluorescenčních proteinů s emisí od 475 nm až po 650 nm (Shaner et al., 2005).



Obr. 13. Podjednotka GFP proteinu (pdb 1GFL).

3.2 Organické fluoroproby

Alternativou k fuzním proteinům je využití nízkomolekulárních organických látek (substráty, inhibitory, ligandy) vykazujících autofluorescenci nebo označených pomocí organických fluoroprob. Ty mohou být k analyzovanému vzorku připojeny buď kovalentní anebo nekovalentní vazbou. Obecně lze říct, že organické fluoroproby emisí pokrývají celé spektrum vlnových délek.

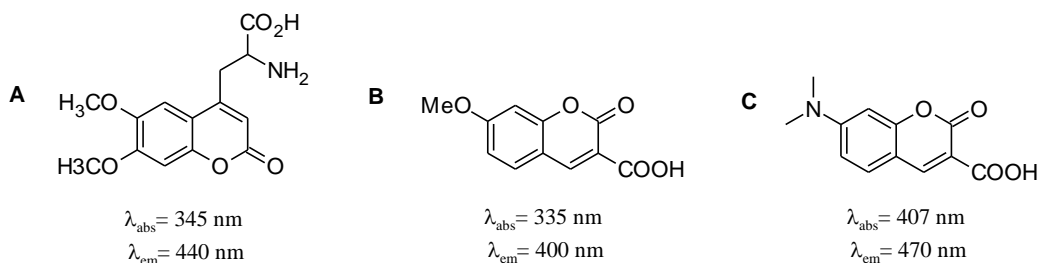
Organické fluoroproby lze rozdělit do skupin podle emisní vlnové délky (od UV-500 nm a nad 500 nm) a dále podle struktury. Příkladem fluorescenčních prob vykazujících fluorescenci ve vlnových délkách od blízké UV po 500 nm jsou oxobenzopyrany, naftofurany, dansyl chlorid atd. V případě organických fluorescenčních prob emitujících nad 500 nm a blízké IR oblasti (900 nm) lze zmínit fluoresceiny, rhodaminy nebo kyaniny (Gonçalves, 2009).

3.2.1 Organické fluoroproby s emisí do 500 nm

3.2.1.1 Fluorescenční značky s kyslíkatými heterocykly

Kumariny, neboli 3-oxo-3*H*-benzopyrany, představují jednu z nejcitlivějších a komerčně dostupných skupin reagentů pro fluorescenční značení. Substituované kumariny našly využití například při modifikaci aminokyselin nebo nukleových bází (Gonçalves, 2009).

2-Amino-3-(6,7-dimethoxy-3-oxo-3*H*-benzopyran) propanová kyselina (Dmca) (Obr. 14a) byla použita pro kvantitativní detekci syntetických peptidů (Bennett et al., 1999). Dmca má absorpční maximum o vlnové délce 345 nm a emisní maximum při 440 nm a navíc vykazuje vysoký kvantový výtěžek ($\Phi_F = 0,52$) a vysoký molární absorpční koeficient ($\epsilon = 10900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Peptidy označené pomocí Dmca bylo možno detekovat v pikomolárních koncentracích, což je citlivost srovnatelná se značením pomocí radioaktivních izotopů.

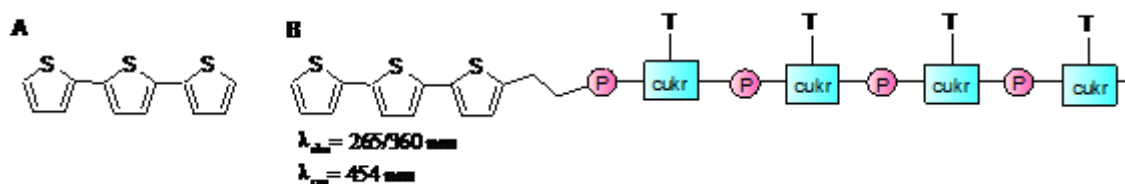


Obr. 14. Příklady fluorescenčních derivátů kumarinu. A/ Dmca, B/ 7-ethoxykumarin-3-karboxylová kyselina, C/ 7-diethylaminokumarin-3-karboxylová kyselina.

Berthelot et al. (2004) použili dva deriváty kumarinu ke značení lysinu, a to 7-ethoxykumarin-3-karboxylovou kyselinu a 7-diethylaminokumarin-3-karboxylovou kyselinu (Obr. 14b a 14c), které byly prvně aktivovány pomocí *N*-hydroxysuccinimidu. Předpokládá se, že vzniklé produkty mohou sloužit jako fluorescenční stavební bloky pro syntézu peptidů na pevné fázi (Berthelot et al., 2004).

3.2.1.2 Fluorescenční značky se sirnými heterocykly

Oligothiofeny jsou sloučeniny s autofluorescencí, jejíž vlastnosti mohou být synteticky lehce pozměněny. Capabianco et al. ukázali poprvé použití oligothiofenu (terthiofen) jako fluorescenčního tagu pro oligonukleotidy, kde došlo k připojení přes fosfátovou skupinu. Vzniklý konjugát (15b) vykazoval absorpční maxima při 265 nm a 360 nm a emisní maximum při 454 nm (měřeno ve vodě) (Capabianco et al., 2005).



Obr. 15. Fluorescenční značky se sirnými heterocykly. A/ terthiofen, B/ oligonukleotid značený pomocí terthiofenu (podle Gonçalves, 2009).

3.2.1.3 Fluorescenční značky s dusíkatými heterocykly

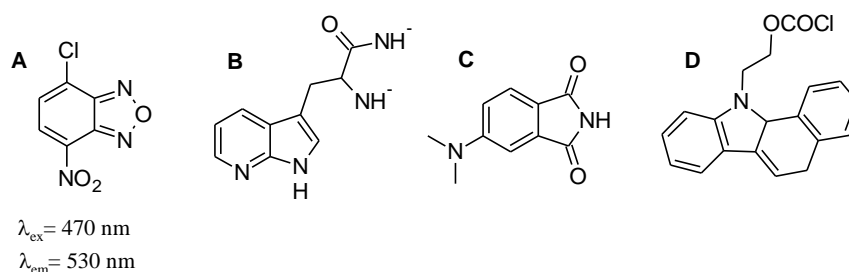
Jsou známy dvě skupiny fluorescenčních derivatizačních činidel pro aminokyseliny a peptidy, a to benzoaxiazoly a 4,7-fenantrolin-5,6-diony (phanquinony).

Benzoaxiazol substituovaný v poloze 4 a 7 (4-chloro-7-nitrobenzoaxiazol, NBD-Cl) je známou značkou používanou pro fluorescenční značení aminokyselin a proteinů. Jeho excitační maximum se pohybuje kolem 470 nm a emisní kolem 530 nm (Gonçalves, 2009).

Pomocí NBD-Cl byl také označen cytokinin močovinného typu, konkrétně *N*-(3-karboxyfenyl)-*N'*-(pyrid-4-yl)močovina (viz 1.3.2.).

Mezi další fluorescenční značky s dusíkatými heterocykly patří 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl chloroformiát (BCEOC) a 7-azatryptofan (AW). Druhý zmíněný vykazuje zajímavé optické vlastnosti a je využíván pro sledování proteinové struktury (Schlesinger, 1968), stability (Wong et Eftink, 1997), interakcí mezi makromolekulami (Mohammadi et al., 2001) a proteinových konformačních změn (Blouse et al., 2002). Ve srovnání s tryptofanem vykazuje AW díky dusíkatému atomu v pozici 7 posun v absorpci o 10 nm a v emisním spektru o 46 nm.

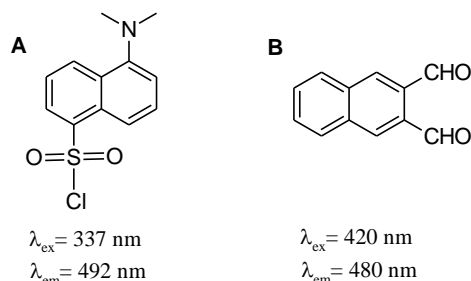
4-(*N,N*-dimethylamino)ftalimid (4-DMAP) je velmi citlivou fluorescenční značkou, jejíž optické vlastnosti závisí na polaritě a viskozitě prostředí. Změnou rozpouštědla z vody do 1,4-dioxanu došlo ke zvýšení kvantového výtěžku a fluorescenční maximum se posunulo až o 100 nm (Soujanya et al., 1996).



Obr. 16. Příklady fluorescenčních látek s dusíkatým heterocyklem. A/ NBD-Cl, B/ AW, C/ 4-DMAP, D/BCEOC.

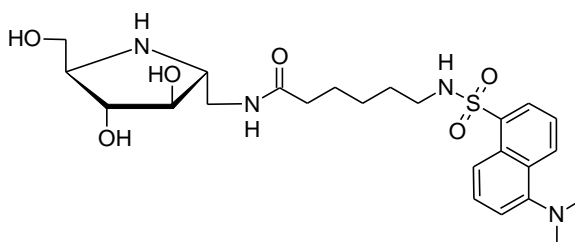
3.2.1.4 Fluorescenční značky s naftalenovým jádrem

Dansyl chlorid a naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA) patří mezi fluoroproby s naftalenovým jádrem vhodné pro značení aminokyselin, peptidů a proteinů (Chersi et al., 1997).



Obr. 17. Příklady fluorescenčních látek s naftalenovým jádrem. A/ Dansyl chlorid, B/ NDA.

V roce 2001 Hermetter et al. použili dansyl chlorid pro značení velmi účinného inhibitoru β -glukosidasy z *Agrobacterium* sp. V prvním kroku bylo na fluorofor připojeno oddalovací ramínko reakcí dansyl chloridu s methyl 6-aminohexanoátem. Po alkalické hydrolyze esteru byl na vzniklou volnou karboxy skupinu připojen 1-amino-1,2,5-trideoxy-2,5-imino-D-mannitol. Vzniklý produkt (Obr. 18) byl využit pro sledování kinetických parametrů β -glukosidasy pomocí fluorescenčních spektrometrických metod (Hermetter et al., 2001).

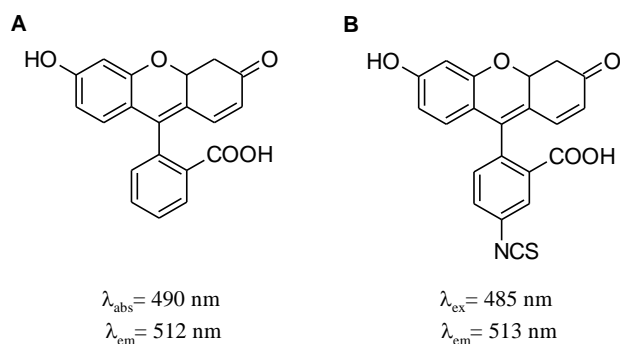


Obr. 18. 1-amino-1,2,5-trideoxy-2,5-imino-D-mannitol značený pomocí dansyl chloridu s využitím oddalovacího ramínka.

3.2.2 Organické fluoroproby s emisí nad 500 nm

3.2.2.1 Fluoresceiny

Fluorescein se řadí mezi nejběžnější fluoroproby používané v biologických aplikacích. Jedná se o polycyklický fluorofor s absorpčním a emisním maximem o hodnotách 490 nm a 512 nm. Fluorofory odvozené od fluoresceinu a jejich vysokomolekulární konjugáty mají také nevýhody, a to například relativně vysokou rychlost fotobleachingu, pH-senzitivní fluorescenci nebo poměrně široké fluorescenční emisní spektrum, omezující jejich použití s více fluorofory zároveň, a v neposlední řadě jejich tendenci ke samozhášení (Gonçalves, 2009).

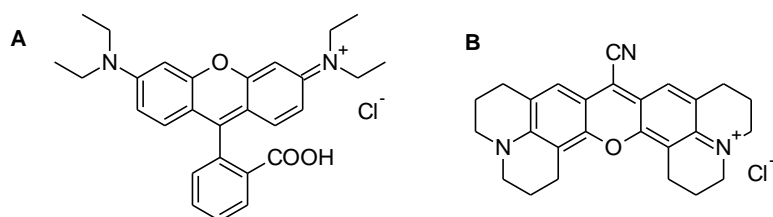


Obr. 19. Příklady fluoresceinů. A/ fluorescein, B/ fluorescein isothiokyanát.

3.2.2.2 Rhodaminy

Rhodaminy patří mezi nejstarší syntetická barviva používaná pro barvení textilií. Jsou toxické, rozpustné ve vodě, ethanolu a methanolu a svou strukturou patří mezi xanthenovou skupinu barviv. Obecně mají vysokou molární absorpci ve viditelné oblasti spektra a mnoho derivátů vykazuje silnou fluorescenci. Substituenty připojené na xanthenové jádro silně ovlivňují absorpční a emisní vlastnosti. Rhodaminová barviva našla využití nejen jako textilní pigment, ale také jako fluorescenční barviva pro studování struktury látek v mikroskopii, fotosenzitizérů a laserových barviv.

Rhodamine 800 a Texaská červeň patří mezi moderní rhodaminové deriváty používané výhradně v bioanalytických aplikacím. Jako další xanthenové fluorofory lze zmínit Rhodamin G6, Rhodamine 123, Rhodamin B nebo Rhodamin 110 používané pro biologické aplikace (Gonçalves, 2009).



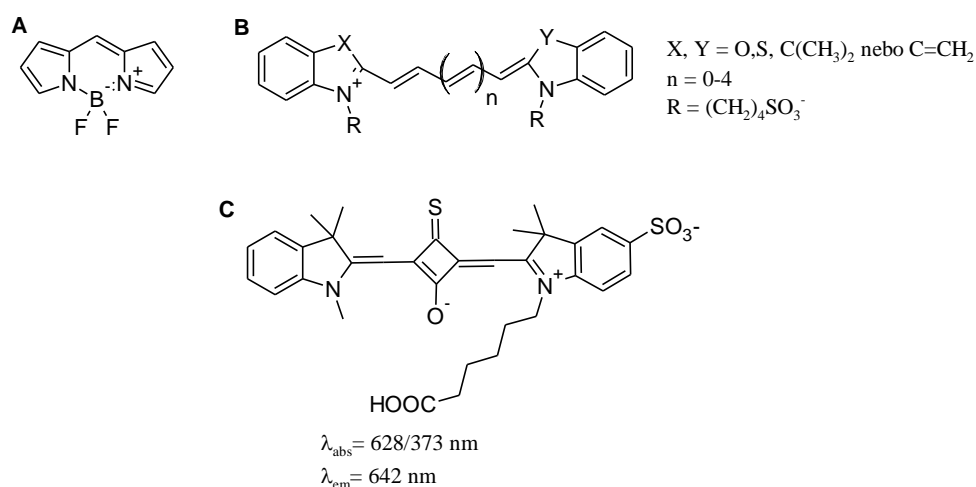
Obr. 20. Příklady rhodaminů. A/ Rhodamin B, B/ Rhodamin 800.

Gilad G. M. a Gilad V. H. lokalizovali ornithin dekarboxylasu (ODC) v myších pomocí Rhodaminu B. Fluorescenční značka byla ireverzibilně navázána na inhibitor α -difluoromethylornithin (α -DMFO) a následně vpravena do mozku a jater pokusných zvířat. Značený inhibitor byl úspěšně cytochemicky lokalizován uvnitř specifických myších mozkových a jaterních buněk (Gilad G. M. et Gilad V. H., 1980).

3.2.2.3 Další fluorescenční značky

Mezi další neméně důležité fluorescenční značky patří BODIPY (Obr. 21a). Strukturně se jedná o molekulu 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu, kterou lze v pozicích 1, 3, 5, 7 a 8 modifikovat za vzniku různých BODIPY fluoroprob. Komerčně dostupné BODIPY fluoroznačky se používají pro značení peptidů, proteinů, oligonukleotidů a lipidů.

Squarainy (Obr. 21c) jsou fluorescenční značky vykazující fluorescenci v oblasti blízké IR oblasti s absorpčním maximem od 630 – 670 nm a emisním maximem od 650 – 700 nm. V současné době se používají jako senzory pro detekci iontů.



Obr. 21. Příklady dalších používaných fluorescenčních značek. A/BODIPY, B/ kyaniny, C/ squarain.

Další zajímavou skupinou fluorescenčních značek jsou kyaniny (Obr. 21b), jejichž základní struktura se skládá z dvou aromatických a heterocyklických kruhů spojených polymethinovým řetězcem. Uplatnění našly nejen v genetické analýze a DNA sekvencování, ale také v in vivo imagingu či proteomice. Kyaniny jsou považovány za hlavní zdroj organických fluoroznaček s excitačním rozsahem mezi 600-900 nm (Gonçalves, 2009).

Experimentální část

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Fluorescenční značky Rhodamin B, kumarin-3-karboxylová kyselina, fluorescein isothiokyanát (FITC), 4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol (NBD-Cl), 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonyl chlorid (dansyl chlorid) a dále *N*-hydroxysukcinimid, MUG, IPTG a glycin byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, NaHCO₃, Na₂SO₄, DCC od firmy Merck. Triethylamin, MeOH, ACN, DMSO, CHCl₃, PrOH, NaCl, Na₂CO₃ byly získány od firmy Lach-Ner. Aktivní uhlí, CaCl₂ bylo zakoupeno od firmy Penta. 3-Methylbut-2-en-1-amin hydrochlorid byl připraven v Laboratoři růstových regulátorů UP a 2,6-dichlorpurin byl pořízen od firmy Olchemim. Během experimentů byla používána demi voda.

Rozpouštědla byla vysušena dle literatury (Williams et Lawton, 2010) nad aktivovaným molekulovým sítem (20 % m/v) pod inertní atmosférou a CaCl₂ zátkou po dobu 72 hodin. 3 Å molekulové síto (Sigma Aldrich) bylo aktivováno 24 hodinovým sušením v muflové peci při 300 °C.

4.2 Metody

Pro sledování průběhu reakcí a orientační čistoty produktů byla použita analytická tenkovrstvá chromatografie (TLC) na hliníkových foliích Merck Silikagel 60 F₂₅₄ za použití mobilní fáze CHCl₃:MeOH (4:1), *n*-propanol:NH₃:H₂O (55:10:35, pro **2** a **3**). Vizualizace TLC byla provedena pod UV lampou (Camag) při vlnové délce λ 254 nm nebo 366 nm. Prekurzory pro fluorescenční značení byly vizualizovány pomocí ninhydrinu. Látka **9** byla purifikována s využitím sloupcové chromatografie na silikagelu Davisil 40-63 micron (Grace Davison,) a eluována směsí CHCl₃:MeOH (15:1).

Vybrané připravené látky byly přečištěny pomocí preparativní chromatografie na koloně XBridge Prep C18 velikosti 100 x 10 mm s pórovitostí 5 μ m. Separace byla provedena methanolickým gradientem (0' – 80 % A; 25' – 5 % A; 30' – 5 % A; 31' – 80 % A; 40' – 80 % A) o průtoku 4,5 mL/min. Mobilní fázi A tvořila voda, mobilní fázi B MeOH. Jednotlivé složky byly detekovány UV detektorem při 254 nm.

Bod tání byl změřen na bodotávku Stuart SMP30 a zjištěné hodnoty nebyly korigovány.

Čistota připravených produktů byla změřena s použitím vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC Alliance 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA, USA) na koloně C18 Symmetry (Waters) o průměru 2.1 mm a délky 150 mm s pórovitostí 5 μ m. Vzorek byl rozpuštěn v MeOH (1 mg/mL) a naředěn 100 násobně do počáteční mobilní fáze (objem nastříknutého vzorku – 10 μ l). Separace byla provedena methanolickým gradientem (0' – 90% A; 25' – 10% A; 35' – 10% A; 36' – 90% A; 45' – 10% A) o průtoku 0.25 mL/min.

Mobilní fázi A tvořil 15 mM mravenčan amonný (pH = 4.0), mobilní fázi B MeOH. Složky byly detekovány DAD detektorem (PDA 2996, Waters) v rozmezí 210 – 400 nm.

Pro účely identifikace produktů pomocí LC-MS byl eluát z kolony veden do hmotnostního spektrometru ZMD 2000 (Micromass, Manchester, UK). Iontový zdroj (ESI) byl vyhříván na teplotu 120°C, desolvatační teplota byla 300°C. Dusík byl použit jako desolvatační i zmlžovací plyn. Ionizace byla dosažena kapilárním napětím 3.0 kV a napětím na vstupní štěrbině 20 V. Měření bylo prováděno pozitivním (ESI+) FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-850.

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla změřena na přístroji Bruker Avance 300 MHz, pracující při frekvenci 300,13 MHz (^1H). Vzorčky byly připraveny rozpuštěním v DMSO- d_6 a CDCl_3 .

Spektrální vlastnosti vybraných látek byly změřeny na spektrofotometru Synergy H4 hybrid reader (BioTek) při 28 °C. Pro měření byl připraven roztok o koncentraci 100 μM rozpuštěním v DMSO.

4.2.1 Cytokininové biotesty

Amaranthový biotest

Vybrané připravené látky byly testovány v amaranthovém cytokininovém biotestu, ve kterém je sledována indukce biosyntézy betacyaninu v kotyledonu a hypokotylu *Amaranthu* ve tmě. Biotest byl proveden podle protokolu uvedeném v publikaci Holub et al. (1998).

4.2.2 Receptorové testy

Kompetiční test

Kompetiční test je založen na kompetici radioaktivně značeného tZ ($[2\text{-}^3\text{H}]$ tZ) a testované látky, kdy je měřena zbytková radioaktivita navázaného triciovaného tZ na receptor. Vybrané připravené látky byly testovány podle protokolu uvedeném v publikaci Romanov et al. (2005).

β -galaktosidasový test

β -galaktosidasový test byl proveden podle postupu uvedeném v publikaci (Spíchal et al., 2004). Pro testování vybraných připravených látek byla použita kultura *E. coli* obsahující plasmid KMI-001-pIN-III (kódující cytokininové receptory ZmHK1, ZmHK3a nebo CRE1/AHK4). Kultury byly poskytnuty Dr. T. Mizunou (Nagoya, Japonsko).

Při přípravě bakteriální pre-kultury bylo odebráno malé množství (cca 10 μL) zásobní kultury *E. coli* KMI001-pINIII a přeneseno do zkumavky s 3 mL M9 média. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 25 °C a 300 rpm.

Testované látky a iP (standard) byly naředěny DMSO. Do falkonky o objemu 50 mL byl připraven pre-mix nalitím 20 mL M9 média, připipetováním 34 μ L pre-kultury *E. coli* (ZmHK1 nebo ZmHK3a) a 20 μ L ampicilinu (100 mg/mL v demi vodě). Pro indukci ZmHK1a bylo do falkonky přidáno 0,5 μ L 25 μ M IPTG. Měření bylo prováděno v triplicátech a minimálně dvou opakováních v 96-jamkové destičce. Do jamek byla připravena koncentrační řada testovaných látek (50 μ M, 10 μ M, 2 μ M, 0,4 μ M, 80 nM, 16 nM, 3,2 nM a 0,64 nM – finální koncentrace) v celkovém objemu 200 μ L. Destička byla kultivována 17 hodin při 25 °C a 450 rpm.

Do čisté 96-jamkové destičky bylo napipetováno 5 μ L 10 mM MUG a bylo přidáno 50 μ L reakční směsi z kultivační destičky připravené v předešlém kroku. Destička byla inkubována 20 minut při 37 °C za tmy. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ L Stop pufru (132 mM glycin a 83 mM Na₂CO₃, pH 10,7) a byla proměřena fluorescence na destičkovém spektrofotometru Synergy H4 hybrid reader (BioTek).

4.3 Syntéza

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

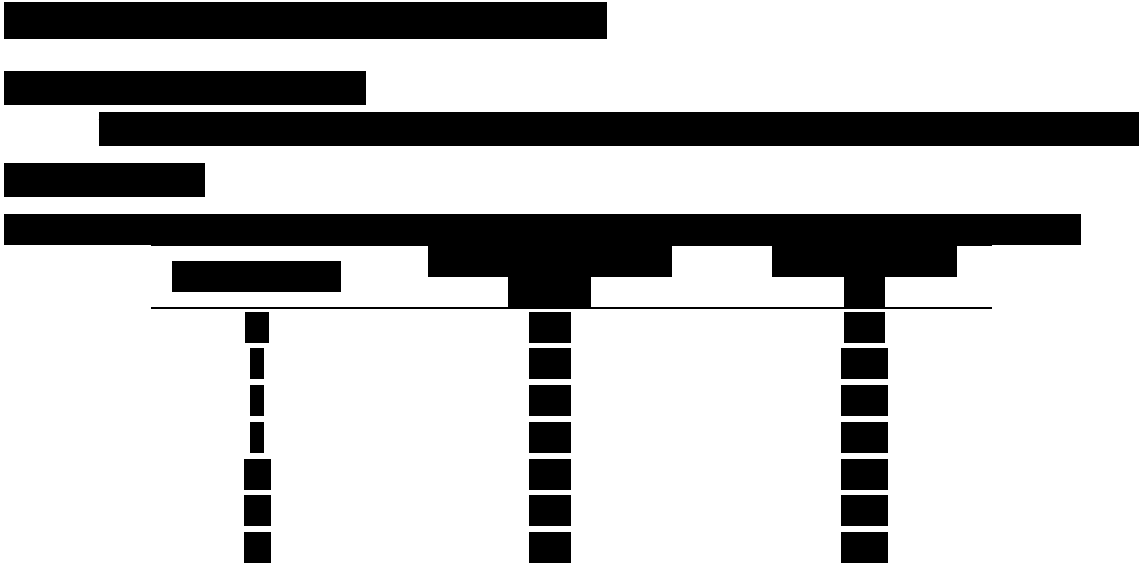
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

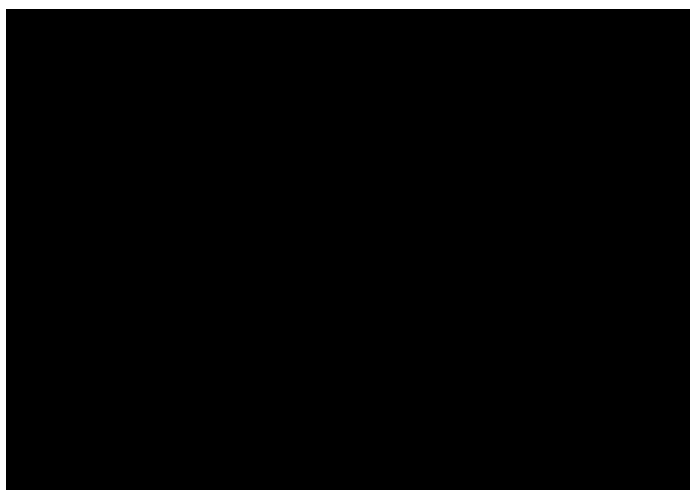
[REDACTED]



[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text line]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text line]

[Redacted text block]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

6 Závěr

V teoretické části práce byla provedena literární rešerše o cytokininech, derivátech rostlinných hormonů cytokininů značených fluorescenčními značkami, signální kaskádě a přehledu malých organických fluoroprob. V praktické části byly připraveny dva deriváty *N*⁶-isopentenyladeninu substituované v poloze C2 na purinovém skeletu alifatickým postranním řetězcem zakončeným primární aminoskupinou, na kterou bylo následně připojeno pět různých fluorescenčních značek (Rhodamin B, kumarin-3-karboxylová kyselina, fluorescein isothiokyanát, dansyl chlorid a 4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol).

Vybrané připravené látky byly testovány na cytokininovou aktivitu ve standardním amarantovém biotestu a na interakci s cytokininovými receptory (CRE1/AHK4, ZmHK1, ZmHK3a). V amarantovém testu vykazovala nejvyšší cytokininovou aktivitu látka **12**. Pomocí kompetičního testu bylo zjištěno, že látka **6** je vhodným vazebným partnerem a její schopnost vázat se do receptoru CRE1/AHK4 roste se zvyšující se koncentrací. Navíc tato látka vykazovala nejvyšší aktivitu v β -galaktosidasovém testu na cytokininovém receptoru ZmHK1 a CRE1/AHK4.

Na základě výše zmíněných receptorových testů a výsledků s využitím fluorescenčně značených derivátů kyseliny abscisové a giberelinové je možné připravené látky použít pro *in vivo* lokalizaci cytokininových receptorů nebo pro studium kinetických parametrů mezi cytokinin-vazebnými proteiny a připravenými fluorescenčními látkami. Výsledky této práce jsou součástí připravované publikace.

7 Literatura

- Asami T., Tao L., Yamamoto S., Ichinose K., Nakano T., Min Y.-K., Murofushi N., Yoshida S. (1997) Visualisation of binding of bioactive fluorescence-labeled abscisic acid to barley aleurone protoplasts. *RIKEN Review* **15**, 43-44.
- Bartzatt R. (2001) Fluorescent labeling of drugs and simple organic compounds containing amine functional groups, utilizing dansyl chloride in Na₂CO₃ buffer. *J. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 247-253.
- Bault M., Maldiney R., Miginiac E. (1997) Cytokinin-binding proteins. *Physiol. Plant.* **100**, 520-527.
- Bennett F. A., Barlow D. J., Dodoo A. N. O., Hider R. C., Lansley A. B., Lawrence M. J., Marriott Ch., Bansal S. S. (1999) Synthesis and properties of (6,7-dimethoxy-4-coumaryl)alanine: a fluorescent peptide label. *Anal. Biochem.* **270**, 15-23.
- Berthelot T., Lähn G., Latxague L., Déleris G. (2004) Synthesis of novel fluorogenic L-Fmoc lysine derivatives as potential tools for imaging cells. *J. Fluoresc.* **14**, 671-675.
- Blouse G. E., Perron M. J., Thompson J. H., Day D. E., Link Ch. A., Shore J. D. (2002) A concerted structural transition in the plasminogen activator inhibitor-1 mechanism of inhibition. *Biochemistry* **41**, 11997-12009.
- Capabianco M. L., Naldi M., Zambianchi M., Barbarella G. (2005) Oligothiophene phosphoramidites for oligonucleotide labelling. *Tetrahedron Lett.* **46**, 8181-8184.
- Cline M. G. (1991) Apical dominance. *Bot. Rev.* **57**, 318-346.
- Davies P. J. (2004) The plant hormones: their nature, occurrence, and function. In *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd Edition (Davies P. J., ed.), pp. 7-8, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Eisinger W. (1976) Role of cytokinins in carnation flower senescence. *Plant Physiol.* **59**, 707-709.
- Fujimoto Y., Nagata R., Fukasawa H., Yano K., Azuma M., Iida A., Sugimoto S., Shudo K., Hashimoto Y. (1998) Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur. J. Biochem.* **258**, 794-802.
- Gan S., Amasino R. M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Gan S., Amasino R. M. (1996) Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play. *Bioassays* **18**, 557-565.
- Gilad G. M., Gilad V. H. (1980) Cytochemical localization of ornithine decarboxylase with rhodamine or biotin-labeled α -difluoromethylornithine. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 687-692.

- Gonçalves M. S. T. (2009) Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem. Rev.* **109**, 190-212.
- Grayburn W. S., Green P. B., Steucek G. (1982) Bud induction with cytokinin: A local response to local application. *Plant Physiol.* **69**, 682-686.
- Hamaguchi N., Iwamura H., Fujita T. (1985) Fluorescent anticytokinins as a probe for binding. Isolation of cytokinin-binding proteins from the soluble fraction and identification of a cytokinin-binding site on ribosomes of tobacco callus cells. *Eur. J. Biochem.* **153**, 565-572.
- Harrison M. A., Kaufman P. B. (1980) Hormonal regulation of lateral bud (tiller) release in oats (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol.* **66**, 1123-1127.
- Heindl J. C., Carlson D. R., Brun W. A., Brenner M. L. (1982) Ontogenetic variation of four cytokinins in soybean root pressure exudate. *Plant Physiol.* **70**, 1619-1625.
- Hermetter A., Scholze H., Stütz A. E., Withers S. G., Wrodnigg T. M. (2001) Powerful probes for glycosidases: novel, fluorescently tagged glycosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1339-1342.
- Heyl A., Schmülling T. (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 480-488.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998) Biological activity of cytokinins derived from *Ortho*- and *Meta*-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regul.* **26**, 109-115.
- Hothorn M., Dabi T., Chory J. (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 766-768.
- Hwang I., Sheen J. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Chersi A., di Modugno F., Rosanò L. (1997) Selective 'in synthesis' labelling of peptides by fluorochromes. *Biochim. Biophys Acta* **1336**, 83-88.
- 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. (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.
- Lomin S. N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G. A., Sakakibara H. (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J. Exp. Bot.* **62**, 5149-5159.
- Mähönen A. P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K. M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98.

- Mason M. G., Li J., Mathews D. E., Kieber J. J., Schaller G. E. (2004) Type-B response regulators display overlapping expression patterns in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **135**, 927-937.
- Mayak S., Halevy A.H. (1969) Cytokinin activity in rose petals and its relation to senescence. *Plant Physiol.* **46**, 497-499.
- Meng Q., Yu M., Zhang H., Ren J., Huang D. (2007) Synthesis and application of *N*-hydroxysuccinimidyl rhodamine B ester as an amine-reactive fluorescent probe. *Dyes Pigments* **73**, 254-260.
- Mik V. (2012) Synthesis and characterization of novel compounds interacting with metabolic pathways of plant hormones cytokinins. Structure-activity relationship. Disertační práce.
- Miller C. O. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392.
- Miller C. O. (1955) Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2662-2663.
- Miller C. O. (1961) A kinetin-like compound in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**, 170-174.
- Mohammadi F., Prentice G. A., Merrill A. R. (2001) Protein-protein interaction using tryptophan analogues: novel spectroscopic probes for toxin-elongation factor-2 interactions. *Biochemistry* **40**, 10273-10283.
- Pasternak O., Bujacz G. D., Fujimoto Y., Hashimoto Y., Jelen F., Otlewski J., Sikorski M. M., Jaskolski M. (2006) Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. *Plant Cell* **18**, 2622-2634.
- Pulici M., Asami T., Robertson M., Seto H., Yoshida S. (1996) Amylase induction activity of fluorescein labeled gibberelin in barley aleurone protoplasts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 2549-2552.
- Quirino B.F., Noh Y.-S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* **5**, 278-282.
- Rashotte A. M., Mason M. G., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. (2006) A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 11081-11085.
- Richmond A. E., Lang A. (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**, 650-651.
- Romanov G. A. (2009) How do cytokinins affect the cell? *Russ. J. Plant Physiol.* **56**, 268-290.
- Romanov G. A., Spichal L., Lomin S. N., Strnad M., Schmülling T. (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal. Biochem.* **347**, 129-134.
- Shaner N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905-909.

- Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223-239.
- Schlesinger S. (1968) The effect of amino acid analogues on alkaline phosphatase formation in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **243**, 3877-3883.
- Schmülling T. (2004) Cytokinin. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Eds. Lennarz., W., Lane, M. D.), pp. 562-567, Academic Press/ Elsevier Science.
- Smigocki A. C., Owens L. D. (1988) Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 5131-5135.
- Soujanya T., Fessenden R. W., Samanta A. (1996) Role of nonfluorescent twisted intramolecular charge transfer state on the photophysical behavior of aminophthalimide dyes. *J. Phys. Chem.* **100**, 3507-3512.
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling T. (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299-1305.
- Sprecker M. A., Morrice A. G., Gruber B. A., Leonard N. J. (1976) Fluorescent cytokinins: stretched-out analogs of *N*⁶-benzyladenine and *N*⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenine. *Phytochemistry* **15**, 609-613.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.
- Tanaka Y., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T. (2004) Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 462-465.
- Taniguchi M., Kiba T., Sakakibara H., Ueguchi Ch., Mizuno T., Sugiyama T. (1998) Expression of Arabidopsis response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *Febs Lett.* **429**, 259-262.
- To J. P. C., Kieber J. J. (2007) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci.* **13**, 85-92.
- Ueguchi Ch., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 231-235.
- Ueguchi Ch., Sato S., Kato T., Tabata S. (2001) The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 751-755.
- van Staden J., Zažímalová E., Georgie E. F. (2008) Cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition* (George E. F., Hall M. A., De Klerk G.-J., eds.), pp. 205-226, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

- Williams D. B. G., Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.
- Wong C.-Y., Eftink M. R. (1997) Biosynthetic incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease: Effect of 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan on structure and stability. *Protein Sci.* **6**, 689-697.
- Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmülling T. (2011) The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the Endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **156**, 1808-1818.
- Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiol.* **134**, 1654-1661.
- Zawadski P., Ślósárek G., Boryski J., Wojtaszek P. (2010) A fluorescence correlation spectroscopy study of ligand interaction with cytokinin-specific binding protein from mung bean. *Biol. Chem.* **391**, 43-53.

8 Seznam zkratek

4-DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)ftalimid
4PU	<i>N</i> -(3-karboxyfenyl)- <i>N'</i> -(pyrid-4-yl)močovina
ACN	acetonitril
AHK	histidinkinasa z <i>A. thaliana</i>
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidine phosphotransfer proteins
ARR	regulátory odpovědi z <i>A. thaliana</i> (<i>Arabidopsis</i> response regulator)
AW	7-azatryptofan
BA	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin
BAMPP	4- <i>n</i> -butylamino-2-methylthiopyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin
BCEOC	1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl chloroformiát
BODIPY	4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacen
CK	cytokininy
CPPU	<i>N</i> -fenyl- <i>N'</i> -(2-chlor-4-pyridyl)močovina
CRF	cytokinin response factor
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DHZ	dihydrozeatin
Dmca	2-amino-3-(6,7-dimethoxy-3-oxo-3 <i>H</i> -benzopyran) propanová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
DPU	<i>N,N'</i> -difenylmočovina
ekv.	ekvivalent
Et ₃ N	triethylamin
EtOAc	ethyl acetát
FITC	fluorescein isothiokyanát
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
hod	hodina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
iP	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin
IPTG	isopropyl-β-D-thio-galaktosid
Kin	kinetin
MeOH	methanol
MUG	4-methylumbelliferyl galaktosid
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin

NAA	kyselina 1-naftyloctová
NBD-Cl	4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol
<i>o</i> T	<i>orto</i> -topolin
PrOH	propanol
<i>p</i> T	<i>para</i> -topolin
RS	reakční směs
RT	teplota místnosti
RVO	rotační vakuová odparka
TDZ	thidiazuron
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)
<i>t</i> Z	<i>trans</i> -zeatin
<i>ipt</i>	adenylát isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27)
wt	wild type
ZmHK	histidinkinasa z kukuřice (<i>Zea mays</i> histidine kinase)