



**Vliv modulace hladin cytokininů na fenom a proteom
rostlin**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Mgr. Jan Novák, Ph.D.

Vypracovala:
Vladěna Koukalová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Vliv modulace hladin cytokininů na fenom a proteom rostlin

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Především bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Janu Novákovi, Ph.D., za jeho vstřícné a trpělivé jednání, za veškeré rady, připomínky a odborné vedení při psaní této práce. Velké poděkování patří i mému konzultantovi Mgr. Martinu Černému, Ph.D., za jeho rady a pomoc především při zpracování proteomické části. Všem pracovníkům ústavu Molekulární biologie a radiobiologie Mendelovy univerzity v Brně děkuji za přátelské prostředí a za možnost se na ně kdykoliv obrátit s prosbou o pomoc či radu.

Své rodině a nejbližším přátelům děkuji za jejich veškerou podporu při studiu a psaní této práce.

ABSTRAKT

Limitujícími prvky zemědělské produkce jsou zejména negativně působící biotické a abiotické stresory prostředí. Jejich dopady se snaží minimalizovat molekulárně genetické přístupy, které hledají řešení v geneticky modifikovaných organismech s vyšší odolností. Současná legislativa však velice limituje využití GMO, a proto se rovněž hledají jiné cesty, jak docílit stejných účinků. Jednou z cest je hledání farmak, které budou mít pozitivní vliv na obranu rostlin proti stresorům prostředí. Tato práce je věnována charakterizaci látky INCYDE, která blokuje degradaci rostlinných hormonů cytokininů, které jsou známy svými pozitivními účinky na oddalování stárnutí rostlin a zvýšení odolnosti rostlin vůči extrémnímu suchu. Klasickou bioesejí sledováním délky hlavního kořene bylo prokázáno, že působení látky INCYDE je srovnatelné s působením jednoho z neaktivnějších cytokininů *trans*-zeatinu. Analýzou linií s pozměněnou signalizací kanonické signalizační dráhy cytokininů bylo ověřeno, že pro změny sledovaných morfologických parametrů nevyužívají INCYDE a *trans*-zeatin rozdílných složek cytokininové signalizace. Navzdory tomu, že mají INCYDE a *trans*-zeatin podobné účinky, analýza proteomu odhalila odlišnosti v působení těchto látek. Tyto rozdíly budou předmětem následných analýz.

Klíčová slova: cytokininy, INCYDE, morfologie, proteomika, hmotnostní spektrometrie

ABSTRACT

Negative effects of biotic and abiotic stressors of the environment are limiting factors for agricultural production. To minimize the effect of these factors, molecular genetics focuses on preparing the new genetically modified organisms with higher tolerance to stress. However, recent legislation strongly limits the use of GMO and thus new approaches focused on similar outcomes are followed. One of these approaches is developing of new pharmaceuticals with positive effects on plant tolerance to environmental stressors. This thesis is focused on the characterization of such substance called INCYDE. INCYDE inhibits degradation of plant hormones cytokinins, which are known to have positive effects on delaying senescence and tolerance to extreme drought conditions. In the classical bioassay based on inhibition of the main root growth, INCYDE was shown to be active as one of the most active cytokinin *trans*-zeatin. Analysis of the lines with modified canonical cytokinin signalling pathway showed INCYDE and *trans*-zeatin to act by same signalling components. Despite the fact of similar effects on morphological alterations, proteom analysis revealed differences in the effect of INCYDE and *trans*-zeatin on protein abundance. Differences on the proteom level will be analyzed in following study.

Key words: cytokinin, INCYDE, morphology, proteomics, mass spectrometry

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
3.1	ROSTLINNÉ HORMONY	8
3.2	CYTOKININY.....	9
3.2.1	<i>Objev cytokininů</i>	9
3.2.2	<i>Chemická podstata cytokininů</i>	10
3.2.3	<i>Biosyntéza cytokininů</i>	12
3.2.4	<i>Metabolismus a degradace cytokininů</i>	14
3.2.5	<i>Signální dráha cytokininů</i>	16
3.2.6	<i>Deriváty cytokininů</i>	18
3.2.7	<i>Funkce cytokininů</i>	19
3.3	PROTEOMIKA.....	20
3.3.1	<i>Příprava vzorků, extrakce</i>	21
3.3.2	<i>Metody analýzy proteomu</i>	22
4	MATERIÁL A METODIKA	23
4.1	ROSTLINNÝ MATERIÁL A JEHO KULTIVACE.....	23
4.2	HOMOGENIZACE A EXTRAKCE PROTEINŮ.....	24
4.3	DIGEST	25
4.4	ODSOLENÍ A PŘÍPRAVA PRO LC-MS ANALÝZU	25
4.5	LC-MS ANALÝZA.....	25
4.5.1	<i>Změření a zpracování MS spekter</i>	26
4.5.2	<i>Statistické zpracování</i>	26
4.5.3	<i>Změření a zpracování MS/MS spekter</i>	26
4.5.4	<i>Analýza dat v programu Skyline</i>	27
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	28
5.1	POROVNÁNÍ Vlivu TZ A INCYDEU NA MORFOMETRICKÉ PARAMETRY SEMENÁČKŮ ARABIDOPSIS THALIANA	29
5.2	POROVNÁNÍ Vlivu TZ A INCYDEU NA LINIE S POZMĚNĚNOU CYTOKININOVOU SIGNALIZACÍ	32
5.3	ROSTLINNÝ MATERIÁL PRO PROTEOMICKOU ČÁST.....	35
5.4	PROTEOMICKÁ ANALÝZA A JEJÍ NÁSLEDNÉ VYHODNOCENÍ.....	36
6	ZÁVĚR	40
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	41
8	SEZNAM ZKRATEK	48
9	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	50

1 ÚVOD

V dnešní době se stále více mluví o klimatických změnách, které ovlivňují život organismů na Zemi. Rostliny stále častěji čelí nepříznivým podmínkám, které nejsou pro jejich život typické. Mezi největší problémy bezesporu patří sucho a stres způsobený vysokými teplotami. Z hlediska zemědělství se jedná o limitující faktory, které negativně ovlivňují především kvalitu a výnos hospodářských plodin.

Jedním z nástrojů pro řešení problémů současného zemědělství, jako je stres způsobený suchem, popřípadě jinými biotickými a abiotickými stresory, se stala modulace hladin významných enzymů regulujících hladiny hormonů, významných metabolitů či vysoce reaktivních látek zapojených do odpovědi na stres. Tohoto přístupu se ujaly metody genového inženýrství, které jsou na rozdíl od klasické metody šlechtění rychlejší a méně finančně náročné. Pomocí biotechnologií lze tak „na míru“ připravit rostliny s genetickými modifikacemi, které zlepšují biologickou zdatnost a výnosy plodin. Genetické modifikace a pěstování geneticky modifikovaných rostlin jsou však neustále předmětem diskuse vědců, politiků, veřejnosti a dalších skupin. Zatímco většina vědců vidí v genetických modifikacích cestu k rychlému řešení současných problémů se zemědělstvím, veřejnost se těchto přístupů spíše obává a vnímá je negativně. Proto se vedle molekulárně genetických přístupů hledají i alternativní cesty, které by docílily stejných výsledků. Jednou z těchto alternativ je příprava inhibitorů ovlivňujících biosyntézu či degradaci látek zájmu. V polních podmínkách pak aplikace těchto inhibitorů ve formě postřiku může zvyšovat či snižovat hladinu látek zájmu v rostlinném těle, samozřejmě za předpokladu, že inhibitory nebudou představovat žádné riziko pro ekosystém a člověka.

Experimenty spojené s účinky inhibičních látek se zkoumají například u rostlinných hormonů cytokininů. Cytokininy jsou z hlediska zemědělské produkce velice zajímavé pro své vlastnosti, mezi které patří například oddalování stárnutí či zvyšování odolnosti rostlin vůči extrémnímu suchu.

V rámci této práce byl testován vliv inhibitoru enzymu cytokinin oxidázy/dehydrogenázy na fenotypové změny modelové rostliny Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo zpracovat literární rešerši současného poznání biosyntézy, metabolismu, degradace, signalizace a funkcí rostlinných hormonů cytokininů. Praktická část se zaměřila na sledování účinku nedávno objevené látky INCYDE, která působí jako inhibitor enzymů zapojených do degradace cytokininů. Cílem bylo popsat účinky této látky na změnu morfologie a proteomu *Arabidopsis thaliana* a porovnat působení INCYDEu s exogenním navýšením hladiny cytokininů pomocí *trans*-zeatinu. Na základě výsledků bylo hodnoceno, nakolik se liší účinek exogenní aplikace rostlinných hormonů od aplikace inhibitorů jejich degradace.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rostlinné hormony

Vzhledem ke své složitosti by mnohobuněčné organismy nemohly fungovat bez komunikace mezi buňkami, tkáněmi a orgány. Tuto myšlenku vyslovil již v 19. století rakouský botanik Julius von Sachs, který přišel s hypotézou, že jednotlivé orgány v rostlině mezi sebou komunikují. Na základě této úvahy byly později objeveny chemické signály, tzv. morfogeny, které tyto funkce vykonávají (Procházka et al., 1998).

Růstové a vývojové procesy jsou u rostlin regulovány růstovými regulátory, které můžeme rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny řadíme rostlinné hormony (fytohormony) a do druhé skupiny pak další látky s regulační aktivitou (Procházka et al., 1998; Taiz a Zeiger, 2010). Samotné hormony jsou definovány jako organické sloučeniny syntetizované v jedné části organismu a následně translokovány do části jiné, kde i při nízkých koncentracích dokáží vyvolat fyziologickou odpověď (Rao et al., 2002). Hormony se syntetizují ve všech tělech mnohobuněčných organismů včetně rostlinných. Slouží jako chemičtí poslové od jedné buňky či skupiny buněk ke druhým. V organismu se podílí na řízení průběhu reakcí a jejich vzájemné koordinaci. Pokud se zaměříme na porovnání živočišných a rostlinných hormonů, tak si můžeme povšimnout jistých rozdílů. Zatímco u živočichů dochází k tvorbě hormonu v určitém místě těla a jeho následnému transportu na určené místo (žlázy s vnitřní sekrecí), u rostlin dochází k jejich syntéze na různých místech, často i na více místech současně. Živočišné hormony jsou charakteristické plněním převážně jen určité funkce v těle, kdežto rostlinné hormony se vyznačují pleiotropním účinkem, kdy mohou ovlivňovat více funkcí v rostlině (Taiz a Zeiger, 2010).

Hormony se vážou na specifické proteiny, které nazýváme receptory. Navázání spouští specifickou signalizaci, která vede k účinku hormonu. Existují dva typy receptorů. Receptory prvního typu jsou umístěny na buněčné membráně. Jakmile se daný hormon na tento receptor naváže, dojde k přenosu signálu do jádra buňky prostřednictvím systému druhých posílů. Receptor druhého typu je naopak umístěn v cytoplasmě, do které příslušný hormon musí nejprve buňkou proniknout. Tam se následně naváže na rozpustný receptor.

Navázáním vzniká komplex, který putuje do jádra a tam vyvolá změnu v expresi genu (Procházka et al., 1998).

V současné době mezi fytohormony řadíme auxiny, cytokininy, gibbereliny, etylén, kyselinu abscisovou, kyselinu salicylovou, brassinosteriody, strigolaktony, NO, polyaminy, kyselinu jasmonovou a peptidové hormony.

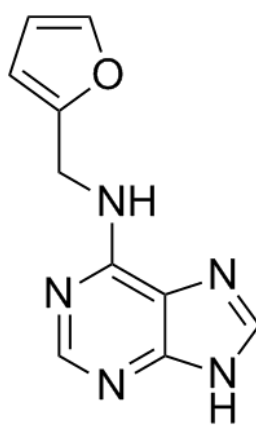
3.2 Cytokininy

3.2.1 Objev cytokininů

Na samém počátku objevu cytokininů byla nezodpovězená otázka, které faktory stimulují rostlinné buňky k dělení neboli k cytokinezi (Taiz a Zeiger, 2010). V roce 1913 rakouský fyziolog Gottlieb Haberlandt vyslovil myšlenku, že dělení buněk by mohlo být vyvoláno jistými faktory. Svými experimenty ukázal, že látky vyloučené floémem různých druhů rostlin stimulují buněčné dělení ve zraněné hlíze brambory (*Solanum tuberosum*); (Haberlandt, 1913). Tyto výsledky naznačovaly, že by mohly existovat rozpustné látky, které by v rostlinných buňkách dělení buněk podporovaly. Postupně bylo testováno značné množství látek ve snaze najít faktory způsobující zahájení buněčného dělení nebo udržení buněk v tomto procesu. Nejvyšší stimulace nárůstu dané kultury byla dosažena v kultivačním médiu Philipa Whitea, který do běžného média přidal společně s auxiny i kokosové mléko. Tím následně zjistil, že takto připravené médium podporuje nepřetržité dělení zralých diferenciovaných buněk v nebo z nejrůznějších tkání a druhů rostlin za tvorby kalusu příslušné tkáně. Na základě tohoto výsledku bylo usouzeno, že kokosové mléko obsahuje látky, které stimulují zralé buňky k buněčnému dělení a pomáhají je udržet v tomto stavu (Taiz a Zeiger, 2010). I přes veškerou snahu objasnit tuto problematiku vědci úspěchu dosáhli až v roce 1955, kdy byly cytokininy objeveny (Miller et al., 1955).

První cytokinin byl objeven a izolován Millerem z autoklávovaného DNA spermatu sledě v roce 1955. Tato sloučenina byla pojmenována kinetin a to především pro její vlastnost podporovat buněčné dělení, tedy cytokinezi. Z chemického hlediska je kinetin derivátem adeninu (aminopurinu), konkrétně 6-furfurylaminopurin (Miller et al., 1955).

Objevení kinetinu přispělo k založení nové skupiny fytohormonů pojmenované cytokinininy (Frébort et al., 2011). Je ovšem nutné zmínit, že kinetin není přirozeně se vyskytující látkou v rostlinách. Tento objev byl nicméně důležitým podnětem pro vyslovení hypotézy, že v rostlinách existují přirozeně se vyskytující látky podobné kinetinu, které regulují buněčné dělení. Tuto úvahu potvrdil Letham v roce 1963 objevem zeatinu, který se přirozeně v rostlinách vyskytuje (Letham, 1963). Zeatin byl, jak již jeho název naznačuje, izolován z nezralého endospermu obilky kukuřice (*Zea mays*). V následujících čtyřiceti letech bylo identifikováno několik dalších druhů cytokininů u různých druhů rostlin.



Obr. 1: Chemická struktura 6-furfuryladeninu (kinetin)

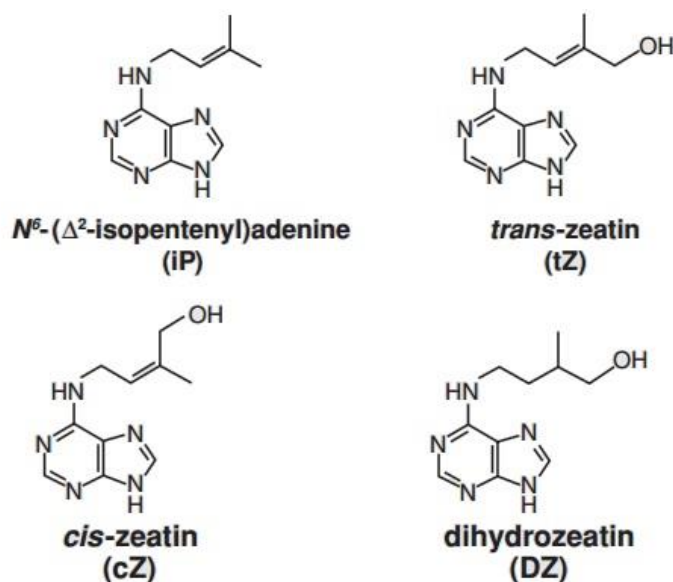
3.2.2 Chemická podstata cytokininů

Cytokinininy byly dříve definovány z hlediska vlastností jako látky, které podporují buněčné dělení a vykonávají další regulační funkce stejným způsobem jako kinetin. Nicméně v současné době jsou cytokinininy definovány spíše z chemického hlediska, kdy tento termín popisuje všechny molekuly s podobnou strukturou a to bez ohledu na jejich aktivitu (Frébort et al., 2011). Obecně se jedná o deriváty adeninu (aminopurinu) s připojeným postranním řetězcem na pozici N^6 (Spíchal, 2012). Přítomnost jednotlivých typů cytokininů a jejich derivátů může být závislá na druhu rostliny, pletivu, na vývojovém stádiu, ale také na přírodních podmínkách (Frébort et al., 2011).

Dle povahy postranního řetězce dělíme cytokinininy na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Isoprenoidní cytokinininy nesou isoprenoidní postranní řetězec, který může být nasycený nebo nenasycený. Aromatické cytokinininy pak nesou aromatický postranní

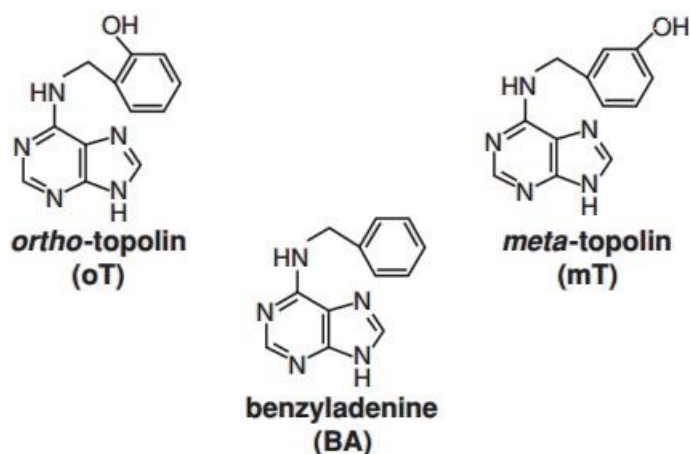
řetězec, který může být dále substituovaný v různých polohách postranního řetězce (Davies, 2004; Åstot et al., 2000).

U vyšších rostlin se nejčastěji vyskytují cytokininy isoprenoidního typu, mezi které řadíme zeatin, dihydrozeatin (DZ) a isopentenyladenin (iP). Bezsporu nejrozšířenějším cytokininem je zeatin. Z chemického hlediska se jedná o *trans*-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin. Může se vyskytovat ve dvou konfiguracích, a to ve formě *cis* nebo *trans*. Tato možnost dvojí konfigurace je dána přítomností dvojné vazby, která se vyskytuje v postranním řetězci. Zatímco *trans*-zeatin (*tZ*) je aktivní formou cytokininů a u rostlin je častější (Taiz a Zeiger, 2010), *cis*-zeatin (*cZ*) se projevuje spíše nižší aktivitou, záleží však také na rostlinném druhu. *cZ* se nachází hojněji například u kukuřice, rýže (*Oryza sativa*) a cizrny (Frébort et al., 2011).



Obr. 2: Chemická struktura isoprenoidních cytokininů (Sakakibara, 2006).

Mezi aromatické cytokininy patří ortho-topolin (oT), meta-topolin (mT) a jejich methoxy deriváty (meoT a memT) a benzyladenin (BA); (Sakakibara, 2006). Zatímco isoprenoidní cytokininy jsou v přírodě rozšířené, aromatické jsou především syntetické a v rostlinách se vyskytují jen ojediněle (Frébort et al., 2011).



Obr. 3: Chemická struktura aromatických cytokininů (Sakakibara, 2006).

Dalšími známými látkami s cytokininovou aktivitou jsou difenylmočovinové typy, jako je například thidiazuron (Davies, 2004; Taiz a Zeiger, 2010). Jsou pouze syntetické a zatím nebyla prokázána jejich přítomnost v rostlinných pletivech (Davies, 2004).

V rostlinách se cytokininy vyskytují jako volné báze nebo ve formě nukleotidů, nukleosidů a jejich derivátů nebo také jako konjugáty s glukosou, xylosou nebo aminokyselinovými zbytky (Spíchal, 2012). Za nejaktivnější se považují právě volné báze cytokininů (Argueso et al., 2009). Přeměna mezi různými metabolity bude blíže popsána v kapitole metabolismu cytokininů.

3.2.3 Biosyntéza cytokininů

Jak již bylo uvedeno v předcházejících částech, biosyntéza aromatických cytokininů patří i v současné době k oblasti, která je stále zahalena rouškou tajemství. Tato část bude tedy věnována především biosyntéze cytokininů isoprenoidních.

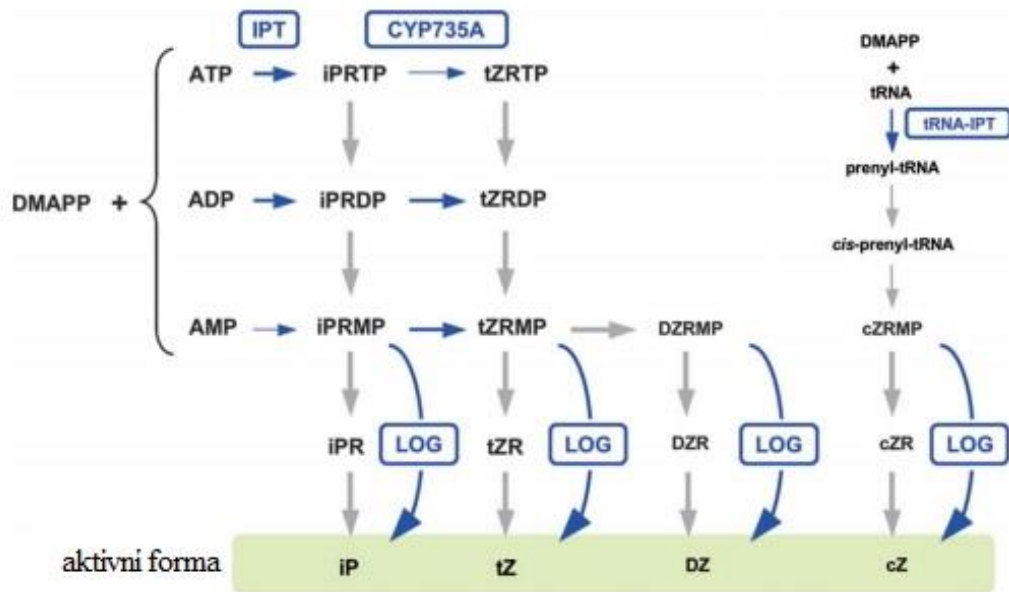
Klíčovým enzymem v biosyntéze isoprenoidních cytokininů v rostlinách je isopentenyltransferáza (IPT); (Zalabák et al., 2013). Podle typu substrátu rozdělujeme IPT na adenosinfosfát-IPT nebo tRNA-IPT (Werner a Schmülling, 2009). IPT katalyzuje N-prenylaci adenosin-5'-fosfátu (ATP, ADP a AMP); (Zalabák et al., 2013). Tato enzymová aktivita byla poprvé popsána v extraktu z Hlenky (*Dictyostelium discoideum*). První identifikovaný gen kódující *de novo* biosyntézu cytokininů byl identifikován u bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Byl označen jako *tmr* a nachází se v T-DNA

plasmidu vyvolávajícího nádorové onemocnění (Spíchal, 2012). Geny kódující *ipt* byly následovně identifikovány i u dalších bakterií a IPT aktivita byla také zaznamenána v různých extraktech rostlinných pletiv (Kieber a Schaller, 2014). Donory isoprenoidního postranního řetězce jsou dimethylallyl pyrofosfáty (DMAPP) nebo 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfáty (HMBDP). Obě sloučeniny jsou produkty metylerytritolfosfátové (MEP) dráhy, která je lokalizována v plastidech a mevalonátové (MVA) dráhy, která je lokalizována v cytosolu. Přednostním donorem isoprenoidního postranního řetězce u rostlinných IPT je DMAPP a přednostním akceptorem jsou ATP a ADP. Primárními produkty syntézy jsou tedy buď isopentenyladenosin-5'-trifosfáty (iPRTP) nebo isopentenyladenosin-5'-difosfáty (iPRDP); (Zalabák et al., 2013).

Pro syntézu *tZ* existují dvě možné cesty zahrnující převod isoprenoidního postranního řetězce. První cesta zahrnuje IPT za využití DMAPP. Tento proces vede k tvorbě iP ribotidů, které jsou následně hydroxylovány za vzniku *tZ* ribotidů. Druhá cesta využívá MVA dráhu. Výchozími produkty rostlin jsou enzymy iPRTP a iPRDP, které mohou být následně převedeny na *tZ* hydroxylací isoprenoidního postranního řetězce pomocí enzymu cytochrom P450 monooxygenázou CYP735A1 a CYP735A2 (Kieber a Schaller, 2014). Většina *tZ* v *Arabidopsis* je tvořena prostřednictvím prekursoru pocházejícího z MEP dráhy. Toto tvrzení bylo prokázáno na základně selektivního značení ¹³C isoprenoidních drah v semenáčcích *Arabidopsis* (Kasahara et al., 2004).

Aktivní formy cytokininů jsou volné báze, které jsou získány z cytokininových ribotidů v jednoduchém enzymatickém kroku katalýzou enzymu fosfohydroláza LONELY GUY (LOG); (Schaller et al., 2015). LOG enzymy byly poprvé izolovány v rýži (Kurakawa et al., 2007) a později byly také nalezeny v genomu *Arabidopsis* (Zalabák et al., 2013). V *Arabidopsis* se nachází sedm genů, které aktivní LOG enzymy kódují (Kieber a Schaller, 2014).

Kromě genů kódujících IPT rostlinné genomy také obsahují geny pro tRNA-IPT (Zalabák et al., 2013). Tyto enzymy umožňují N-prenylaci adenosinu navázaného v molekule tRNA, degradace pak způsobí uvolnění *cZ* (Murai, 2014). To mimo jiné také naznačuje, že tRNA může zprostředkovávat dráhu syntézy *tZ* přes *cZ* (Kasahara et al., 2004).



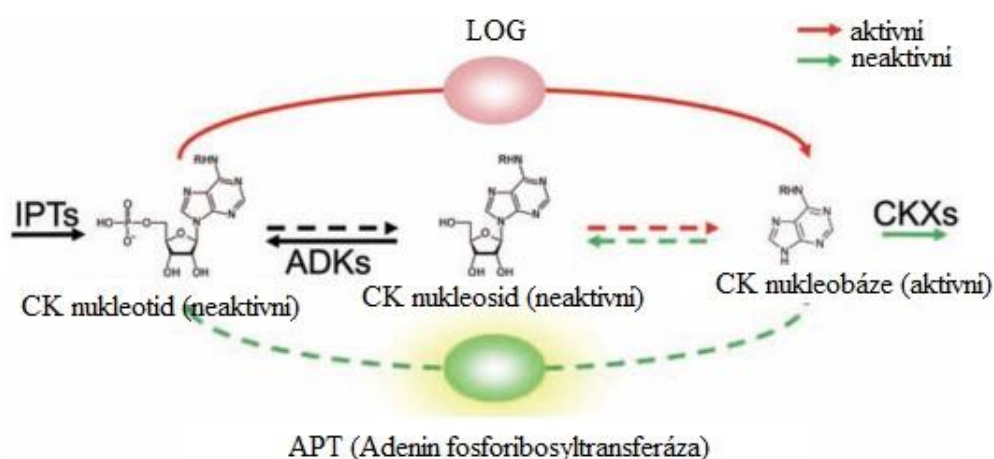
Obr. 4: Model biosyntézy cytokininů (Hirose et al., 2008).

V genomu *Arabidopsis* je devět *AtIPT*, které se podílejí na *de novo* biosyntéze (*AtIPT1* a *AtIPT3-8*) a dvě tRNA-IPT (*AtIPT2* a *AtIPT9*). *IPT1*, 5 a 8 jsou cíleny do plastidů. Zbývající 4 enzymy byly lokalizovány v cytoplazmě (Sakakibara, 2006). Genové exprese se liší v závislosti na IPT genech. *IPT1* bylo nalezeno v prekurzorových buňkách xylému v kořeni, axilu listu a nezralých semenech. *IPT3* bylo objeveno ve floému a *IPT4* v nezralých semenech s vyšší expresí v chalazální části endospermu. *IPT5* je dominantní v primordiu postranního kořene, v kolumele kořenové čepičky. *IPT6* se nachází v šesuli a *IPT7* zase ve floému, endodermisu kořenové prodlužovací zóny, v trichomech mladých listů a pylových láčkách. *IPT8* se nachází v nezralých semenech s vyšší expresí v chalazální části endospermu (Sakakibara, 2006). Enzymatická struktura IPT byla identifikována a popsána i v jiných rostlinách jako je chmel (*Humulus lupulus*), moruše (*Morus alba*), kukuřice a rýže (Spíchal, 2012).

3.2.4 Metabolismus a degradace cytokininů

Kromě biosyntézy je hladina endogenních cytokininů také regulována konjugací s glukosou či degradací (Argueso et al., 2009). Cytokininu můžeme také rozdělit do 3 hlavních skupin, které zahrnují aktivní formy, formy translokace a ukládání, nebo formy inaktivní (Davies, 2004).

Jak již bylo zmíněno v úvodní části, téměř všechny cytokinininy jsou v rostlinách přítomné jako báze nebo odpovídající nukleosidy a nukleotidy. Vzájemné přeměny těchto forem jsou uskutečňovány enzymy, které jsou zapojené do purinového metabolismu (Haberer a Kieber, 2002). U různých druhů rostlin bylo nalezeno několik enzymů, které se do přeměn zapojují. Jedná se například o nukleotidasu, adenosin nukleosidasu, adenin fosforibosyltransferasu (APT), adenosin kinasu (ADK). Tyto enzymy se vyznačují širokou substrátovou specifitou a obecně rozpoznávají adenosin (Spíchal, 2012).



Obr. 5: Schéma vzájemných přeměn mezi volnými bázemi, nukleotidy a nukleosidy. Mezi aktivní formy cytokininů patří volné báze, zatímco nukleotidy a nukleosidy jsou prekurzory neaktivních forem cytokininů. LOG enzymy přímo převádí neaktivní formy cytokininů na jejich volné báze, zatímco APT enzymy působí opačným způsobem a podílejí se na deaktivaci cytokininů převodem aktivních volných bází na neaktivní nukleotidy (Zhang et al., 2013).

Za nevratný proces cytokininů se považuje N-glykosylace, která primárně nastává v poloze N^7 nebo N^9 purinového kruhu (Kieber a Schaller, 2014). Enzymy účastníci se N-glykosylace jsou glukosyltransferasy, které využívají jako glukosylové donory uridin difosfát glukosu a uridin trifosfát glukosu. N-glykosidy jsou obecně neaktivní, proto se předpokládá, že nevratně inaktivují cytokinininy (Spíchal, 2012).

Cílovým místem konjugace na zbytky glukosy, nebo v některých případech zbytky xylosy, je také hydroxylová skupina postranního řetězce cytokininů. Tato modifikace se nazývá O-glykosylace a vlivem působení enzymu O-glykosyltransferasy vznikají O-glukosidy a O-xylosidy. Tento děj je reverzibilní a nastává na kyslíku postranního řetězce zeatinu nebo DZ (Taiz a Zeiger, 2010; Schaller et al., 2015). Předpokládá se, že

O-glykosidy cytokininů jsou zásobní formy cytokininů a jsou odolné vůči štěpení cytokinin oxidázou/dehydrogenázou (CKX); (Kieber a Schaller, 2014). O-glykosylové formy mohou být zpětně převedeny na aktivní formy účinkem enzymu β -glukosidasy (Brzobohatý et al., 1993).

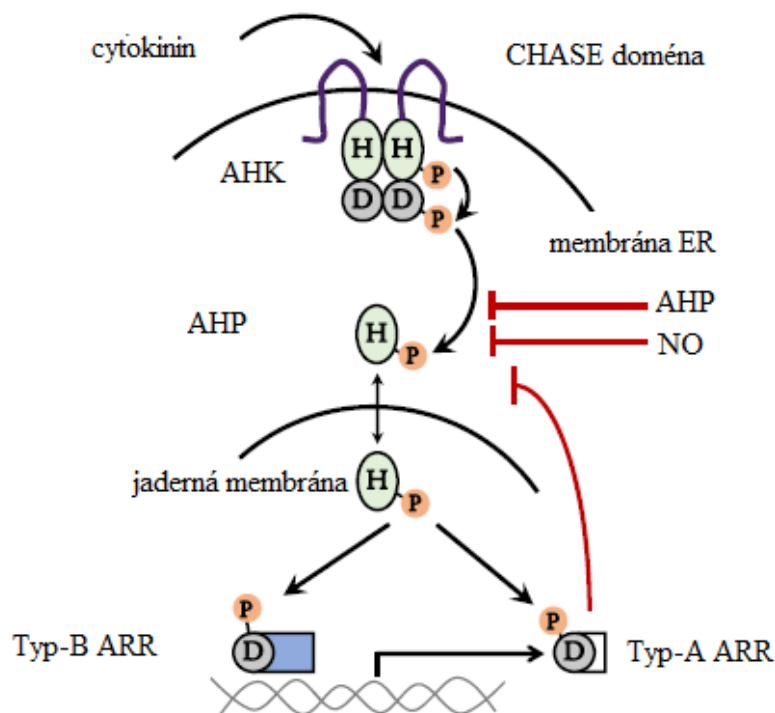
Jak již bylo řečeno v úvodu této kapitoly, hladiny cytokininů v rostlinách jsou také významně regulovány degradací. Tato regulace je řízena enzymem CKX, který štěpí nenasycené postranní řetězce z cytokininů typu *tZ* a *iP*, čímž způsobuje jejich nevratnou inaktivaci (Schaller et al., 2015), zatímco *DZ* a *BA* jsou tomuto štěpení rezistentní (Kieber a Schaller, 2014). Enzymatická aktivita CKX byla poprvé popsána Pačesem a jeho kolegy v tabákové kultuře v roce 1971 (Pačes et al., 1971). Sekvence genů, které kódují proteiny CKX byly od té doby identifikovány v mnoha rostlinných druzích, jako je například *Arabidopsis*, kukuřice, rýže, orchidej (*Dendrobium sonia*), ječmen (*Hordeum vulgare*) a pšenice (*Triticum aestivum*). Geny CKX byly identifikovány i v některých prokaryotických organismech, jako jsou bakterie *Rhodococcus fascians* nebo v genomu sinic, například v *Nostoc* a *Anabaena*. Reakce je založena na převodu dvou elektronů ze substrátu cytokininu na flavinový FAD kofaktor za tvorby meziprojektu iminu, který hydrolyzuje cytokinin na adenin a nenasycený aldehyd. V *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 proteinů CKX lokalizovaných buď do vakuol (AtCKX1 a AtCKX3) nebo do apoplastu (AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6) s výjimkou AtCKX7, který postrádá signální peptid (Spíchal, 2012). Regulace těchto enzymů v současné době nabízí modulaci hladin cytokininů.

3.2.5 Signální dráha cytokininů

Signální dráha cytokininů je podobná dvoukomponentní signální dráze bakterií a kvasinek (Ferreira a Kieber, 2005). Na rozdíl od bakterií je systém cytokininové signalizace hybridním dvoukomponentovým systémem složitějším a je zprostředkován vícestupňovou His \rightarrow Asp \rightarrow His \rightarrow Asp fosforylací zahrnující histidin fosfotransferový protein (HPT). Receptory citlivé k cytokininům, které jsou lokalizovány na membránách endoplazmatického retikula (ER); (Caesar et al., 2011), obsahují histidinkinázovou doménu kovalentně spojenou s přijímačovou doménou. Po autofosforylaci His zbytku a přenosu fosfátu na přijímačovou doménu je posléze využito proteinů obsahujících

fosfotransferovou doménu, které přenášejí fosfátovou skupinu do jádra buňky, kde ji předávají regulátorům odpovědi, které zahajují expresi cílových genů (Kieber a Schaller, 2014).

V modelovém organismu *Arabidopsis* bylo po analýze sekvence genomu popsáno pět Hpt genů označovaných *AHP1 – AHP5*. *AHP1 – AHP5* přenášejí signál z receptoru lokalizovaného v plazmatické membráně na ARR nacházející se v jádře (Heyl a Schmülling, 2003). Kromě těchto pěti AHP proteinů byl nalezen ještě šestý pseudo Hpt protein (*AHP6*), který nese substituci v konzervativním His a působí jako negativní regulátor této dráhy. Mimo tyto proteiny byly také určeny ARR, které jsou rozděleny do čtyř skupin podle jejich kódované sekvence a strukturní C-terminální domény. Rozlišuje se 10 ARR typu-A (*ARR3-ARR9, ARR15-ARR17*), 11 ARR typu-B (*ARR1, ARR2, ARR10-ARR14, ARR18-ARR21*), 2 ARR typu-C (*ARR22 a ARR24*) a 9 *Arabidopsis* pseudo regulátorů odpovědi (ARR); (To a Kieber, 2008).



Obr. 6: Schéma přenosu signálu v signalizaci cytokininů. Cytokinin se váže k doménám CHASE AHK2/AHK3/AHK4 cytokininových receptorů uvnitř lumenu endoplazmatického retikula (ER). Navázání cytokininů aktivuje doménu vysílače, která autofosforyluje na His (označeno H). Fosfát je následovně přenesen zbytkem Asp (označeno D) v doméně přijímače. Fosfát je pak přenesen do proteinu AHP, který se pohybuje mezi cytoplasmou a jádrem. V jádře AHP přenáší fosfát na ARR typu B, který pak reguluje expresi mnoha

cílových genů, včetně ARR typu A. ARR typu A jsou také fosforylovány působením AHP. Tyto geny jsou spojeny s negativní odpovědí, která zpětně tlumí aktivitu cytokininové dráhy (označeno ⊥). Signalizaci cytokininů také negativně regulují pseudo IPT protein AHP6 a oxid dusnatý (NO). (Kieber a Schaller, 2014)

Mimo tyto kanonické komponenty cytokininové signalizace jsou již dnes známy i další komponenty, které tuto signalizaci regulují. Mezi tyto komponenty patří proteiny KISS ME DEADLY (KMD), o kterých je známo, že ubikvitinují regulátory odpovědi typu B a označují je tak pro degradaci. Tímto způsobem negativně ovlivňují cytokininovou signalizaci (Kim et al., 2013). Význam těchto proteinů v globálním obrazu cytokininové odpovědi však ještě nebyl plně objasněn. Mezi nekanonické komponenty patří rovněž postranní větve signalizace pomocí CRF proteinů. CRF interagují s proteiny AHP a mají rovněž výrazný vliv na růst a vývoj rostlin (Rashotte et al., 2006).

3.2.6 Deriváty cytokininů

Na základě znalostí chemické struktury a biologické aktivity cytokininů a látek s cytokininovou aktivitou se chemicky připravují i látky, které jsou schopny jejich působení blokovat. V takovém případě se jedná o látky antagonistické, tzv. anticytokinininy. Mezi účinné antagonisty patří různé pyrolové a pyrazolové deriváty, které mají modifikované postranní řetězce v důsledku zrušení dvojnásobné vazby a navázání metylové skupiny (Taiz a Zeiger, 2010). Patří mezi ně například ACK1, ACK2 (Kapchina-Toteva a Stoyanova, 2003), PI-55 (Spíchal et al., 2009) nebo LGR-991 (Nisler et al. 2010).

PI-55 se strukturně velmi podobá aromatickým cytokininům. Nese ovšem navíc ve specifických polohách postranního řetězce substituce, které pak snižují cytokininovou aktivitu (Werner a Schmülling, 2009). PI-55 je antagonistou působícím na úrovni receptoru. Kompetitivně inhibuje vazbu navázáním ligandu *trans*-zeatinu na cytokininové receptory odpovědi (CRE1)/*Arabidopsis* histidin kinázu (AHK3 a AHK4) a potlačuje indukci cytokininové odpovědi (Spíchal et al., 2009).

Jako dalším antagonistou receptorů cytokininů byl popsán i LGR-991. Na molekulární úrovni blokuje cytokininové receptory CRE1/AHK4. Jeho účinnost je v porovnání s antagonistou PI-55 stejná. LGR-991 navíc působí jako kompetitivní inhibitor AHK3

(Nisler et al., 2010). Zmíněnou inhibicí cytokininové signalizace je možné u takových látek potlačit přidavkem většího množství cytokininů (Taiz a Zeiger, 2010).

3.2.7 Funkce cytokininů

Funkce cytokininů byla původně spojena zejména s buněčným dělením. Teprve pozdější experimenty prokázaly, že cytokininy hrají mnoho dalších významných rolí v rostlinném těle. Pro řadu takových vlastností se hledá praktické uplatnění, a to zejména v oblasti zemědělství.

Mezi jedny z hlavních úloh cytokininů patří regulace buněčného cyklu a dělení buněk. Cytokininy jsou nezbytné nejen pro množení buněk v kultuře, ale také pro vytvoření nových prýtů apikálních meristémů (SAM). Pozitivní regulace SAM je založena právě na stimulaci buněčného dělení. Naopak kořenový apikální meristém cytokininy negativně regulují prostřednictvím podpory buněčné diferenciace (Schaller et al., 2014). Negativní vliv na kořeny byl potvrzen i v experimentu s antagonistou cytokininů PI-55, který pozitivně ovlivnil růst laterálních kořenů (Spíchal et al., 2009).

Cytokininy také vzájemně interagují s fytohormony auxiny, čímž se zabývali již Skoog a Miller. Skrze experimenty došli k závěru, že správný poměr auxinů a cytokininů hraje klíčovou roli v regulaci *in vitro* organogeneze (Skoog a Miller, 1957). Jestliže médium obsahuje vyrovnaný poměr cytokininů a auxinů, dochází k tvorbě kalusu, což je hojivé pletivo. V případě že auxiny převládají nad cytokininy, dochází na kultivovaném segmentu k tvorbě kořenových základů. V opačném případě, kdy převažují cytokininy, dochází na segmentu k tvorbě prýtů. (Nordström et al., 2004).

Hladiny endogenních cytokininů významně ovlivňují fenotyp rostliny. Vysoké dávky cytokininů mají spíše negativní vliv na růst rostlin. U mladých listů transgenního tabáku při zvýšené hladině cytokininů došlo k projevu chlorózu (Novák et al., 2013). Naopak snížení hladin cytokininů vedlo k pomalému růstu rostliny, téměř nedošlo k prodloužení délky hypokotylu, listy byly malých rozměrů a často i netypického tvaru (Miyawaki et al., 2006; Werner et al., 2001).

Cytokininy se vyznačují také vlastnostmi oddalování stárnutí rostlin. Oddálení senescence bylo prokázáno ve studii transgenních rostlin s expresí bakteriálního genu *ipt* bakterie *Agrobacterium tumefaciens* regulovaným promotorem P_{SAG12}, který je aktivní

zejména při senescenci (Gan a Amasino, 1995). Senescenci řízená regulace genu *ipt* vedla k navýšení hladiny cytokininů, která v rostlině tabáku oddalovala stárnutí listů a udržení jejich aktivní fotosyntetické aktivity. V jiné studii transgenní rostliny nesly bakteriální gen *ipt* ve spojení s promotorem SARK izolovaného z fazolí. Tyto rostliny byly vystaveny stresu ze sucha a v porovnání s kontrolou vykazovaly odolnost vůči stresu způsobeného nedostatkem vody. Zatímco kontrolní rostliny z velké části zvadly a z nedostatku vody se nezregenerovaly, transgenních rostlin zvadlo malé množství a po opětovném zalití vodou vykazovaly známky růstu (Rivero et al., 2007).

Mimo zvýšenou odolnost rostlin proti extrémnímu suchu se v současné době ukazuje, že cytokininová signalizace ovlivňuje rovněž odpověď rostlin k teplotnímu stresu (Černý et al., 2014). Cytokiny hrají také významnou roli při vývoji a strukturální diferenciaci chloroplastů (Dobrąnszki et al., 2014). Ovlivňují hromadění pigmentů a mají pozitivní vliv na fotosyntetické procesy (Cortleven, et al., 2011).

3.3 Proteomika

Označení „proteom“ bylo poprvé předneseno v roce 1994 australským doktorandem Markem Wolkinsem na konferenci v Sieně (Kovářová, 2005). Tento termín představuje sadu proteinů, které jsou přítomné v dané buňce, tkáni/pletivu nebo organismu v určitém čase. Zahrnuje veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizace a metabolické procesy v závislosti na čase, prostředí a typu buňky. Vznikl tak nový obor na základě kombinace termínů „protein“ a „genomika“ nazvaný proteomika (Zhang et al., 2013). V porovnání s genomikou je proteomika podstatně složitější, neboť proteom během vývoje buněk a vlivem měnícího se prostředí podléhá nepřetržitému pozměňování (Phizicki et al., 2003; Kovářová, 2005).

Vývoj proteomiky během posledních několika let dospěl k značným pokrokům. Jako vědecká disciplína se stala jedním z nejrychleji se rozvíjejících vědních oborů v rámci přírodních věd vůbec. Rozvoj je ovlivněný především novými technologiemi pro separaci peptidů/proteinů, jejich analýzu a zpracováním dat bioinformatikou (Zhang et al., 2013).

Ke studiu proteomu slouží celá řada různých přístupů z hlediska metodologie, účelu a cílů. Strukturní proteomika se snaží pochopit chování proteinů z hlediska jejich

struktury a využívá především krystalografie a modelování. Funkční proteomika se zabývá především funkcemi bílkovin a studiem procesů, které hrají důležitou roli ve vývoji organismu. Diferenční proteomika sleduje změny složení proteomu, které se mění při různých stavech v organismu. Cílem je pak identifikovat rozdílně se vyskytující proteiny (Chmelík, 2005).

Dnešní diferenční proteomika využívá dvou hlavních postupů. První vychází z intaktních proteinů (tzv. top-down), které jsou separovány, kvantifikovány (např. metodou dvourozměrné elektroforézy či kapalinová chromatografie) a následně identifikovány, převážně pomocí hmotnostní spektrometrie identifikací peptidů vzniklých jejich digestem. Druhá cesta vychází přímo z digestu, kdy je celý proteom rozštěpen proteázou a informace o původních proteinech a jejich množství se získává z identifikace a kvantifikace (tryptických) štěpů (tzv. bottom-up metoda); (Chmelík, 2005; Zhang et al., 2013).

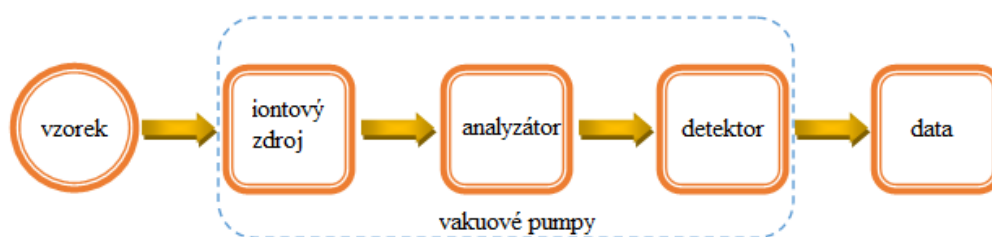
3.3.1 Příprava vzorků, extrakce

Nejdůležitějším krokem v běžné proteomické analýze je extrakce proteinů a příprava vzorků, během které je nutné zamezit kontaminacím, které vzorky značně znehodnocují. Rostliny jsou v porovnání s jinými živými systémy složitější, protože je u nich přítomná buněčná stěna. Většinou jsou navíc bohaté na proteázy, oxidační enzymy a sloučeniny, které interferují s proteomickou analýzou (sacharidy, lipidy, fenolické látky a jiné sekundární metabolity); (Chatterjee et al., 2012).

Pro samotnou extrakci proteinů nelze vypracovat jeden jediný protokol, protože proteiny jsou značně různorodé a to zejména z hlediska molekulové hmotnosti, náboje, hydrofobicity, posttranslačních úprav a modifikací (Chen a Harmon, 2006). Proteiny jsou obecně extrahovány buď vodným pufrem, detergentem, nebo přímým srážením. Při extrakci rostlinného proteomu se často využívá srážení kyselinou trichloroctovou (TCA), acetonem, fenolová extrakce či kombinace těchto metod (Chen a Harmon, 2006; Faurobert et al., 2007).

3.3.2 Metody analýzy proteomu

Proteom je značně složitý a je tedy vhodné použít více metod pro jeho analýzu. Mezi nejčastější používané předseparační techniky patří elektroforéza a kapalinová chromatografie (LC); (Chen a Harmon, 2006). Vlastní analýza dnes prakticky probíhá výhradně pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), která v kombinaci s LC-MS byla užita i v této práci. Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí, mezi které patří iontový zdroj, analyzátor a detektor částic. Iontový zdroj slouží k tvorbě iontů v plynné fázi, probíhá tzv. ionizace. V hmotnostním analyzátoru se separují ionty na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z), celý proces probíhá ve vakuu. Vybrané ionty jsou následně zaznamenány detektorem a získaný signál je digitalizován a jsou získána data k vyhodnocení (Friedecký a Lemr, 2012).



Obr. 7: Schéma základních komponent hmotnostního spektrometru

Dlouhou dobu byla MS omezena pouze pro malé termostabilní látky, protože u látek s vyšší molekulovou hmotností docházelo k příliš velkému rozpadu. Postupně byla vyvinuta technika ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace pomocí laseru se současnou desorpcí vzorku navázaného na matrici (MALDI). Iontové zdroje jsou obvykle spojeny s iontovou pastí, analyzátozem doby letu TOF nebo kvadrupolovým analyzátozem, případně kombinací uvedeného. Stanovení hmotnosti proteinů neznamená rovnou jejich určení. K určení pomáhají až hmotnosti peptidů a jejich fragmentů, kdy jsou jejich spektra srovnána s teoretickými spektry nacházejících se v sekvenčních databázích (Kovářová, 2005; Domon a Aebersold, 2006). Analyzovaný vzorek může být vyhodnocen kvalitativně (identifikace proteinů) a kvantitativně (stanovení množství) (Kovářová, 2005).

4 MATERIÁL A METODIKA

Praktická část bakalářské práce byla rozdělena na část fyziologickou a proteomickou. Fyziologická část zahrnovala experiment se sledováním změny fenotypu v odpovědi na dávku *tZ* a inhibitoru CKX (INCYDEu) u rostlin divokého typu i geneticky modifikovaných rostlin s modulovanou cytokininovou signalizací. Proteomická část zahrnovala kultivaci rostlinného materiálu a samotnou přípravu vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií.

4.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Vliv účinku *tZ* a INCYDEu na morfologii semenáčků byl sledován na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia, Col-0). Semena byla nejprve povrchově sterilizována 80% ethanolem po dobu 5 minut. Následně byla semena vyseta ve sterilním prostředí flowboxu na živné $\frac{1}{2}$ Murashige a Skoogovo médium (Duchefa) s 1% agarem (Duchefa). U média bylo upraveno pH na hodnotu v rozmezí 5,7 - 5,8 přidávkem 1M roztoku KOH před autoklávováním, které zajistilo sterilizaci média. Před rozlíváním na čtvercové Petriho misky (12,5 x 12,5 cm) byla média obohacena příslušným množstvím DMSO, *tZ* nebo INCYDEu pro dosažení požadované koncentrace. V experimentu byl testován vliv koncentrační řady *tZ* a INCYDEu s finální koncentrací 10 nM, 100 nM, 1 μ M a 10 μ M. Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), přičemž kontrolní rostliny rostly na médiu jen s přidávkem DMSO (0,1 % v/v). Semena byla vysévána v jedné řadě přibližně po dvanácti semenech na misku. Nakonec byly misky oblepeny polopropustnou náplastí Medipor. Oblepení bylo potřebné pro zachování sterility uvnitř misek. Takto nachystané misky byly uchovány v lednici po dobu tří dnů, aby došlo k vernalizaci semen. Po uplynutí 3 dnů byly misky vertikálně umístěny do kultivačního boxu (Percival Scientific, Inc.). Rostliny byly kultivovány 7 dní za podmínek intenzity světla $100-120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a režimu dlouhého dne 16 hod na světle při 21°C a 8 hod ve tmě při 19°C. Analýza vlivu *tZ* a INCYDEu na fenotyp mutantů *kmd1,2,4* a geneticky upravených linií se zvýšenou expresí *KMD1* a *KMD2* proběhla podobně jako experiment s rostlinami divokého typu kultivovaných na médiu s přidávkem 0,5 μ M *tZ* a INCYDEu.

Po 7denní kultivaci proběhlo fotografování jednotlivých misek. Rostliny byly upraveny tak, aby bylo možné provést následující měření délky hypokotylů a délky hlavních kořenů v programu ImageJ. Získané hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel a statisticky porovnány prostřednictvím T-testu.

Pro proteomickou analýzu byly rostliny kultivovány 7 dní na ½ MS médiu bez přídavku rostlinných regulátorů. Na médium byla položena sterilní síťka (Uhelon 120T) na které byla semena vyseta. Po 3 dnech vernalizace a 7 dní růstu za podmínek popsanych výše byly síťky se semenáčky ponořeny do roztoku s 0,5 µM *tZ* nebo INCYDEem a poté přeneseny na médium o stejné koncentraci růstových regulátorů. Po 24 hodinách následoval sběr. Stejný postup jsme použili i při kultivaci 14-ti denních rostlin, kdy jsme zvlášť odebírali vzorky z kořenů a nadzemních částí rostliny. Jednotlivé vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C do doby, než byla zahájena analýza.

4.2 Homogenizace a extrakce proteinů

Získané vzorky byly homogenizovány v tekutém dusíku. Po homogenizaci bylo ke vzorkům přidáno 2 ml 10% (w/v) TCA v acetonu. Následně byla provedena centrifugace při 10000 x g a teplotě 4°C po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a ke zbylému peletu byl přidán 1 ml 10% (w/v) TCA v destilované vodě. Následovala druhá centrifugace po dobu 10 minut. Výsledný supernatant byl odpipetován a k peletu byl přidán 1 ml 80% (v/v) aceton v destilované vodě a následovalo třetí stočení, které probíhalo 15 minut za shodných podmínek.

K proteinovému peletu bylo přidáno 0,8 ml SDS pufru (2% dodecylsírán sodný w/V, 30% sacharóza, 5% β-merkapt ethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris; pH 8.0). V dalším kroku bylo k 0,8 ml proteinu rozpuštěného v SDS pufru přidáno 0,4 ml fenolu a důkladně protřepáno na třepačce při 850 rpm. Následně byly vzorky vloženy do centrifugy a centrifugovány při 15000 x g 20 minut. Fenolová frakce obsahující protein byla odebrána pipetou tak, aby nedošlo k porušení sacharózové vrstvy, a přenesena do nové mikrozkušavky o objemu 2,0 ml. Fenolická frakce byla doplněna do objemu 2 ml roztokem 100 mM octanu amonného v methanolu, aby došlo k vysrážení proteinů. Vzorky byly uchovány přes noc při -20°C. Následně byly vzorky stočeny při 15000 x g

5 minut a po odstranění supernatantu byl přidán pro vysrážení proteinu 1 ml 80% acetonu. Po následné centrifugaci byl supernatant odpipetován a zbylý pelet byl vysušen.

4.3 Digest

Po vysušení byl pelet rozpuštěn v 300 μ l roztoku 100 mM NH_4HCO_3 a 8 M močoviny po dobu 60 minut při 25°C na třepačce. Následně byla stanovena koncentrace pomocí metody dle Bradfordové (Bradford, 1976); (Sigma Aldrich) a destičkového spektrofotometru (Tecan). Následující krok zahrnoval štěpení vzorků trypsinem (10 μ l na 500 μ g proteinu); (Promega) při teplotě 30°C přes noc.

4.4 Odsolení a příprava pro LC-MS analýzu

Pro odsolení vzorů byla použita odsolovací destička C_{18} SPEC (Agilent). Nejdříve byla promyta 2x 400 μ l methanolu a 4x 400 μ l ddH₂O. Následovalo nanesení vzorků a následné promytí 4x 400 μ l ddH₂O. Následně se vzorky eluovaly pomocí 400 μ l metanolu a nechaly se odpařit v SpeedVac koncentrátoru (Thermo).

Před samotnou LC-MS analýzou byla ke vzorkům přidána 0,1% kyselina mravenčí (FA) a 5% ACN v objemu, aby výsledná koncentrace peptidu byla zhruba 5 μ g/ μ l. Stočené vzorky byly přeneseny do vialek s insertem o objemu 100 μ l a vloženy do autosampléru UltiMate 3000 RSLC (Dionex) spojeného s UHR-TOF hmotnostním spektrometrem maXis Impact (Bruker).

4.5 LC-MS analýza

Vzorky byly analyzovány pomocí C_{18} reverzní chromatografie (15 cm, 0,1 mm průměr, Ascentis Express Column, Sigma-Aldrich) přímo napojené k nanoESI zdroji CaptiveSpray (Bruker). UltiMate 3000 RSLC pracoval s průtokem 300-500 nl/min,

gradient ACN byl 4-35% během 180 minut. UHR-TOF spektrometr měřil v MS/MS módu pro identifikaci proteinů (rozsah 50-2200 m/z, MS sběr 2 Hz, MS/MS 4-20 Hz, max. 20 prekurzorů, funkce aktivní exkluze) a pro část experimentů pro kvantifikaci pouze v MS módu (rozsah 350-1600 m/z, sběr 0,5 Hz). Při měření byl použit vnitřní standard 1221,99 m/z (lockmass).

4.5.1 Změření a zpracování MS spekter

Pomocí analyzátoru q-TOF byla získána MS spektra, která byla nejdříve zpracována programem DataAnalysis. Nejdříve se v tomto programu provedla recalibrace spekter podle referenční složky (kalibrant 1221.99 m/z) a následně extrakce dat, kdy byly odfiltrovány šумы a získány tzv. buckety, které umožňují kvantifikaci peptidů. Buckety jsou vytvořené vektory pro každou unikátní m/z v rámci LC-MS analýzy.

4.5.2 Statistické zpracování

Za pomoci softwaru ProfilAnalysis 2.1 byla vytvořena kvantifikační tabulka, která umožnila porovnat unikátní m/z v daném čase mezi jednotlivými analyzovanými vzorky. Dále byla provedena automatická korekce retenčního času a normalizace spekter. Závěrečným krokem byl vytvořen list signifikantně regulovaných bucketů za základě porovnání T-testu (p-value 0,05).

4.5.3 Změření a zpracování MS/MS spekter

K identifikaci peptidů byla použita MS/MS spektra. Pomocí nich je možné zjistit původní proteinové složení vzorku. K identifikaci peptidů byly použity programy Mascot Server 2.4.0, který využil databázi proteinů *Arabidopsis* (TAIR 10) a ProteinScape, který dodatečně zpracoval identifikované peptidy/proteiny. Spolehlivost identifikace byla určena FDR<1% (false discovery rate). Závěrečný krok v programu představoval přiřazení jednotlivých bucketů k identifikovaným peptidům.

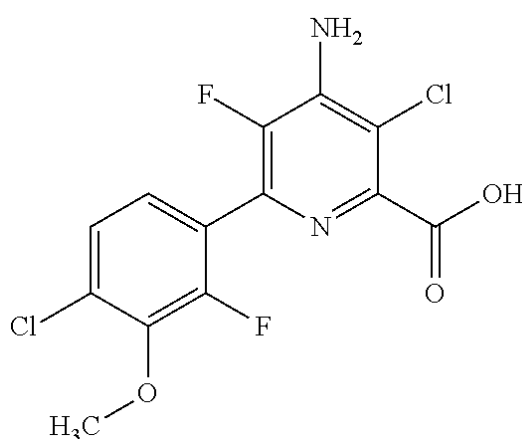
4.5.4 Analýza dat v programu Skyline

Na základě předešlých analýz jsme získali údaje o sekvenci identifikovaného peptidu a názvu proteinu, ke kterému byl daný peptid přiřazen. Dále jsme měli k dispozici hodnoty m/z, náboj, retenční čas, hodnoty Score (pro naše účely byly brány peptidy s hodnotou vyšší než 20), sekvenci aminokyselin peptidu a jeho modifikace, regulaci vypočítanou pomocí automatické analýzy. Byly brány v potaz pouze proteiny, které byly regulované pod 0,7 a nad 1,4 bez modifikací methionin, glutamin, asparagin a cystein. Pro práci v programu Skyline jsme získané údaje zapsali do tabulky, která sloužila jako přehledný podklad pro vyhodnocování.

Skyline je volně dostupný program pro akademické i komerční využití pro kvantitativní analýzu dat. Na základě vložených dat automaticky přiřadí jednotlivé píky. Toto automatické přiřazování bylo nutné manuálně zkontrolovat z důvodu vysokého procenta chybného přiřazení a případné chybné označení píky opravit především na základě znalosti správného retenčního času. Abychom protein mohli označit za regulovaný, je nutné nalézt alespoň dva regulované peptidy.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cytokinininy mají významnou roli nejen ve vlastním vývoji rostliny, ale i v adaptaci na okolní prostředí. Mimo jiné je známo, že zvyšují odolnost rostlin vůči suchu, oddalují senescenci a podílejí se na odpovědi k teplotnímu stresu (viz 3.2.8 Funkce cytokininů). Praktické využití je zatím limitováno, protože využití geneticky modifikovaných organismů není obecně povoleno. Vhodnou alternativou může být využití farmak. V současné době se vedle anticytokininů také experimentuje s nejrůznějšími inhibitory biochemických procesů spojených s cytokinininy. Modulace hladin cytokininů může mít za následek zajímavé a v praxi užitečné uplatnění. Například experimenty zabývající se zvýšením hladiny cytokininů prokázaly, že v důsledku snížení exprese CKX mohou rostliny rýže produkovat více zrněk vlivem změny květenství, což vede ke zvýšení výnosu dané plodiny (Ashikari et al., 2005). Mezi takové látky inhibiční povahy patří například i 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin (**inhibitor of cytokinin degradation, INCYDE**); (Obr. 8). Tato látka je inhibitorem klíčového enzymu CKX v procesu katabolismu a inaktivace cytokininů (Zatloukal et al., 2008). Její účinnost prokázali Aremu a kolektiv, kdy sice po aplikaci INCYDEu nebyl odvrácen negativní účinek salinity způsobený ošetřením NaCl, ale byl pozorován pozitivní vliv na počet květů a snížení hladiny indikátoru oxidačního stresu malondialdehydu (Aremu et al., 2014).



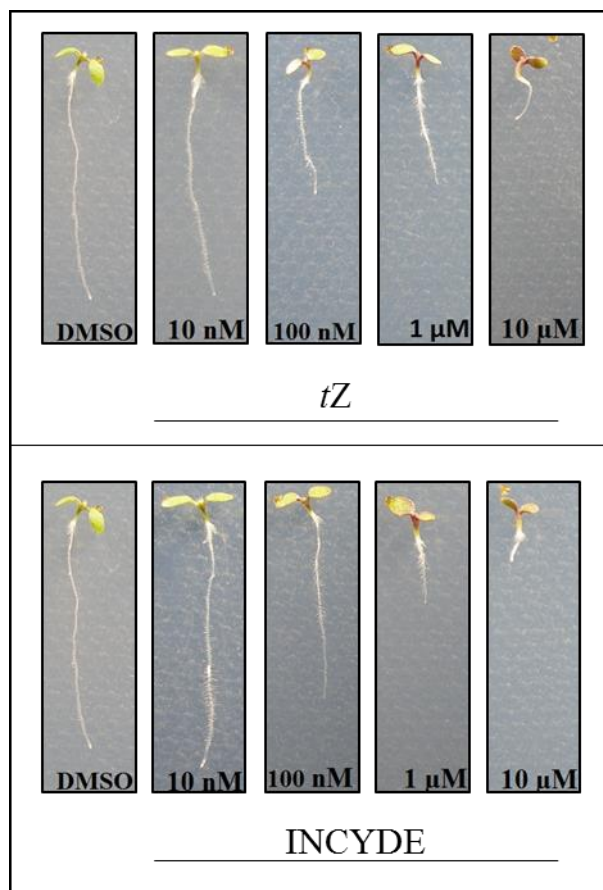
Obr. 8: Chemická struktura 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin (INCYDE)

Jelikož aplikace INCYDEu vede k nárůstu hladiny aktivních cytokininů, jedná se do jisté míry o podobný efekt, jakým je exogenní aplikace cytokininu. Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vliv a případný rozdíl v působení *tZ* a INCYDEu na semenáčky *Arabidopsis* z fyziologického a proteomického hlediska. Mimo základního sledování rostliny divokého typu bylo použito i mutantních linií s narušenou dráhou proteasomové signalizace, které mají narušenou odezvu na cytokinin.

5.1 Porovnání vlivu *tZ* a INCYDEu na morfometrické parametry semenáčků *Arabidopsis thaliana*

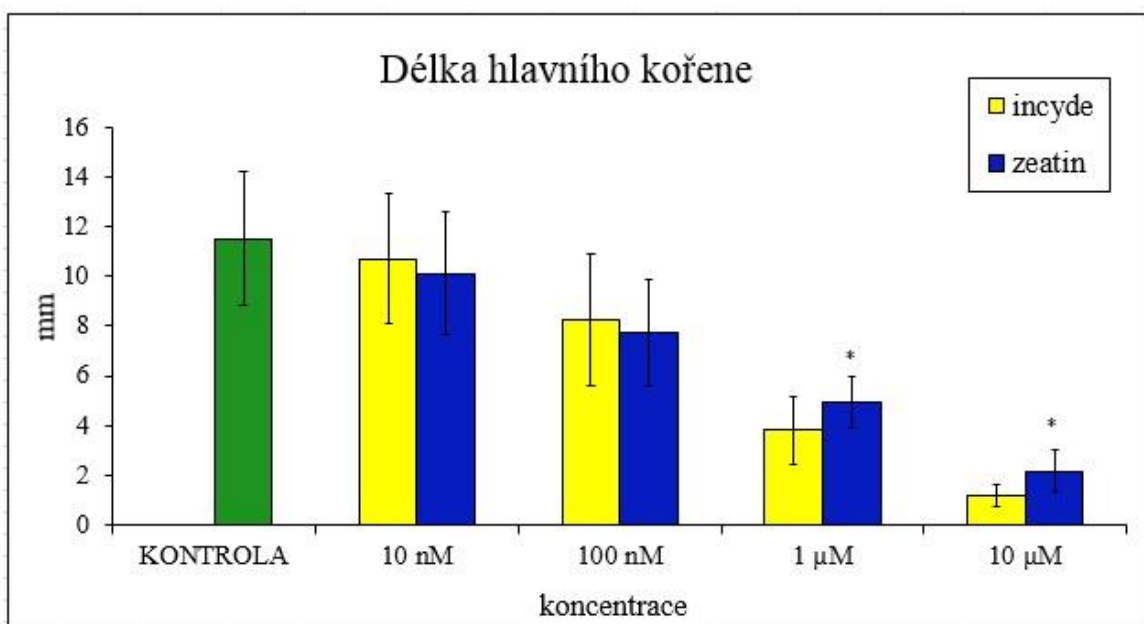
Jako rostlinný materiál jsme zvolili *Arabidopsis* ekotyp Col-0. Porovnávali jsme vliv exogenního přídatku *tZ* a INCYDEu na morfologické parametry. Vzhledem k tomu, že modulace hladiny cytokininů při aplikaci INCYDEu spoléhá na vlastní biosyntézu cytokininů, chtěli jsme porovnat, jak silného fenotypu je možné dosáhnout s koncentrační řadou INCYDE. Byl porovnán jeho účinek s *tZ*, který patří mezi cytokininy se silným účinkem (Spichal, 2012). Pro sledování účinků byla zvolena exponenciální škála koncentrací počínající od 10 nM po 10 μ M. Jako kontrola sloužily vzorky kultivované na čistém médiu s DMSO bez přidané látky zájmu. Jako základní parametr byla stanovena délka hlavního kořene, jelikož jsou cytokininy známy svým inhibičním vlivem na jeho růst.

Působení regulátorů růstu bylo patrné již okometricky (viz obr. 9). V porovnání s kontrolou je vidět, že se zvyšující se koncentrací *tZ* nebo INCYDEu dochází ke zkracování délky hlavního kořene a u koncentrace 10 μ M se hlavní kořen téměř nevyvinul a nedosahoval ani 10 % délky kořene kontrolních rostlin. Celkově vykazovaly rostliny kultivované při vyšších koncentracích aberantní růst a s rostoucí koncentrací bylo možné sledovat hromadění fialových barviv, a to u ošetření oběma látkami. Zfialovění hypokotylů u silnějších koncentrací bylo předpokládáno na základě předchozích studií, které prokázaly hromadění antokyanových barviv u *Arabidopsis* ošetřených cytokininy (Deikman a Hammer, 1995).



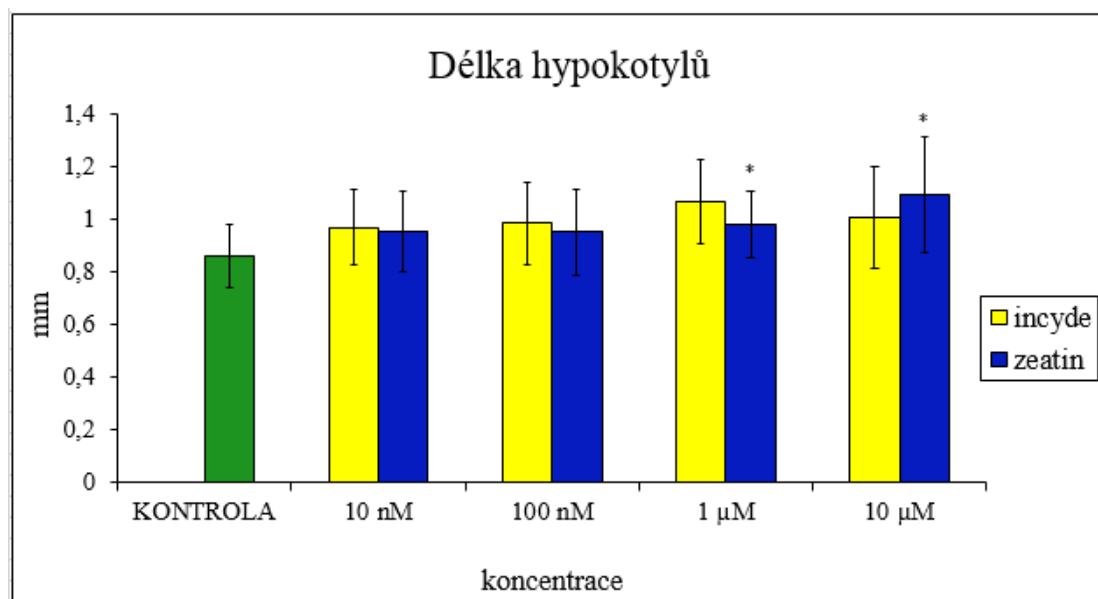
Obr. 9: Fenotyp rostlin ošetřených *tZ* a *INCYDEu*. Na obrázku jsou zobrazeny vybrané reprezentativní rostliny kultivované na médiu s přidavkem příslušných koncentrací *tZ* a *INCYDEu* (10 nM, 100 nM, 1 μM a 10 μM). DMSO je kontrola bez přidané látky zájmu.

Porovnání účinků *INCYDEu* s *tZ* v kořenové bioeseji prokázalo vysoký potenciál *INCYDEu* jako faktoru navozujícího silnou cytokininovou odpověď. Navzdory tomu, že je zvýšení cytokininů závislé na vlastní biosyntéze, bylo působení *INCYDEu* v nižších koncentracích srovnatelné s působením *tZ* a u vyšších koncentrací 1 a 10 μM byl účinek dokonce výraznější u *INCYDEu* než u *tZ* a to statisticky signifikantně (Obr. 10, $\alpha < 0,05$). Dříve bylo popsáno, že vysoké hladiny cytokininů mohou způsobovat oxidační poškození rostlin (Novák et al., 2013) a navozovat apoptózu již při koncentracích v řádech desítek mikromolů (Carimi et al., 2005). Porovnání působení *tZ* a *INCYDEu* naznačuje, že je možné pomocí inhibitoru CKX modulovat hladiny cytokininů od drobných změn až po stavy, kdy cytokininy působí svými vysokými hladinami již závažné poškození. Na základě našich výsledků můžeme potvrdit, že *tZ* a *INCYDE* mají podobné důsledky pro změny fenotypu u rostlin.



Obr. 10: Vliv koncentrací tZ a INCYDEu na délku hlavního kořene. Na obrázku je zobrazena koncentrační řada tZ a INCYDEu pro měření délky hlavního kořene. Sloupce reprezentují průměrné hodnoty a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku naměřeného souboru. Hvězdička označuje statisticky signifikantní rozdíl mezi působením tZ a INCYDEu ($p < 0.05$).

Cytokiny jsou známy svou rolí regulace přechodu mezi skotomorfogenezí a fotomorfogenezí (Chory et al., 1994). Mezi jejich působení patří rovněž ovlivňování délky hypokotylu (Smets et al., 2005; Novák et al., 2015), proto jsme zařadili do našeho experimentu i měření délky hypokotylu. Nicméně standardní intenzita světla užitá pro kultivaci ($100-120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) byla již natolik vysoká, že nebyl na hypokotylu pozorován významně statisticky signifikantní vliv cytokininů v elongaci hypokotylu (Obr. 11). To je v souladu s detailní analýzou vlivu cytokininů na prodlužování hypokotylu, která dokládá snižování vlivu cytokininů se zvyšováním světelné intenzity (Kuklová et al., nepublikováno).



Obr. 11: Vliv koncentrací tZ a INCYDEu na délku hypokotylu. Na obrázku je zobrazena koncentrační řada pro měření délky hypokotylu. Sloupce reprezentují průměrné hodnoty a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku naměřeného souboru.

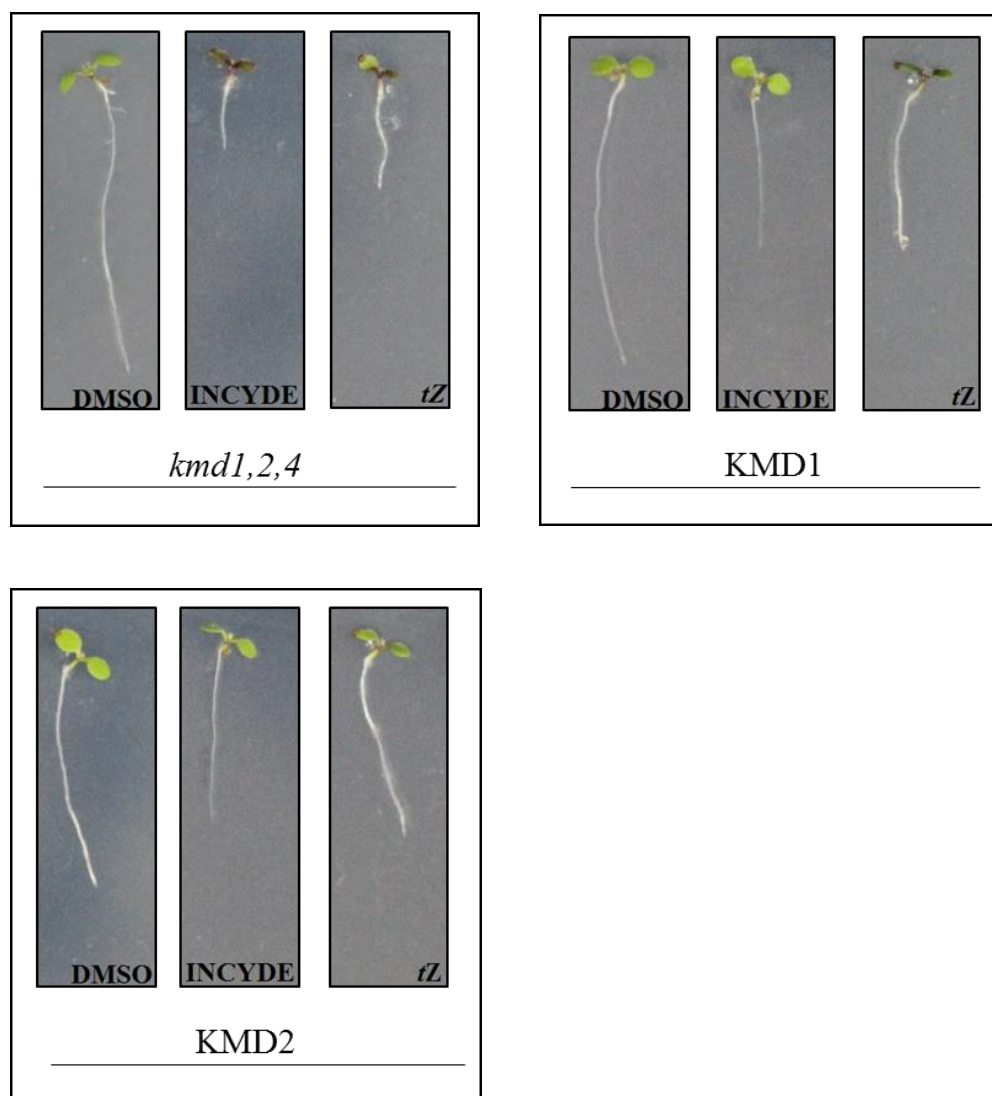
Na základě fyziologických výsledků jsme pro následné pokusy zvolili koncentraci 0,5 μM tZ nebo INCYDEu, která již vykazovala významné účinky látek na změny fenotypu a přitom ještě nepůsobila výrazné poškození růstu kořene.

5.2 Porovnání vlivu tZ a INCYDEu na linie s pozměněnou cytokininovou signalizací

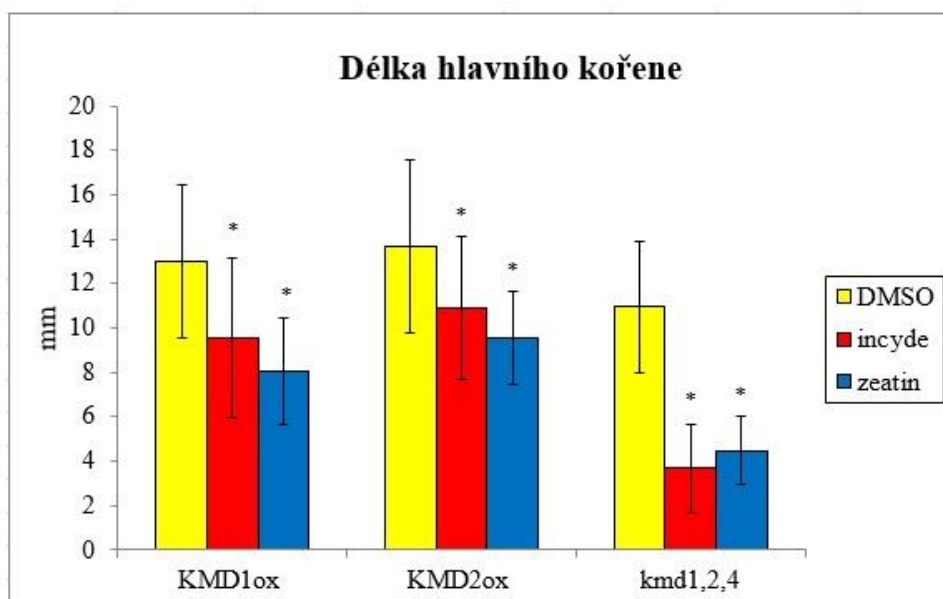
U signální dráhy cytokininů existuje významná redundance a překryvy ve funkcích receptorů, AHP proteinů, tak i u regulátorů odpovědi. Přesto je známo, že některé složky této signalizace mohou být specifické pro určité signály. Různé receptory cytokininů jsou různě citlivé k odlišným typům cytokininů (Spíchal et al., 2004; Stolz et al., 2011) a v jejich funkci hraje roli i místo jejich lokalizace na úrovni rostlinných orgánů (Novák et al., 2015). U signalizace cytokininů je mimo kanonickou dráhu známa i postranní signalizace přes proteiny CRF. Abychom otestovali, zda je působení INCYDEu a tZ shodné na úrovni různých signálních drah, použili jsme pro analýzu změny fenotypu linie s pozměněnou kanonickou cytokininovou signalizací. Pro experiment byly použity transgenní rostliny 35S::*KMD1*, 35S::*KMD2*, *kmd1-1;kmd2-1;kmd4-1* (*kmd1,2,4*). KISS ME DEADLY (KMD) je označení pro členy rodiny F-box proteinů, které ubikvitinují

transkripční faktory regulátorů ARR-typu B v cytokininové signalizaci. Jde tedy o negativní regulátory kanonické cytokininové signalizace. Byl testován jak vliv zvýšené exprese těchto proteinů (*KMD1ox* a *KMD2ox*), tak i vliv vícenásobných mutantů *kmd1,2,4* s posílenou cytokininovou signalizací (Kim et al., 2013).

Experiment proběhl podobným způsobem jako u kultivace rostlin divokého typu, s tím rozdílem že jsme zvolili koncentraci 0,5 μ M *tZ* nebo INCYDEu, a to na základě výsledků předešlého experimentu, jak již bylo zmíněno. Opět jsme měřili morfologické parametry: délku hlavního kořene a délku hypokotylu. Na obr. 12 je vidět zřejmý rozdíl v délce hlavního kořene a vzhledu rostliny vůbec. Účinek na kořen byl však téměř dvojnásobný u mutantní linie *kmd1,2,4* (Obr. 13).

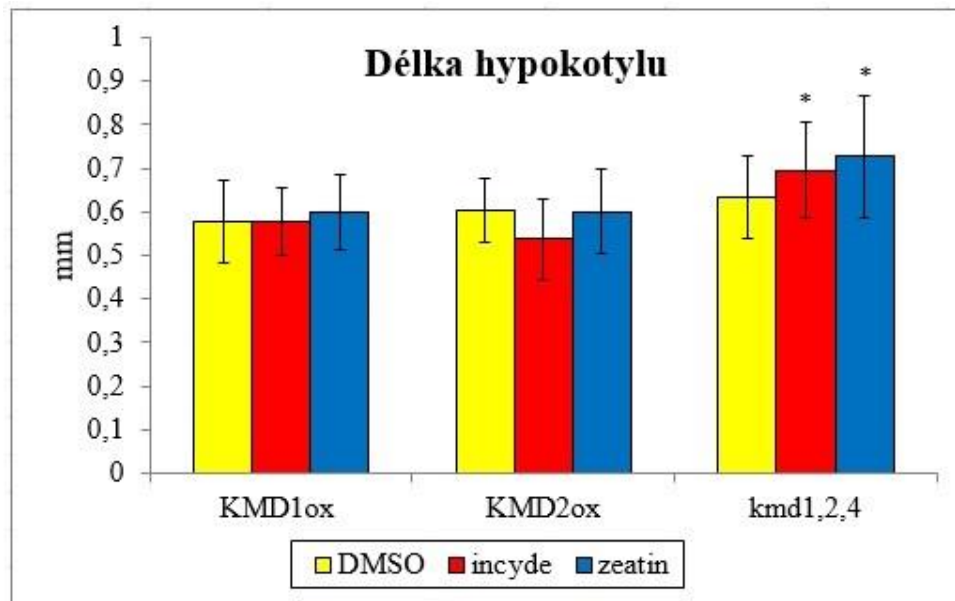


Obr. 12: Projev *tZ* a INCYDEu na fenotyp *KMD*. Na obrázku jsou zobrazeny vybrané reprezentativní rostliny *KMD1*, *KMD2*, *kmd1,2,4* kultivované na médiu s přidáním 0,5 μ M *tZ*, INCYDEu. DMSO je kontrola, nebyla tedy přidána žádná látka.



Obr. 13: Grafické zobrazení délky hlavního kořene u linií *Arabidopsis* s pozměněnou cytokininovou signalizací. KMD1 a KMD2 je overexpresor, zatímco kmd1,2,4 je mutant. Hvězdička označuje statisticky signifikantní rozdíl mezi působením regulátoru a kontrolní rostliny ($p < 0.05$).

Navzdory tomu, že byl již u neošetřených transgenních a mutantních linií sledován posun v délce hlavního kořene v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 12), nebyl po ošetření *tZ* a *INCYDEu* shledán žádný statisticky signifikantní rozdíl v působení těchto látek. Stejný výsledek mělo i stanovení délky hypokotylu (Obr. 14), kdy se ukázalo, že mezi působením *tZ* a *INCYDEu* není statisticky signifikantní rozdíl, i když ošetření u mutantní linie vykazovalo statisticky významné prodloužení hypokotylů oproti neošetřené linii. Lze tedy soudit, že pro sledované morfologické změny nejsou u *tZ* a *INCYDEu* rozdílně využívány paralelní signální komponenty cytokininové signalizace.

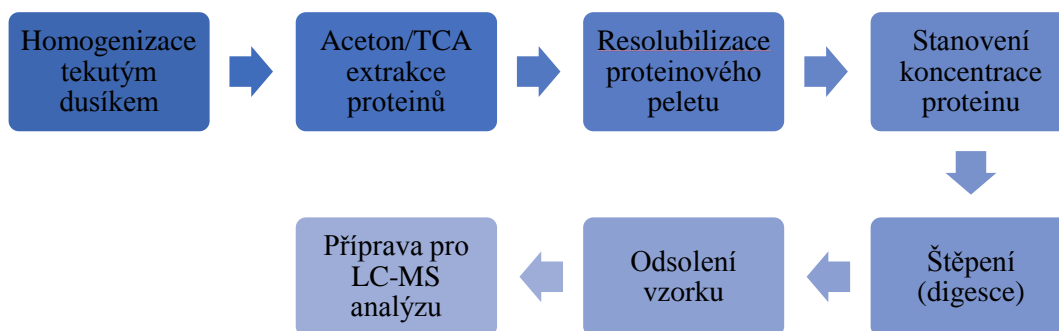


Obr. 14: Grafické zobrazení délky hypokotylu u linií *Arabidopsis* s pozměněnou cytokininovou signalizací. *KMD1* a *KMD2* je overexpresor, zatímco *kmd1,2,4* je mutant. Hvězdička označuje statisticky signifikantní rozdíl mezi působením regulátoru a kontrolní rostliny ($p < 0.05$).

5.3 Rostlinný materiál pro proteomickou část

Z výsledků fyziologie lze konstatovat, že exogenní přídavek *tZ* a *INCYDEu* má velmi podobný účinek na morfologické parametry *Arabidopsis*. Dalším krokem bylo ověřit, zda to tak je i na úrovni proteomu.

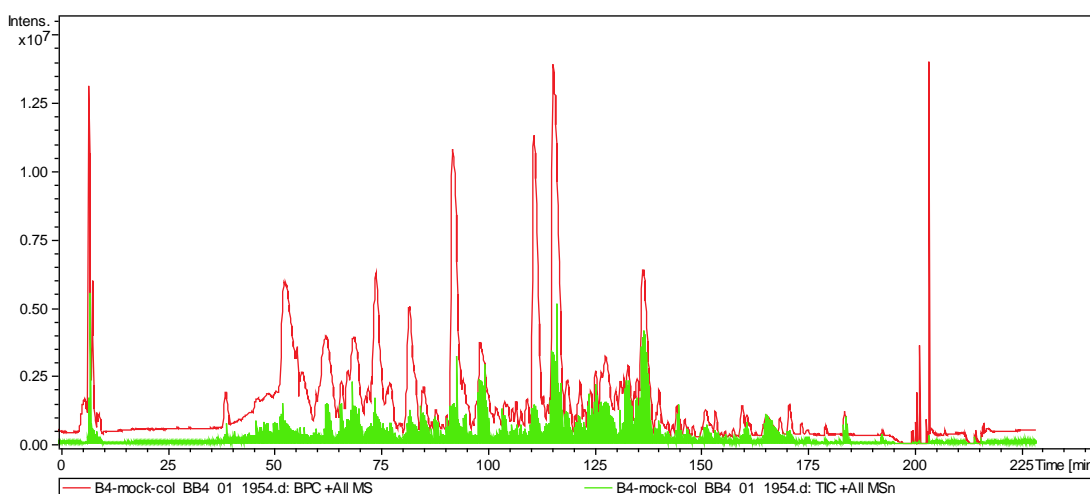
Kultivace rostlinného materiálu probíhala 7 dní na síťkách na médiu bez přidané látky zájmu. Po 7 dnech došlo k aktivaci rostlin na síťkách v roztoku obsahující 0,5 μM *tZ* nebo *INCYDEu* a poté byly na 24 hodin přeneseny na médium s přídavkem 0,5 μM regulátoru. Následně proběhl sběr vzorků (viz kapitola 4 Materiál a metodika). Jednotlivé vzorky byly připraveny pro analýzu hmotnostní spektrometrií dle schématu, které je zobrazeno na obr. 15.



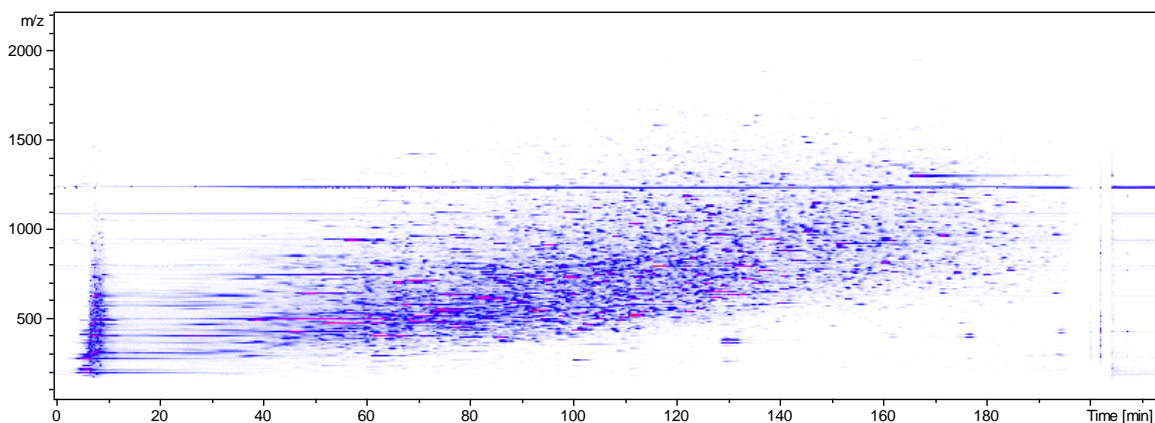
Obr. 15: Průběh přípravy vzorku pro LC-MS analýzu.

5.4 Proteomická analýza a její následné vyhodnocení

Připravené vzorky byly analyzovány metodou LC-MS pomocí C₁₈ reverzní chromatografie, která byla napojená k nanoESI zdroji a UHR-TOF spektrometru. Pro separaci peptidů byl zvolen gradient ACN 4-35% po dobu 180 minut. Průběh separace je znázorněn na následujícím chromatogramu (obr.16), kde můžeme vidět, že rozložení intenzit bylo v průběhu celé analýzy dobré.

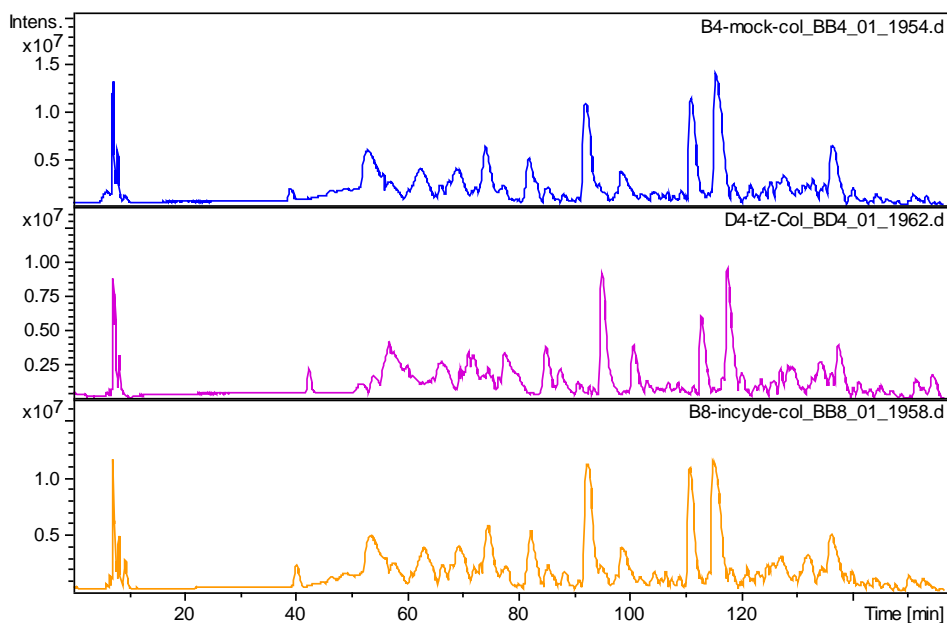


Obr. 16: Průběh analýzy chromatogramem. Na obrázku je zobrazena ukázka z průběhu analýzy chromatogramem. Obrázek je získaný z programu DataAnalysis 4.1.



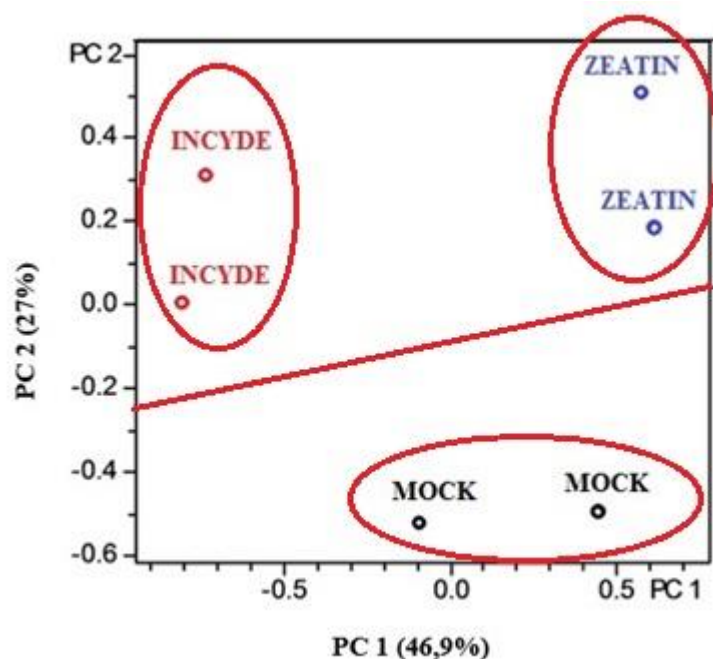
Obr. 17: Znáznornění LC-MS analýzy pomocí mapy m/z v čase (bucketů). Intenzita odpovídá velikosti signálů. Obrázek je získaný z programu DataAnalysis 4.1.

Následně jsme provedli porovnání vzorků prostřednictvím tzv. Base Peak Chromatogram, která zobrazuje pouze nejintenzivnější iont v každém spektru. Výsledné porovnání není překvapivé, protože analyzované rostliny byly vizuálně identické, a tak lze předpokládat, že hlavní složky jejich proteomu (které vystihuje BCP chromatogram) budou shodné.



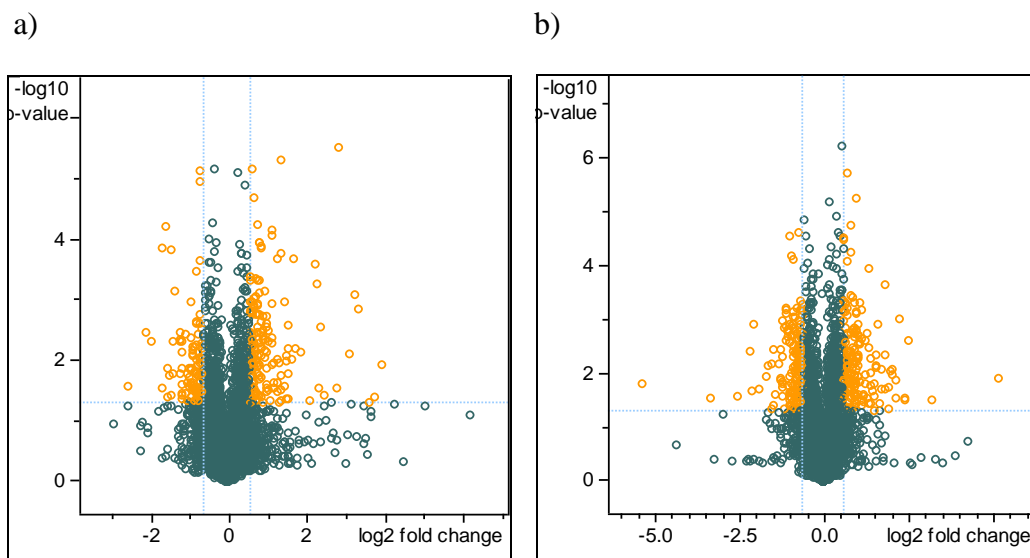
Obr. 18: Porovnání shodnosti vzorků. Porovnání BCP chromatogramů kontrolních rostlin a rostlin vystavených po dobu 24 hodin účinku $0,5 \mu\text{M}$ tZ (fialová) či INCYDEu (žlutá). Mock představuje kontrolu bez přidané látky zájmu (modrá).

Následně proběhlo zpracování dat v programu ProfileAnalysis 2.1, kde bylo provedeno statistické zpracování pomocí analýzy hlavních komponent (PCA analýza).



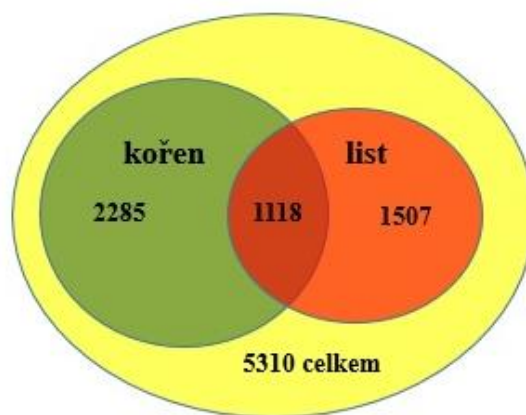
Obr. 19: Výstup z PCA analýzy. U předchozího obrázku bylo řečeno, že se tZ a INCYDE téměř neliší (dáno stejnou fází vývoje), což ale neplatí u PCA analýzy. Po porovnání všech změřených hodnot vidíme, že se INCYDE a tZ vzdalují od kontroly, což jasně prokazuje jejich rozdílné účinky. Dále můžeme na základě tohoto výsledku říci, že tZ se podobá spíše kontrole.

Následně byl proveden párový T-test k nalezení bucketů, které jsou významně pozměněny mezi kontrolní rostlinou a rostlinou ošetřenou regulátory (obr. 20).



Obr. 20: Párový T-test. Výstup z programu ProfileAnalysis 2.1 (T-test): (a) Jedná se o párové srovnání tZ a mock. (b) Párové srovnání INCYDEu a mock. Žlutě jsou označeny významně regulované buckety, zelené označení nesou buckety neregulované.

Rozdíl mezi *tZ* a INCYDEm může být v místě působení. Zatímco *tZ* působí všude v rostlině, kde se vyskytují receptory, INCYDE jen v místech s přítomností CKX. Distribuce „aktivních“ cytokininů je tak provázána s distribucí enzymu CKX a jeho aktivitou, proto jsme kromě 7denní kultivace zvolili shodný experiment s 14-ti denní kultivací, ve kterém jsme chtěli zjistit, zda se účinek INCYDEu liší na úrovni kořene a nadzemní části rostliny. Z časového omezení proběhla pouze příprava vzorků a jejich změření hmotnostní spektrometrií. Analýza získaných dat bude předmětem návazné práce.



Obr. 21: Vennův diagram. Schematické zobrazení nalezených proteinů v kořenové a nadzemní části rostliny (list). Bylo identifikováno celkem 5310 proteinů, z čehož pouze 1118 bylo detekováno jak v kořenové, tak v listové části.

6 ZÁVĚR

Zemědělství je z hlediska života lidské populace klíčovým bodem v její obživě. Efektivita a produkce je však závislá na mnoha faktorech. Na jedné straně je odrazem samotných kultivarů rostlin, ale na druhé straně je do značné míry dána vnějším prostředím, které působí na plodiny mnoha biotickými a abiotickými stresory jako jsou škůdci, patogeny, nedostatek vody, vysoká teplota či nedostatek nutričních látek v půdě. Nátlak na zvyšování zemědělské produkce je značně vysoký, přičemž metody klasického šlechtění jsou zdoluhavé, jelikož vyšlechtění nové odrůdy trvá více než 10 let a šlechtitelé ani neví, jaké vlastnosti rostlin budou za takovou dobu žádané. Vzhledem k tomu, že současná legislativa nepovoluje pěstování geneticky modifikovaných rostlin s cílenou změnou genomu, začaly se vyvíjet i alternativní přístupy, jejichž cílem je dosáhnout stejných výsledků jako mají GMO. Mezi střed zájmu patří modulace hladin fytohormonů, které významnou měrou ovlivňují růst a vývoj rostlin. V této práci jsme se zaměřili na sledování účinku nového farmaka INCYDEu, který navyšuje hladiny cytokininů, vykazujících řadu pozitivních vlastností v růstu a odolnosti rostlin.

V bakalářské práci byl sledován vliv aplikace INCYDEu, který inhibuje aktivitu enzymů CKX a tím brání degradaci aktivních cytokininů. Vliv INCYDEu byl na úrovni morfologických změn a změn proteomu porovnáván s exogenním ošetřením rostlin *Arabidopsis thaliana* cytokininem *trans*-zeatinem. V práci bylo bioesejí demonstrováno, že INCYDE má srovnatelné účinky s obecně velmi aktivním cytokininem *trans*-zeatinem. Navzdory tomu, že *trans*-zeatin a INCYDE mají srovnatelný účinek na délku hlavního kořene, proteomická analýza odhalila, že obě látky působí odlišně na úrovni proteomu, což může být dáno jak místem působení těchto látek, tak i rozdílnou hladinou populace různých cytokininových typů, které ošetření vyvolalo.

V následující studii budou vyhodnocena veškerá data získaná z hmotnostní spektrometrie, bude provedena transkriptomická a metabolická analýza působení těchto látek. Rovněž bude zkoumáno, zda je účinek INCYDEu odlišný v kořenové a nadzemní části rostliny.

Tato práce vznikla s podporou projektu CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje (ERDF).

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. AREMU, A. O., MASONDO, N. A., SUNMONU, T. O., KULKARNI, M. G., ZATLOUKAL, M., SPICHAL, L., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J., 2014: A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta*, 240(4): 877-889. ISSN 1432-2048.
2. ARGUESO, C. T., FERREIRA, F. J. A KIEBER, J. J., 2009: Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment*, 32(9): 1147–1160. ISSN 1365-3040.
3. ASHIKARI, M., SAKAKIBARA, H., LIN, S., YAMAMOTO, T., TAKASHI, T., NISHIMURA, A., ANGELES, E. R., QIAN, Q., KITANO, H., MATSUOKA, M., 2005: Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309(5735): 741–745. ISSN 1095-9203.
4. ÅSTOT, C., DOLEZAL, K., NORDSTRÖM, A., WANG, Q., KUNKEL, T., MORITZ, T., CHUA, N.-H., SANDBERG, G., 2000: An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26): 14778–14783. ISSN 1091-6490.
5. AVALBAEV, A. M., SOMOV, K. A., YULDASHEV, R. A., SHAKIROVA, F. M., 2012: Cytokinin oxidase is key enzyme of cytokinin degradation. *Biochemistry (Moscow)*, 77(12): 1354–1361. ISSN 1608-3040.
6. BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254. ISSN 1096-0309.
7. BRZOBOHATÝ, B., MOORE, I., KRISTOFFERSEN, P., BAKO, L., CAMPOS, N., SCHELL, J., PALME, K., 1993: Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136): 1051-1054. ISSN 1095-9203.
8. CAESAR, K., THAMM, A. M. K., WITTHÖFT, J., ELGASS, K., HUPPENBERGER, P., GREFEN, C., HORAK, J., HARTEK, K., 2011: Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in

- the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62(15): 5571–5580. ISSN 1460-2431.
9. CARIMI, F., ZOTTINI, M., FORMENTIN, E., TERZI, M., LO SCHIAVO, F., 2003: Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216(3): 413–421. ISSN 1432-2048.
 10. ČERNÝ, M., JEDELSKÝ, P. L., NOVÁK, J., SCHLOSSER, A., BRZOBOHATÝ, B., 2014: Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 37(7): 1641-1655. ISSN 1365-3040.
 11. CHATTERJEE, M., GUPTA, S., BHAR, A. A DAS, S., 2012: Optimization of an efficient protein extraction protocol compatible with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry from recalcitrant phenolic rich roots of chickpea (*Cicer arietinum L.*). *International Journal of Proteomics*, 2012: 10s. ISSN 0976-4895.
 12. CHEN, S., HARMON, A. C., 2006: Advances in plant proteomics. *Proteomics*, 6: 5504–5516. ISSN 1615-9861.
 13. CHMELÍK, J., 2005: Proteomický průvodce. *Chemické listy*, 99: 883–885. ISSN 1213-7103.
 14. CHORY, J., REINECKE, D., SIM, S., WASHBURN, T., BRENNER, M., 1994: A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. Det mutants have an altered response to cytokinins. *Plant Physiology*, 104: 339-347. ISSN 1532-2548.
 15. CORTLEVEN, A., NOBEN, J.-P., VALCKE, R., 2011: Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science*, 9(1): 33 s. ISSN 1477-5956.
 16. DAVIES, P. J., 2004: Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Dordrecht: Springer. ISBN 978-1402026850
 17. DEIKMAN, J., HAMMER, P. E., 1995: Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 108(1): 47–57. ISSN 1532-2548.

18. DOBRÁNSZKI, J., MENDELER-DRIENYOVSZKI, N., 2014: Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(16): 1472–1478. ISSN 0176-1617.
19. DOMON, B., AEBERSOLD, R., 2006: Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771): 212–217. ISSN 1095-9203.
20. FAUROBERT, M., PELPOIR, E., CHAÏB, J., 2007: Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 335(2): 9–14. ISSN 1064-3745.
21. FERREIRA, F. J. A KIEBER, J. J., 2005: Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5): 518–525. ISSN 1369-5266.
22. FRÉBORT, I., KOWALSKA, M., HLUSKA, T., FRÉBORTOVÁ, J., GALUSZKA, P., 2011: Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2431–2452. ISSN 1460-2431.
23. FRIEDECKÝ, D. A LEMR, K., 2012: Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Chemické Listy*, 20(3): 152–157. ISSN 1213-7103.
24. GAN, S., AMASINO R.M., 1995: Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1986-1988. ISSN 1095-9203.
25. HABERER, G. A KIEBER, J. J., 2002: Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*, 128(2): 354–362. ISSN 1532-2548.
26. HABERLANDT, G., 1913: Zur physiologie der zellteilung. *Sitzungsber Akad Wiss Berlin Phys Math*: 318-345. ISSN 0233-0954
27. HEYL, A., SCHMÜLLING, T., 2003: Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5): 480–488. ISSN 1369-5266.
28. HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBUSADA, T., HAYASHI, H., SAKAKIBARA, H., 2008: Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 75–83. ISSN 1460-2431.
29. KAPCHINA-TOTEVA, V., STOYANOVA D., 2003: Effect of cytokinins and cytokinin antagonists on in vitro cultured *Gypsophila paniculata* L. *Biologia Plantarum*, 46(3): 337-341. ISSN 1573-8264.

30. KASAHARA, H., TAKEI, K., UEDA, N., HISHIYAMA, S., YAMAYA, T., KAMIYA, Y., YAMAGUCHI, S., SAKAKIBARA, H., 2004: Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14): 14049–14054. ISSN 1083-351X.
31. KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E., 2014: Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12, <http://doi.org/10.1199/tab.0168>. ISSN: 1543-8120
32. KOVÁŘOVÁ, H., 2005: Proteomika v postgenomové době. *Chemické Listy*, 99(12): 886–889. ISSN 1213-7103.
33. KURAKAWA, T., UEDA, N., MAEKAWA, M., KOBAYASHI, K., KOJIMA, M., NAGATO, Y., SAHAKIBARA, H., KYOZUKA, J., 2007: Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128): 652-655. ISSN 1476-4687.
34. LETHAM, D.S., 1963: Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life sciences*, 2(8): 569-573. ISSN 0024-3205.
35. MILLER, C. O., SKOOG, F., OKUMURA, F. S., VON SALTRA, M. H., STRONG, F. M., 1955: Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, 77(9): 2662-2663. ISSN 1520-5126.
36. MIYAWAKI, K., TARKOWSKI, P., MATSUMOTO-KITANO, M., KATO, T., SATO, S., TARKOWSKA, D., TABATA, S., SANDBERG, G., KAKIMOTO, T., 2006: Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44): 16598-16603. ISSN 1091-6490.
37. MURAI, N., 2014: Review: Plant growth hormone cytokinins control the crop seed yield. *American Journal of Plant Sciences*, 5(14): 2178–2187. ISSN 1091-6490.
38. NISLER, J., ZATLOUKAL, M., POPA, I., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., SPÍČHAL, L., 2010: Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry*, 71(7): 823–830. ISSN: 0031-9422.
39. NORDSTRÖM, A., TARKOWSKI, P., TARKOWSKA, D., NORBAEK, R., ÅSTOT, C., DOLEZAL, K., SANDBERG, G., 2004: Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance

- for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21): 8039–8044. ISSN 1091-6490.
40. NOVÁK, J., ČERNÝ, M., PAVLŮ, J., ZEMÁNKOVÁ, J., SKALÁK, J., PLAČKOVÁ, L., BRZOBOHATÝ, B., 2015: Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root to hypocotyl ratio changes induced by shading roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, doi: 10.1093/pcp/pcv026.
41. NOVÁK, J., PAVLŮ, J., NOVÁK, O., NOŽKOVÁ-HLAVÁČKOVÁ, V., ŠPUNDOVÁ, M., HLAVINKA, J., KOUKALOVÁ, Š., SKALÁK, J., ČERNÝ, M., BRZOBOHATÝ B., 2013: High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in *tobacco*. *Annals of Botany*, 112: 41-55. ISSN 1095-8290.
42. PAČES, V., WERSTIUK, E., HALL R.H., 1971: Conversion of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, 48: 775–778. ISSN 1532-2548.
43. PHIZICKY, E., BASTIAENS, P. I. H., ZHU, H., SNYDER, M., FIELDS, S., 2003: Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 422: 208-215. ISSN 1476-4687.
44. PROCHÁZKA, S. a kol., 1999: Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 484 s. ISBN 80-200-0586-2
45. RAO, S. S. R., VARDHINI, B. V., SUJATHA, E., ANURADHA, S., 2002: Brassinosteroids – A new class of phytohormones. *Current science*, 82(10): 1239–1245. ISSN: 0011-3905.
46. RASHOTTE, A. M., MASON, M. G., HUTCHISON, C. E., FERREIRA, J. F., SCHALLER, G. E., KIEBER, J. J., 2006: A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29): 11081-11085. ISSN 1091-6490.
47. RIVERO, R. M., KOJIMA, M., GEPSTEIN, A., SAKAKIBARA, H., MITTLER, R., GEPSTEIN, S., BLUMWALD, E., 2007: Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49): 19631–19636. ISSN 1091-6490.

48. SAKAKIBARA, H., 2006: Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431–449. ISSN 1543-5008.
49. SCHALLER, G. E., BISHOPP, A., KIEBER, J. J., 2015: The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell Online*, 27(1): 44-63. ISSN 1532-298X.
50. SCHALLER, G. E., STREET, I. H., KIEBER, J. J., 2014: Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 7–15 s. ISSN 1369-5266.
51. SKOOG, F. A MILLER, C. O., 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118-131. ISSN 0081-1386
52. SMETS, R., LE, J., PRINSEN, E., VERBELEN, J.-P., VAN ONCKELEN, H. A., 2005: Cytokinin-induced hypocotyl elongation in light-grown *Arabidopsis* plants with inhibited ethylene action or indole-3-acetic acid transport. *Planta*, 221: 39-47. ISSN 1432-2048.
53. SPÍČHAL, L., 2012: Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4): 267–284 s. ISSN 1445-4416.
54. SPÍČHAL, 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 and Cell Physiology*, 45(9): 1299-1305. ISSN 1471-9053.
55. SPÍČHAL, L., WERNER, T., POPA, I., RIEFLER, M., SCHMÜLLING, T., STRNAD, M., 2009: The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *FEBS Journal*, 276(1): 244–253. ISSN 1742-4658.
56. STOLZ, A., RIEFLER, M., LOMIN, S. N, ACHAZI, K., ROMANOV, G. A., SCHMÜLLING, T., 2011: The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, 67(1): 157-168. ISSN 1365-313X.
57. TAIZ, L., ZEIGER, E., 2010: Plant physiology. 5. vyd. Sunderland: Sinauer Associated, str.782. ISBN 978-0-87893-565-9.

58. TO, J. P. C., KIEBER, J. J., 2008: Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*, 13(2): 85–92. ISSN 1360-1385.
59. WERNER, T. A SCHMÜLLING, T., 2009: Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5): 527–538. ISSN 1369-5266.
60. WERNER, T., MOTYKA, V., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T., 2001: Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18): 10487-10492. ISSN 1091-6490.
61. ZALABÁK, D., POSPÍŠILOVÁ, H., ŠMEHILOVÁ, M., MRÍZOVÁ, K., FRÉBORT, I., GALUSZKA, P., 2013: Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances*, 31: 97-117. ISSN 0734-9750.
62. ZATLOUKAL, M., GEMROTOVÁ, M., DOLEŽAL, K., HAVLÍČEK, L., SPÍCHAL, L., A STRNAD, M., 2008: Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(20): 9268–9275. ISSN 0960-894X
63. ZHANG, X., CHEN, Y., LIN, X., HONG, X., ZHU, Y., LI, W., HE, W., AN, F., GUO, H., 2013: Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 6(5): 1661–1672. ISSN 1752-9867.
64. ZHANG, Y., FONSLow, B. R., SHAN, B., BAEK, M.-C. A YATES, J. R., 2013: Protein Analysis by Shotgun / Bottom-up Proteomics. *Chemical reviews*, 113: 2343-2394. ISSN 1520-6890.

8 SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
ADK	adenosin kináza
ADP	adenosindifosfát
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfotransferový protein
AMP	adenosinmonofosfát
APT	adenin fosforibosyltransferáza
ARR	regulátor odpovědi u <i>Arabidopsis</i>
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzyladenin
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DMAPP	dimethylallyl pyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DZ	dihydrozeatin
ER	endoplazmatické retikulum
His	histidin
HMBDP	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfát
HPt	histidin fosfotransferový protein
INCYDE	2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin
iP	isopentenyladenin
iPRDP	isopentenyladenosine-5'-difosfát
iP RTP	isopentenyladenosine-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferáza

KMD	KISS ME DEADLY
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií
LOG	enzym fosfohydorrriboláza (LONELY GUY)
m/z	poměr hmotnosti a náboje
memT	methoxy deriváty meta-topolinu
meoT	methoxy deriváty ortho-topolinu
MEP	metyleritritolfosfátová dráha
MS	hmotnostní spektrometrie
mT	meta-topolin
MVA	mevalonátová dráha
NO	oxid dusnatý
oT	ortho-topolin
SAM	stonkový apikální meristém
TCA	kyselina trichloroctová
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin

9 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Chemická struktura 6-furfuryladeninu (kinetin)
- Obr. 2: Chemická struktura isoprenoidních cytokininů
- Obr. 3: Chemická struktura aromatických cytokininů
- Obr. 4: Model biosyntézy cytokininů
- Obr. 5: Schéma vzájemných přeměn mezi volnými bázemi cytokininů, nukleotidy a nukleosidy
- Obr. 6: Schéma přenosu signálu v signalizaci cytokininů
- Obr. 7: Schéma základních komponent hmotnostního spektrometru
- Obr. 8: Chemická struktura 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin (INCYDE)
- Obr. 9: Fenotyp rostlin ošetřených *tZ* a INCYDEem.
- Obr. 10: Vliv koncentrací *tZ* a INCYDEu na délku hlavního kořene
- Obr. 11: Vliv koncentrací *tZ* a INCYDEu na délku hypokotylu
- Obr. 12: Projev *tZ* a INCYDEu na fenotyp KMD
- Obr. 13: Grafické zobrazení délky hlavního kořene u linií *Arabidopsis* s pozměněnou cytokininovou signalizací.
- Obr. 14: Grafické zobrazení délky hypokotylu u linií *Arabidopsis* s pozměněnou cytokininovou signalizací
- Obr. 15: Průběh přípravy vzorku pro LC-MS analýzu
- Obr. 16: Průběh analýzy chromatogramem
- Obr. 17: Znázornění LC-MS analýzy pomocí mapy *m/z* v čase (bucketů)
- Obr. 18: Porovnání shodnosti vzorků
- Obr. 19: Výstup z PCA analýzy
- Obr. 20: Párový T-test
- Obr. 21: Vennův diagram