

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vývoj metody pro analýzu hydroxylovaných
derivátů cytokininů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavel Jaworek
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	26.4.2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 26.4.2012

.....

Pavel Jaworek

Děkuji doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za odborné vedení a předané znalosti. Můj dík patří také doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D. a prof. RNDr. Marku Šebelovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu katedry biochemie Univerzity Palackého v Olomouci za příjemné pracovní prostředí a v neposlední řadě také mé rodině a nejbližším přátelům, bez jejichž podpory by tato práce nemohl vzniknout.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Pavel Jaworek
Název práce	Vývoj metody pro analýzu hydroxylovaných derivátů cytokininů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Schopnost xantindehydrogenasy (XDH) hydroxylovat <i>in vitro</i> některé cytokininy (CK) na purinovém jádře v polohách 8 a 2 je známa již dlouho, doposud však nebyl ověřen jejich přirozený výskyt u rostlin.</p> <p>Tato diplomová práce shrnuje poznatky o strukturní rozmanitosti, metabolismu, přenosu signálu, fyziologických funkcích a metodách analýzy CK. Dále se zabývá popisem XDH, její funkcí v rostlinných buňkách a možnostmi stanovení její enzymové aktivity. V experimentální části je kladen důraz na vývoj metody kvalitativní a kvantitativní analýzy hydroxyderivátů CK z rostlinných tkání. Pro purifikaci je použita extrakce na pevné fázi, nejlepších výsledků bylo dosaženo se sorbentem Oasis™ MCX. Koncová analýza je postavena na ultra-účinné kapalinové chromatografii (UHPLC) s detekcí tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Podařilo se dosáhnout dostatečného rozlišení kritických párů tvořených <i>cis</i> a <i>trans</i> isomery 8-hydroxy a 2,8-dihydroxyzeatinu, limity detekce byly v rozmezí 20-360 fmol. Aktivita XDH byla monitorována u huseníčku rolního, ječmene setého a hrachu setého v několika vývojových stádiích (mladá, dospělá a senescentní rostliny) a rostlinných orgánech (kořen, stonek, list). Na základě získaných dat a dostupné literatury byly vybrány vhodné vzorky pro UHPLC-MS/MS analýzu hydroxyderivátů CK. Pouze v jediném vzorku (senescentní listy hrachu) byl detekován signál retenčním časem odpovídající 8-hydroxy-<i>trans</i>-zeatinu, jeho identitu však nemohla být potvrzena.</p>
Klíčová slova	Cytokininy, hydroxyderiváty, xantindehydrogenasa, SPE, UHPLC, MS/MS, nativní elektroforéza.
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's name and surname	Bc. Pavel Jaworek
Title	Development of method for analysis of hydroxylated cytokinin derivatives
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstrakt	<p>Xanthine dehydrogenase (XDH) is known for its ability to oxidize several cytokinins (CK) at positions 8 and 2 on purine skelet to their respective hydroxy derivates, however those substances have not been found in plants to date.</p> <p>Contemporary knowledge about CK structural diversity, metabolism, signaling, physiological functions and analytical methods for their determination are summarized in this master thesis. Description of XDH, its functions in plant cells and options for measurement of its activity is also included. The experimental part focuses on development of qualitative and quantitative analytical methods for hydroxy derivates of CK. Solid phase extraction is used for purification, the best results were obtained with Oasis™ MCX sorbent. The final step of CK analysis was accomplished by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) with tandem mass spectrometry (MS/MS). Baseline separation of <i>cis</i> and <i>trans</i> isomers of 8-hydroxy and 2,8-dihydroxyzeatin was achieved as well as detection limits within 20-360 fmol range. XDH activity was monitored in different stages of development (young, adult and senescent plants) and organs (roots, stems and leaves) of <i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Hordeum vulgare</i> and <i>Pisum sativum</i>. Based on the obtained data and available publications suitable samples for UHPLC-MS/MS analysis were selected. Only one relevant signal was detected in the sample from senescent leaves of pea. Its retention time corresponds with 8-hydroxy-<i>trans</i>-zeatin, but its identity could not be confirmed.</p>
Keywords	Cytokinins, hydroxy derivatives, xanthine dehydrogenase, SPE, UHPLC, MS/MS, native electrophoresis.
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Cíle práce.....	6
2. Úvod.....	7
3. Teoretická část.....	9
3.1. Cytokininy.....	9
3.1.1 Struktura cytokininů.....	9
3.1.2 Metabolismus cytokininů.....	13
3.1.3 Transport cytokininů a přenos signálu.....	18
3.1.4 Fyziologické funkce cytokininů.....	20
3.1.4.1 Regulace vývojových procesů.....	21
3.1.4.2 Reakce na vnější podmínky.....	23
3.2. Xantin:NAD+oxidoreduktasa.....	24
3.2.1 Struktura a průběh reakce xantindehydrogenasy.....	24
3.2.2 Xantindehydrogenasa u rostlin.....	27
3.2.3 Detekce enzymů na elektroforetických gelech.....	27
3.3. Metody analýzy cytokininů.....	27
3.3.1 Příprava vzorků.....	28
3.3.2 Metody koncové analýzy.....	29
4. Materiál a metody.....	31
5. Výsledky	31
6. Diskuse.....	31
7. Závěr.....	32
8. Seznam použité literatury.....	33
9. Seznam zkratk.....	46

1. Cíle práce

- Přehledně shrnout poznatky o problematice metabolismu cytokininů, výskytu a regulační úloze jejich jednotlivých forem a způsobech jejich analýzy. Dále se v literární rešerši zaměřit na charakterizaci enzymu xantin:NAD⁺oxidoreduktasy (EC 1.17.1.4) a možnosti stanovení jeho aktivity po nativní elektroforéze na polyakrylamidovém gelu.
- Vypracovat metodu purifikace a analýzy hydroxylovaných cytokininů pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s využitím standardů.
- U vybraných modelových rostlin určit, které vývojové stádium a část rostliny vykazuje nejvyšší aktivitu xantin:NAD⁺oxidoreduktasy.
- Ověřit přirozený výskyt hydroxylovaných forem cytokininů ve zvoleném rostlinném materiálu.

2. Úvod

Existenci rozpustných faktorů stimulujících dělení rostlinných buněk předpokládal na základě svého výzkumu již Gottlieb Haberlandt v roce 1913 (Haberlandt, 1913). Avšak teprve skupině Folke Skooga a Carllose Millera působící na University of Wisconsin se v průběhu 50. let minulého století podařilo izolovat první z těchto látek, kinetin. Zpočátku pracovali se složitými přírodními matricemi a nedařilo se jim jednoznačně identifikovat zdroj substance, u které pozorovali schopnost společně s auxiny stimulovat růst rostlinných explantátů ve tkáňové kultuře. Pokroku v této oblasti docílili v podstatě náhodou, když experimentovali se starou či autoklávanou DNA izolovanou ze sledích spermií (Miller et al., 1955a). S dostatečným zdrojem kinetinu, který takto získali, se Miller mohl pustit do práce na rozluštění jeho struktury, což se mu také záhy podařilo. Kombinací spektrálních měření a reakcí s chemickými činidly určil, že se jedná o adenin nesoucí furan jako substituent v poloze N⁶. Výsledek jeho práce potvrdily shodné chemické i biologické vlastnosti syntetického N⁶-furfuryladeninu (Miller et al., 1955b).

Brzy po kinetinu byly objeveny další sloučeniny, přirozeně se vyskytující i uměle připravené, u kterých byla pozorována obdobná biologická aktivita. Folke Skoog dal této nové skupině rostlinných hormonů v roce 1965 pojmenování cytokininy (CK), podle jejich schopnosti stimulovat buněčné dělení – *cytokinesi* (Skoog et al., 1965). Jako CK jsou dnes označovány také látky strukturně podobné, avšak bez biologické aktivity a *vice versa* (Frébort et al., 2011). Doposud bylo z různých zdrojů izolováno a popsáno více než 50 přirozených CK a mnohem větší množství jejich analogů se podařilo syntetizovat (Galuszka et al., 2008). Mezi ně patří také deriváty *trans/cis*-zeatinu a isopentenyladeninu hydroxylované na purinovém jádře v polohách 2 a 8, které byly připraveny reakcí s xantin:NAD⁺ oxidoreduktasu (Chen et al., 1975). Hlavním cílem této diplomové práce je pokusit se ověřit, zda se takto modifikované CK vyskytují přirozeně ve vybraných modelových rostlinách, kterými jsou huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), hrách setý (*Pisum sativum*) a ječmen setý (*Hordeum vulgare*).

Rostlinné hormony nejsou typické úzce specializovaným účinkem, jak je tomu u hormonů živočišných. Regulují širokou škálu procesů, často je navíc rozhodující aktuální poměr koncentrací několika hormonů najednou a cytokininy v tomto nejsou výjimkou. Stimulují proliferaci buněk apikálního meristému a tím umožňují růst nadzemní části rostliny, zároveň jsou to negativní regulátory růstu kořenů (Werner et al., 2001). Lokální

inhibice jejich biosyntézy v postranních pupenech v důsledku působení auxinů umožňuje jev zvaný apikální dominance (Tanaka et al., 2006). Významným způsobem mohou CK oddálit senescenci rostliny (Gan & Amasino, 1995) a ovlivňují také transport minerálních živin (Takei et al., 2001). Podílí se na regulaci vývoje vodivých pletiv kořene (Mähönen et al., 2006) a kambia nezbytného pro tvorbu druhotného dřeva a lýka (Nieminen et al., 2008). Prostřednictvím fytochromů jsou dokonce provázány s reakcemi rostlin na osvětlení (Sweere et al., 2001). Zastíněné rostliny vlivem změn v hladinách CK urychlují prodlužovací růst (Carabelli et al., 2007), popsán je také jejich vliv na denní cykly rostlin (Zheng et al., 2006). Avšak geny pro biosyntézu CK nejsou typické pouze pro rostliny, schopnost produkovat CK byla pozorována i u některých mikroorganismů. Typickými příklady jsou patogenní *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi et al., 1984) a *Rhodococcus fascians* (Klämbt et al., 1966), které po infekci rostliny využívají CK ke stimulaci růstu nádorů, či některé druhy *Rhizobií* fixujících plynný dusík (Phillips & Torrey, 1972).

Je zřejmé, že důkladné prostudování jednotlivých forem rostlinných hormonů, popsání jejich účinků a sestavení komplexního modelu regulace výraznou měrou přispěje k pochopení vývoje a života mnohobuněčných rostlin. Tyto znalosti mohou být aplikovány zejména v oblasti zemědělského výzkumu pro vyšlechtění rostlin se zvýšenou odolností vůči vnějším vlivům a vyššími výnosy. Během studia interakcí mezi CK a kinasami regulujícími buněčný cyklus byly také objeveny deriváty cytokininů substituované v polohách 2 a 9 na purinovém jádru, které inhibují přechod buněk z G2 do M fáze. Jedná se o olomoucín (Veselý et al., 1994) a zejména jeho mladší a účinnější analog roskovitin (Planchais et al., 1997), které mohou najít uplatnění v léčbě rakovinných onemocnění.

Tato diplomová práce vychází především z článku (Chen et al., 1975), který popisuje *in vitro* syntézu derivátů některých CK hydroxylovaných na purinu v polohách 2 a 8 pomocí xantin:NAD⁺oxidoreduktasy. Klade si za cíl ověřit, zda enzym katalyzuje hydroxylaci CK také *in vivo* v rostlinách, respektive zda se hydroxyderiváty cytokininů (OHCK) vyskytují přirozeně nebo jsou pouze umělé. Experimentální práce zahrnovala aplikaci metod používaných při studiu proteinů, jakými jsou elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Dále byla v průběhu práce vyvinuta metoda pro purifikaci OHCK z rostlinného materiálu využívající extrakce na pevné fázi a následnou analýzu ultra-účinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS).

3. Teoretická část

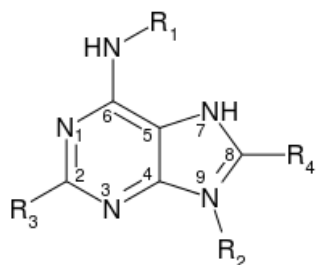
3.1. Cytokininy

3.1.1 Struktura cytokininů

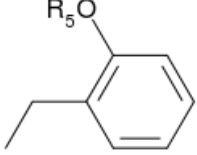
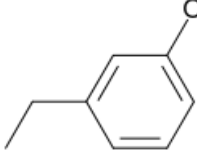
Základní rozdělení CK je možné provést s ohledem na jejich původ. Kromě přirozeně se vyskytujících forem známe také CK syntetické, mezi které patří zejména disubstituované deriváty močoviny. Původní práce, kdy se 1,3-difenyльмоčovinu podařilo identifikovat jako látku podporující buněčné dělení obsaženou v kokosovém mléce (Shantz & Steward, 1955), bohužel obsahovala chybu. Vědci pro zpracování velkého množství kokosových ořechů využili komerční vybavení, které bylo dříve používáno pro výrobu herbicidů založených na derivátech fenyльмоčoviny (Amasino, 2005). Naopak kinetin a CK odvozené od 6-(benzylamino)-purinu (BAP; viz. Tab.1) byly dlouhou dobu považovány za čistě syntetické látky. Přítomnost kinetinu byla však prokázána v DNA čerstvě vyextrahované z lidských i rostlinných buněk. Vlivem oxidativního poškození deoxyribosové části molekuly DNA může vzniknout furfural, který dále reaguje s adeninem. Obdobným způsobem se kinetin formuje při autoklávování DNA nebo jejím dlouhém skladování (Barciszewski et al., 1996). V tomto případě však neexistují relevantní data, která by ukazovala na regulační úlohu kinetinu utvořeného v rámci poškození DNA.

Doposud všechny známé CK přírodního původu obsahují jako základ molekuly adenin substituovaný v poloze N⁶ isoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem. První isoprenoidní CK byl částečně přečištěn z kukuřice (Miller, 1961) a později identifikován jako 6-(4-hydroxy-3-methylbut-*trans*-2-enyl)aminopurin. Triviálně je označován podle vědeckého jména kukuřice (*Zea mays*) jako *trans*-zeatin (*tZ*) (Letham & Miller, 1965), strukturní vzorce viz. Tab. 1. Jedná se o biologicky vysoce aktivní látku na rozdíl od jeho geometrického isomeru, *cis*-zeatinu (*cZ*) (Schmitz & Skoog, 1972). Z nezralých semen lupiny žluté (*Lupinus luteus*) byl také vyizolován dihydrozeatin (DHz), který v kalusovém biotestu vykazoval značnou aktivitu, ovšem v mnohem užším spektru koncentrací než *tZ* (Koshimizu et al., 1967). Pomineme-li prozatím různé deriváty a konjugáty se sacharidy, je posledním zástupcem isoprenoidních CK N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin (iP), od něž jsou zeatiny odvozeny hydroxylací postranního řetězce. Byl poprvé izolován z bakterie *Corynebacterium fascians*, která je rostlinným patogenem (Klambt et al., 1966), a jedná se o nejběžnější CK hojně se vyskytující napříč rostlinnou říší (Galuszka et al., 2008).

Tabulka 1. Strukturní vzorce, názvy a zkratky vybraných cytokininů



R ₁	R ₃	R ₄	Název	Zkratka
	H	H	Isopentenyladenin	iP
	H	OH	8-hydroxyisopentenyladenin	8-OHiP
	OH	OH	2,8-dihydroxyisopentenyladenin	2,8-OHiP
	H	H	<i>trans</i> -zeatin	<i>tZ</i>
	H	OH	8-hydroxy- <i>trans</i> -zeatin	8-OH <i>tZ</i>
	OH	OH	2,8-dihydroxy- <i>trans</i> -zeatin	2,8-OH <i>tZ</i>
	H	H	<i>cis</i> -zeatin	<i>cZ</i>
	H	OH	8-hydroxy- <i>cis</i> -zeatin	8-OH <i>cZ</i>
	OH	OH	2,8-dihydroxy- <i>cis</i> -zeatin	2,8-OH <i>cZ</i>
	H	H	Dihydrozeatin	DHZ
	H	H	Kinetin	K
	H	H	6-(benzylamino)-purin	BAP

	H	H	<i>ortho</i> -topolin	<i>oT</i>
	CH ₃ S	H	2-methylthio- <i>ortho</i> -topolin	2-MeSoT
	H	H	<i>meta</i> -topolin	<i>mT</i>
R₂: β-D-glukosa		9-glukosid		9G
R₂: β-D-ribosa		ribosid		R
R₂: β-D-ribosa-5'-monofosfát		ribosid-5'-monofosfát		RMP
R₅: β-D-glukosa		O-glukosid		OG

Pozn.: není-li v tabulce uvedeno jinak, v polohách R₁ – R₅ se nachází H

Základním aromatickým CK je BAP, který byl syntetizován na konci 50. let minulého století spolu s řadou svých derivátů modifikovaných na benzenovém jádře. Z těchto látek vykazovaly biologickou aktivitu o málo vyšší než samotný BAP některé jeho deriváty substituované v poloze *ortho*. Obecně pak byl pozorován trend poklesu aktivity přes látky nesoucí substituent v poloze *meta* až k *para* derivátům BAP, u kterých byla nejnižší (Okumura et al., 1959). Přirozený výskyt aromatických CK byl poprvé zaznamenán v roce 1975, kdy byl 6-(*o*-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosyl-purin (*o*TR; *ortho*-topolin ribosid; triviální název viz. následující text) detekován v dospělých listech topolu (*Populus x robusta*) (Horgan et al., 1975). V následujících letech rostl počet vědeckých prací oznamujících identifikaci aromatických CK v rostlinném materiálu a začalo být zřejmé, že tato skupina hormonů je v rostlinné říši poměrně rozšířená. Samotný BAP byl pak detekován v tumorech rajčete spolu se svým ribosidem a 9-glukosidem (Nandi et al., 1989). Pomocí imunodetekce byly dále v listech topolu (*Populus x canadensis*) nalezeny 6-(*o*-hydroxybenzylamino)-purin (*oT*; *ortho*-topolin) (Strnad et al., 1992) a o několik let později také vysoce aktivní 6-(*m*-hydroxybenzylamino)-purin, který byl triviálně pojmenován jako *meta*-topolin (*mT*) (Strnad et al., 1997), strukturní vzorce viz. Tab. 1. Dále byly objeveny *ortho*-methoxytopolin, *meta*-methoxytopolin a jejich ribosidy v listech huseníčku a topolu (*Populus x canadensis*), které jsou zajímavé především svým výrazným antisenescenčním účinkem (Tarkovská et al., 2003).

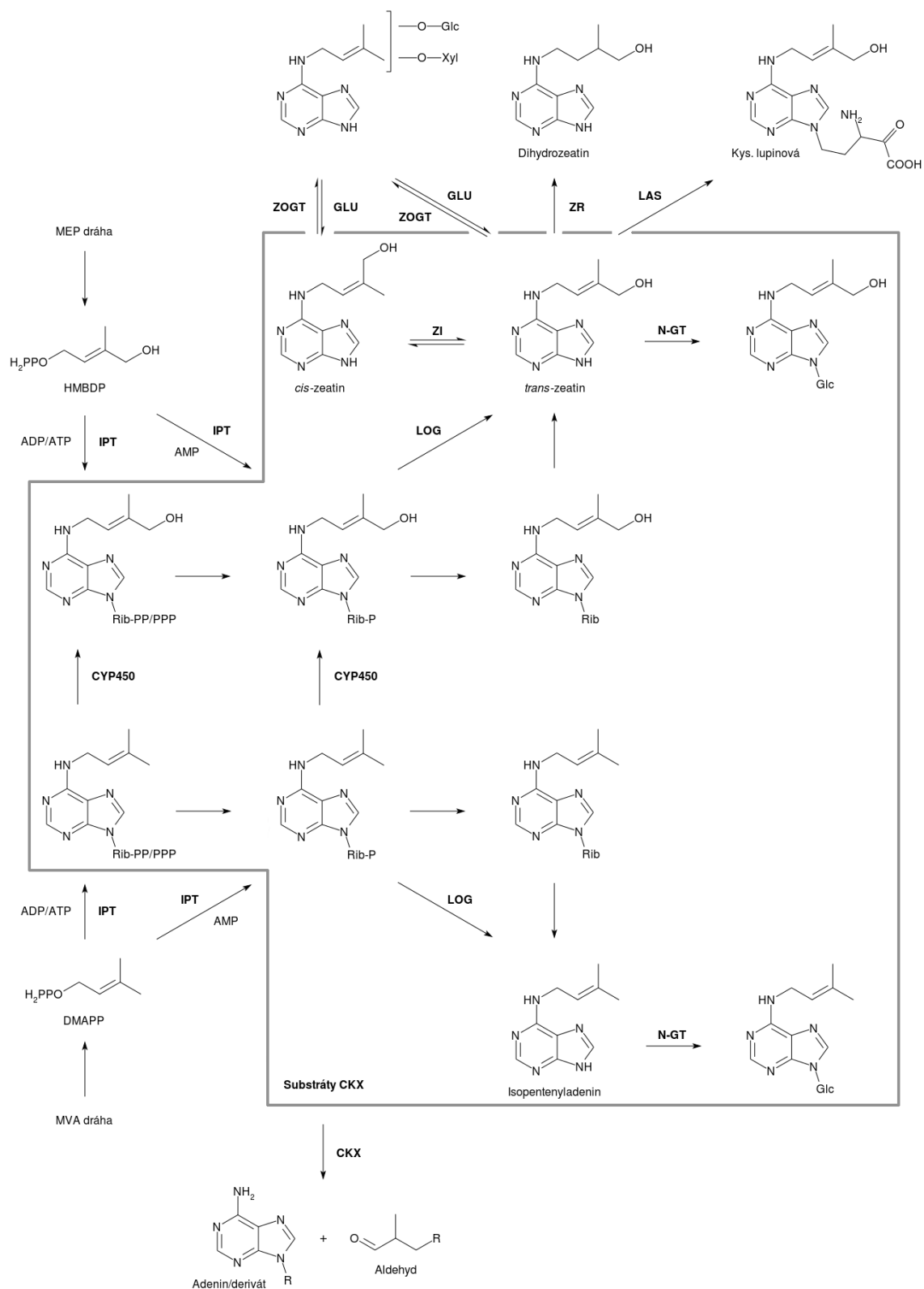
Rozmanitou skupinou derivátů isoprenoidních i aromatických CK jsou jejich konjugáty se sacharidy, z nichž některé již byly zmíněny v předchozím textu. Běžné jsou zejména ribosidy (R) a ribosid-5'-monofosfáty vázané v poloze N⁹, které souvisí s biosyntézou - alespoň co se týče isoprenoidních CK, jelikož biosyntéza aromatických CK doposud nebyla objasněna (Tarkowski, 2011). Známé jsou také N-glukosidy v polohách 3, 7 a 9 purinového jádra, přičemž N³-glukosidy jsou biologicky aktivní a tato glukosylace je reverzibilní (Letham et al., 1975). Naopak N⁷ a N⁹-glukosidy aktivitu postrádají (Letham et al., 1983) a glukosa v těchto polohách nemůže být ani odštěpena (Letham et al., 1975). Další zajímavou skupinou CK jsou deriváty glykosylované přes hydroxyskupinu postranního řetězce. Tyto O-glukosidy byly popsány u zeatinů a jejich ribosidů (Letham et al., 1976) i aromatického oT (Doležal et al., 2002). Byly identifikovány také zeatinové O-xylosidy (Shaw et al., 1987) a O-glukosidy odvozené od tZ-9-glukosidu a DHZ-9-glukosidu (Werner et al., 2003a). Za zmínku stojí také disacharidový konjugát 6-benzylamino-9-[O-glucopyranosyl-(1→3)-ribofuranosyl]-purin nalezený v listových explantátech petúnie (Auer & Cohen, 1993) nebo CK oligosacharid 14-O-{3-O-[β-D-galaktopyranosyl-(1→2)-α-D-galaktopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinofuranosyl]-4-O-(α-L-arabinofuranosyl)-β-D-galaktopyranosyl}-*trans*-zeatin ribosid izolovaný z kokosového mléka (Kobayashi et al., 1997).

Mezi známé deriváty CK patří také jejich konjugáty s alaninem, jakým je například kyselina lupinová (9-alanyl-zeatin) izolovaná ze semenáčků lupiny úzkolisté (*Lupinus angustifolius*) (MacLeod et al., 1975) nebo 9-alanyl-BAP ze semenáčků fazolu (*Phaseolus vulgaris*) (Letham et al., 1979). V lupině byly dále nalezeny ribosid-5'-monofosfáty O-acetyl-Z a DHZ (Letham & Zhang, 1989), tvorba O-acetyl-Z a ZR pak pravděpodobně souvisí s reakcí na chlad u cibulek narcisu (*Narcissus pseudonarcissus*) (Letham et al., 2003). Další zajímavou skupinou CK jsou 2-methylthio-deriváty (2-MeS), které byly poprvé identifikovány v tRNA izolované z klíčků pšenice, konkrétně se jednalo o 2-MeSiPR a 2-MeStZR (Burows et al., 1970). O několik let později byl v chloroplastové tRNA špenátu objeven 2-MeScZR, tRNA z celých listů navíc obsahovala i jeho *trans*-isomer (Vreman et al., 1978). 2-MeS derivát oT-9-glukosidu byl izolován z rostliny *Zantedeschia aethiopica*, česky nazývané kala, (Chaves das Neves & Pais, 1980) 2-MeSoT-O-glukosid se podařilo identifikovat v buněčné suspenzní kultuře merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*) (Doležal et al., 2002).

Závěrečná část této kapitoly o strukturní rozmanitosti CK je zaměřena na shrnutí dosavadních poznatků o jejich derivátech hydroxylovaných přímo na purinovém jádře. Pro značnou strukturní příbuznost CK s puriny v primárním metabolismu běžně oxidovanými xantin:NAD⁺oxidoreduktasou (XDH) není překvapením, že se případnými interakcemi CK s tímto enzymem zabývali vědci již krátce po objevení kinetinu. Jeho reakcí s XDH přečištěné z kravského mléka vzniká směs 8-hydroxy a 2,8-dihydroxykinetinu. Nechá-li se tato reakce probíhat až do ustálení absorpčního spektra reakční směsi, zůstává jako dominantní produkt dihydroxyderivát (Bergmann & Kwietny, 1958). Obdobným způsobem byly připraveny také deriváty iP a obou isomerů zeatinu (Chen et al., 1975). Během screeningu půdních bakterií bylo zjištěno, že *Serratia proteamaculans* je schopná růst na BAP jakožto výhradním zdroji uhlíku. Hlavním metabolitem izolovaným z této kultury byl 8-OHBAP a analogických výsledků bylo dosaženo také při kultivaci bakterií na iP a adeninu (Taylor et al., 2006). V rostlinné říši byl doposud popsán jediný výskyt CK hydroxylovaných na purinu. Konkrétně se jedná o 2-OHiP-9G, 2-OHcZ-9G a 2-OHiP-9-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glukosid izolované z plodů dřezovce kaspického (*Gleditsia caspica*), který patří do čeledi bobovitých rostlin (Hosny et al., 2009).

3.1.2 Metabolismus cytokininů

Obsah CK v pletivech rostlin se liší nejen mezidruhově, ale také v rámci jednotlivých rostlinných orgánů, různých vývojových stádií i v závislosti na vnějších podmínkách. Změny hladin CK byly zaznamenány v návaznosti na osvit rostliny (Benková et al., 1999), dostupnosti minerálních živin, zejména dusíku (Takei et al., 2001), nebo v reakci na osmotický stres (Vyroubalová et. al., 2009). Byla přitom popsána celá řada enzymů metabolizujících CK, které se na této citlivé regulaci podílejí. Zásadní význam má jejich biosyntéza probíhající zejména v pletivech s čilou proliferací, jakými jsou mladé listy či apikální meristémy kořene a nadzemní části rostliny. Negativní regulaci biosyntézy potom zprostředkovávají auxiny (Nordström et al., 2004). Obsah aktivních forem CK v pletivech jemně reguluje celá řada interkonverzí, jejich přeměna na zásobní formy, případně ireverzibilní degradace (Obr. 1). Následující text je věnován zejména metabolismu isoprenoidních CK, neboť je lépe prostudován. Některé reakce, především kongujace se sacharidy, mohou být pro aromatické CK analogické, doposud však nebyl identifikován ani prekurzor jejich postranního řetězce.



Obrázek 1. Schéma metabolických přeměn CK, dle předlohy (Frébort et al., 2011). IPT - adenylát isopentenytransferasa; CYP450 - cytochrom P450 monooxygenasa; LOG - cytokininfosforibohydrolasa „Lonely guy“; N-GT - cytokinin-N-glukosyltransferasa;

ZI - zeatinisomerasa; ZOGT - zeatin-O-glukosyltransferasa; GLU - β -glukosidasa; ZR - zeatinreduktasa; LAS - syntasa kyseliny lupinové

Donorem isoprenoidního postranního řetězce je u vyšších rostlin převážně dimethylallyl difosfát (DMAPP), který může být syntetizován methylerythritol fosfátovou drahou (MEP) v plastidech nebo mevalonátovou drahou (MVA) v cytosolu (Kasahara et al., 2004). Samotnou prenylací aminoskupiny adeninu zajišťují isopentenyltransferasy (IPT), přičemž jsou známy dvě skupiny lišící se substrátovou specifikou. Jedná se o adenylátový typ IPT (EC 2.5.1.27) využívající jako substrát zejména ADP a ATP, málo významným a v rostlinné buňce méně zastoupeným substrátem je také AMP (Kakimoto et al., 2001). Druhým typem je tRNA IPT (EC 2.5.1.8) umožňující prenylací adeninu obsaženého v tRNA (Golovko et al., 2002). Genom huseníčku obsahuje celkem devět IPT, přičemž pouze AtIPT2 a AtIPT9 modifikují tRNA, ostatní jsou adenylátového typu. Studium hladin jednotlivých forem CK v mutantních rostlinách (ztráta funkce jedné až čtyř IPT) se podařilo ukázat, že adenylátové IPT jsou zodpovědné za syntézu iP a tedy i tZ. Nejvýraznější vliv na hladiny těchto CK pak má mutant *atipt3*. Tvorba cZ je naproti tomu jednoznačně závislá na funkčnosti AtIPT2 a AtIPT9. Vzniká tedy jako součást tRNA a po její degradaci je cZ uvolněn ve formě nukleotid monofosfátu (Miyawaki et al., 2006).

Jediným široce uznávaným zdrojem cZ je tedy modifikace a degradace tRNA. Některé vědecké práce se sice zabývají existencí zeatin-*cis-trans*-isomerasy, enzym ovšem doposud nebyl řádně charakterizován (Frébort et al., 2011). Byla popsána pouze jeho částečná izolace z nezralých semen fazolu (*Phaseolus vulgaris*) (Bassil et al., 1993). Později byl publikován článek mapující konverzi radioaktivně značeného cZ na tZ v bramboru (*Solanum tuberosum*) s přibližně 10% účinností během čtyř, respektive sedmi dní (Suttle & Banowitz, 2000). Jindy však nebyla žádná přeměna zaregistrována (Kuroha et al., 2002). U rostlin převažující *de novo* biosyntéza tZ pak vychází z iP nukleotidu, který je hydroxylován za účasti cytochromu P450 monooxygenasy (Takei et al., 2004a). Některé IPT ovšem mohou využívat jako substrát také (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP), v tomto případě tZ vzniká přímo bez nutnosti další hydroxylace (Krall et al., 2002). Tato alternativní dráha je typická zejména pro *Agrobacterium tumefaciens*, rostlinný patogen, který během infekce do rostliny transferuje část DNA svého Ti-plasmidu (T-DNA). Její součástí je IPT (označovaná jako Tmr), která je následně exprimována v plastidech. Zde také vzniká HMBDP jako intermediát MEP dráhy (Sakakibara et al., 2005). Nedostačujícím způsobem je potom prostudována problematika tvorby DHZ.

Pravděpodobně je jeho zdrojem reakce katalyzovaná zeatinreduktasou (EC 1.3.1.69). Enzym byl pouze částečně přečištěn z embryí fazolu, jeho funkce vyžaduje NADPH (Martin et al., 1989) a nejspíš také kovový kofaktor, neboť hrachová zeatinreduktasa je inhibována chelatačním činidlem (Gaudinová et al., 2005).

CK ve formě nukleotidů vykazují pouze nízkou biologickou aktivitu. Defosforylaci mohou katalyzovat enzymy purinového metabolismu s širokou substrátovou specifitou, zejména 5'-nukleotidasa (EC 3.1.3.5), případně jiné hojně zastoupené alkalické (EC 3.1.3.1) či kyselé fosfatasy (EC 3.1.3.2). Adenosinnukleosidasa (EC 3.2.2.7) může dále ze vzniklého nukleosidu odštěpovat ribosu (Galuszka et al., 2008). U rýže (*Oryza sativa*) byla však objevena také fosforibohydrolasa specifická pro CK nukleotidy, kterou kóduje gen nazvaný „Lonely guy“ (LOG). Jeho exprese byla lokalizována zejména ve špičce vrcholového meristému stonku, předpokládá se proto významný podíl LOG na citlivé regulaci aktivace CK v tomto intenzivně se vyvíjejícím pletivu (Kurukawa et al., 2007). Byly ovšem prokázány i reakce vedoucí od CK bází k nukleosidům, respektive nukleotidům. Příkladem je metabolizace exogenně aplikovaného BAP adeninfosforibosyltransferasou (EC 2.4.2.7) na příslušný monofosfát v rostlinách huseníčku (Moffatt et al., 1991). Vysoká afinita k isoprenoidním CK pak byla zjištěna u adenosinkinasy (EC 2.7.1.20) pocházející z BY-2 (brighth yellow-2) buněk tabáku (Kwade et al., 2005). Z výjimkou LOG je však fyziologický význam všech těchto enzymů z hlediska jejich podílu na metabolismu CK nejednoznačný. Jsou totiž exprimovány konstitutivně, což nenechává prostor pro jemnou regulaci. Jejich afinita k CK, které se v rostlinách vyskytují až v šestkrát nižších koncentracích oproti ostatním adeninovým derivátům, navíc nemusí být dostatečná pro efektivní metabolické přeměny (Galuszka et al., 2008). Relativně nedávný objev LOG může naznačovat existenci dalších enzymů specifických k CK, které doposud nebyly popsány (Frébort et al., 2011).

Z hlediska regulace biologické aktivity CK má zásadní význam jejich konjugace se sacharidy. Na základě bakteriálních biotestů je možné konstatovat, že v porovnání s CK bázemi je aktivita ribosidů poměrně nízká. O-glukosidy, ale také N⁷ a N⁹-glukosidy, jsou pak prakticky zcela inaktivní (Spíchal et al., 2004). Genom huseníčku obsahuje dva geny pro N-glukosyltransferasu (EC 2.4.1.118) katalyzující přenos glukosy z uridin-5'-difosfoglukosy na endocyklické atomy dusíku v polohách 7 a 9, přičemž substrátem mohou být isoprenoidní i aromatické CK (Hou et al., 2004). Reakce je považována za ireverzibilní inaktivaci CK, v ředkvi (*Raphanus sativus*) se po exogenní aplikaci CK hromadí právě tyto deriváty (McGaw et al., 1984). Některé rekombinantní (exprese

v tabáku) isoenzymy cytokinindehydrogenasy huseníčku jsou ovšem schopné štěpit N⁹-glukosidy v mírně kyselém prostředí dokonce efektivněji než ostatní CK (Galuszka et al., 2007). Známé jsou i N³-glukosidy (Letham et al., 1975), jejich syntéza ale doposud nebyla objasněna. Konjugace se sacharidy může probíhat také přes kyslíkový atom na postranním řetězci některých CK. V kukuřici (*Zea mays*) byl nalezen enzym specifický k cZ, *cis*-zeatin-O-β-D-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.215) (Martin et al., 2001). *trans*-zeatin-O-β-D-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.203) huseníčku naopak mezi isomery nerozlišuje a glukosyluje tZ i cZ (Hou et al., 2004). Dále byla z fazolu izolována zeatin-O-xylosyltransferasa (EC 2.4.2.40) využívající jako substrát UDP-xylosu (Turner et al., 1987). Jelikož biologicky inaktivní O-glykosidy nejsou substrátem CKX (McGaw & Horgan, 1983) a sacharid z nich může být snadno odštěpen působením β-glukosidasy (EC 3.2.1.21), jsou považovány za zásobní formu. Tento enzym je aktivní i vůči N³-glukosidům (Brzobohatý et al., 1993). Kromě sacharidů mohou být CK konjugovány i s dalšími molekulami. Příkladem je alanin, který je přenášen zeatin-9-amino- karboxyethyltransferasou (EC 2.5.1.50) z O-acetyl-L-serinu za vzniku kyseliny lupinové (Entsch et al., 1983).

Zbývá shrnout poznatky o ireverzibilní degradaci volných CK bazí a ribosidů. Oxidativní štěpení CK bylo poprvé popsáno v hrubém extraktu z tabáku (Pačes et al., 1971), zodpovědný enzym však byl řadu let mylně nazýván cytokininoxidasa (Whitty & Hall; 1974). Později bylo prokázáno, že enzym obsahuje flavinový kofaktor a před kyslíkem preferuje jiné elektronové akceptory, bylo tedy navrženo jeho překlasifikování na cytokinindehydrogenasu (CKX; EC 1.5.99.12) (Galuszka et al., 2001). Přirozeným elektronovým akceptorem kukuřičné CKX je 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on a také produkty jeho oxidativní degradace (Frébortová et al., 2010). Výsledkem enzymové reakce je potom adenin, případně jeho N⁹-derivát, a aldehyd strukturou vycházející z postranního řetězce. V případě degradace iP se například jedná o 3-methyl-2-butenal (Brownlee et al., 1975). Nejrychleji probíhá degradace iP, zeatinu a jejich ribosidů, štěpeny jsou ale také aromatické CK, i když jsou výrazně horšími substráty (Frébortová et al., 2004). Naopak DHZ není CKX degradován vůbec (Galuszka et al., 2007). Jelikož bývá hojně obsažen v semenech některých rostlin (Koshimizu et al., 1967), (Martin et al., 1989), je považován za zásobní formu CK důležitou před nastartováním jejich *de novo* biosyntézy během klíčení (Frébort et al., 2011).

3.1.3 Transport cytokininů a přenos signálu

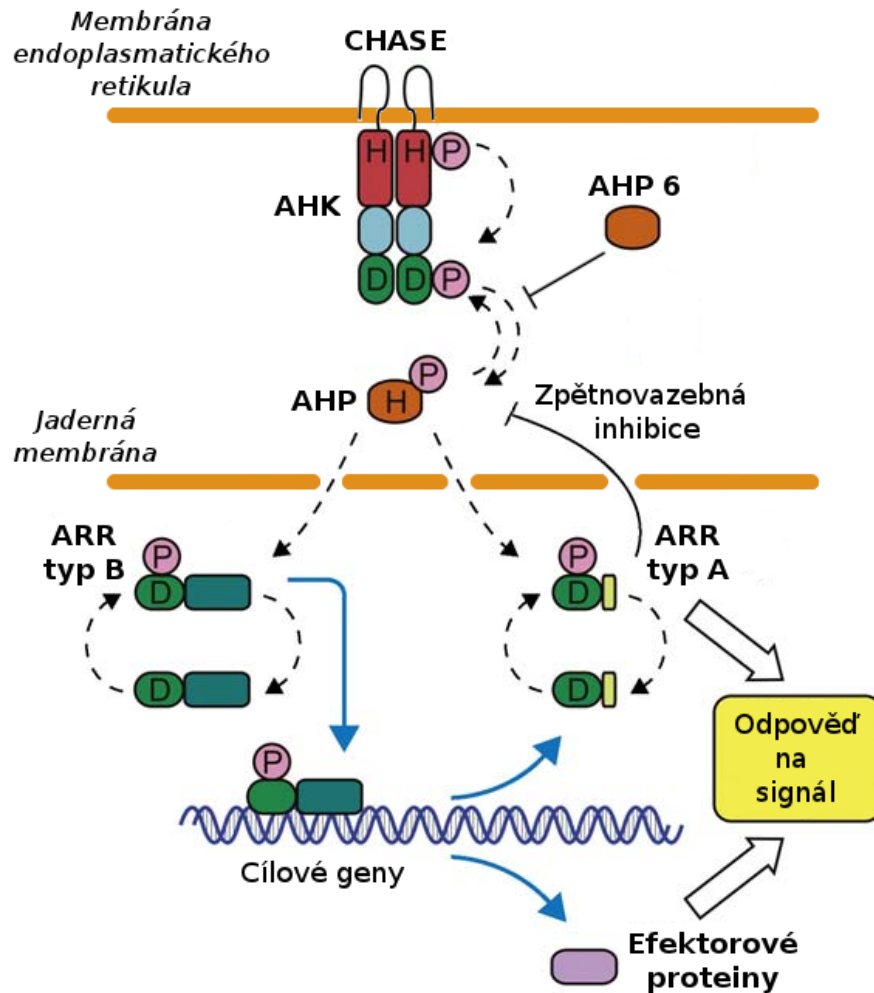
Signální molekuly typicky účinkují ve velice nízkých koncentracích, což klade nároky na citlivý způsob jejich percepce. Nezbytnou podmínkou koordinace vývojových procesů rostlin je také efektivní transport fytohormonů na místo jejich účinku. Ve vědecké komunitě dlouhou dobu převládal názor, že CK jsou syntetizovány převážně v apikálním meristému kořene, odkud jsou vodivými pletivy rozváděny do zbytku rostliny (Galuszka et al., 2008). S rozvojem experimentálních metod se ovšem ukázalo, že IPT geny jsou exprimovány i v ostatních částech rostliny, což ukazuje také na parakrinní způsob CK signalizace (Miyawaki et al., 2004). Experiment, během kterého byla na kořen mutantního huseníčku (*atipt1;3;5;7*) naroubována nadzemní část běžné rostliny (WT; wild-type) a *vice versa*, prokázal nezávislost normálního růstu meristémů na dálkové CK signalizaci (Matsumoto-Kitano et al., 2008). Nicméně v xylémové i floémové míze byly naměřeny relativně vysoké koncentrace CK, zejména jejich ribosidů (Kamboj et al., 1998). V xylému převažuje *tZR*, u kukuřice pěstované při nedostatku dusíku přitom bylo po jeho dodání pozorováno navýšení koncentrace *tZR* a také urychlení jeho transportu do listů (Takei et al., 2001a). Naopak ve floémové míze jsou nejvýrazněji zastoupeny CK odvozené od *iP* (Corbesier et al., 2003). Hypotézu, že *tZR* slouží pro akropetální a CK *iP* typu pro bazipetální signalizaci, podporují také výše zmíněné experimenty s roubováním huseníčku. V mutantním kořeni se po čase obnovily koncentrace CK *iP* typu na normální úroveň, hladiny *tZ* typu však byly obnoveny pouze částečně. Analogické výsledky byly zjištěny u rostliny s mutantní nadzemní částí (Matsumoto-Kitano et al., 2008).

Přes membránu mohou být CK báze kotransportovány s H^+ purinpermeasou (PUP), jak bylo demonstrováno na enzymu z huseníčku. *AtPUP1* byla lokalizována zejména v epithemu hydrotod, což naznačuje možnou funkci při prevenci ztrát CK během gutace. Studie se zaměřila také na *AtPUP2*, která byla detekována převážně ve floémových buňkách listů a může se tak podílet na transportu CK na delší vzdálenosti (Bürkle et al., 2003). Jelikož je K_m těchto enzymů na úrovni buněčné koncentrace purinu, která dalece přesahuje koncentraci CK, tento transport nebude příliš efektivní (Frébert et al., 2011). V rýži (Hirose et al., 2005) a později také v huseníčku (Hirose et al., 2008) byly ovšem nalezeny také specifické transportéry CK ribosidů (*ENT*; equilibrative nucleoside transporters), které pracují na základě koncentračního gradientu. Transportér z rýže *OsENT2* přitom výrazně preferoval *iPR* před *tZR*, což ukazuje na možnou selektivitu *ENT*.

Přenos CK signálu uvnitř buňky je nejlépe prostudován u huseníčku, následující text se proto věnuje poznatkům vztahujícím se právě k této rostlině. Myšlenka, že do signalizace

je zapojen dvousložkový systémem (TCS; two-component system), vznikla po experimentech s huseníčkem nadexprimujícím histidinkinasy CKI1 (Kakimoto, 1996). Obdobný systém je přitom běžný zejména u mikroorganismů, v rostlinách byl poprvé popsán v souvislosti s ethylenovým receptorem (Chang et al., 1993). První složkou TCS zodpovědnou za detekci CK je histidinkinasa (AHK; *Arabidopsis* histidine kinase), přičemž byly objeveny tři isoenzymy: AHK2, AHK3 a AHK4 (Yamada et al., 2001). Nezávisle byla publikována práce ukazující CK rezistenci rostlin s mutací v genu pro histidinkinasy CRE1, tato je ovšem s AHK4 totožná (Inoue et al., 2001). Dále byla zjištěna exprese jednotlivých isoenzymů v různých rostlinných orgánech. Zatímco AHK2 a AHK3 jsou exprimovány prakticky napříč celou rostlinou, AHK4 se zdá být přísně specifická pro kořeny (Ueguchi et al., 2001). Rozdíly jsou také v citlivosti AHK k různým CK. AHK3 i AHK4 vykazují vysokou afinitu k iP, tZ a thidiazuronu, AHK3 je však podstatně citlivější k aromatickým CK a navíc rozpoznává i cZ a DHZ (Spíchal et al., 2004). Co se týče subcelulární lokalizace, donedávna se předpokládalo ukotvení AHK v plasmatické membráně, ve skutečnosti jsou ale umístěny převážně v membráně endoplasmatického retikula (Wulfetange et al., 2011).

Samotnou percepci CK umožňuje transmembránová CHASE (cycluses/histidine kinases-associated sensing extracellular) doména (Mougel & Zhulin, 2001), následuje dimerizace AHK a začíná histidin-aspartát fosforylační kaskáda (Obr. 2). Nejprve dochází k autofosforylaci receptoru na His residuu, odkud je fosfát přenesen na Asp v blízkosti C-konce proteinu (Hutchison & Kieber; 2002). Mezičlánkem signalizační kaskády je histidin obsahující fosfotransferový protein (AHP) (Suzuki et al., 2000), přičemž AHP1 až AHP3 a AHP5 jsou schopny přenášet fosfát dále, což neplatí pro AHP4 (Hutchison et al., 2006). AHP6 potom vůbec neobsahuje potřebný His a patrně slouží jako inhibitor této části signální dráhy (Mähönen et al., 2006). Koncovými příjemci fosfátové skupiny mohou být některý z celé řady jaderných regulátorů odpovědi (ARR; *Arabidopsis* response regulator), které je možné rozčlenit na dvě skupiny (Hwang & Sheen 2001). Patří sem ARR typu B, transkripční faktory zodpovědné za regulaci většiny, ne-li všech, procesů závislých na CK signalizaci (Heyl et al., 2008). Také transkripce ARR typu A je jimi indukována, zvýšená exprese je detekovatelná dokonce již po 10 minutách od aplikace exogenních CK na pokusnou rostlinu (D'Agostino et al., 2000). Zřejmě nejvýznamnější úlohou ARR typu A je zpětnovazebná negativní regulace CK signalizace (To et al., 2004), která z největší pravděpodobností probíhá na úrovni přenosu fosfátu z AHP (Dortay et al., 2006).



Obrázek 2. Schéma His-Asp fosforylační kaskády – přenos CK signálu; převzato a upraveno z (Werner & Schumling, 2009). CHASE – doména rozpoznávající CK; AHK – histidinkinasa; AHP – histidin obsahující fosfotransferový protein; ARR – regulátor odpovědi.

3.1.4 Fyziologické funkce cytokininů

Vývojové procesy rostlin jsou obvykle řízeny více skupinami fytohormonů najednou. Přestože přesný mechanismus regulace není v mnoha případech znám, již krátce po objevení CK byla zjevná jejich součinnost s auxiny (Skoog & Miller, 1957) a později se začala rozkrývat také souvislost CK s účinky ethylenu (Cary et al., 1995). Hlavním nástrojem studia vlivu CK na růst rostlin byla dlouhou dobu pouze jejich exogenní aplikace a pozorování výsledných účinků, zlom nastal s rozvojem metod molekulární biologie

a genetiky (Galuszka et al., 2008). Množství doposud publikovaných prací z této oblasti výzkumu svým rozsahem dalece přesahuje rámec kapitoly, budou zde proto shrnuty pouze nejvýznamnější poznatky.

3.1.4.1 Regulace vývojových procesů

Mezi nejdůležitější geny exprimované během CK odezvy patří CycD3, skupina cyklinů indukujících přechod rostlinných buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu (Riou-Khamlichi et al., 1999). Právě jejich prostřednictvím CK regulují množství dělicích se buněk ve vrcholovém meristému stonku (SAM; shoot apical meristem) a ve vyvíjejících se postranních orgánech (Dewitte et al., 2007). Zásadní úlohu při udržení funkce SAM přitom má KNOTTED1-like homeobox (KNOX), transkripční faktor, který aktivuje biosyntézu CK a zároveň negativně reguluje biosyntézu giberilinů zodpovědných za prodlužovací růst buněk (Jasinski et al., 2005). Prostřednictvím CK potom KNOX ovlivňuje také morfogenezi listů rajčete (Shani et al., 2010). Negativní zpětnovazebná regulace CK signalizace zprostředkovaná ARR typu A je navíc v případě SAM potlačena přímou represí transkripce příslušných genů působením specifického faktoru WUSCHEL (Leibfried et al., 2005). Se SAM souvisí také jev zvaný apikální dominance, kdy intaktní vrchol rostliny roste přednostně a větvení stonku je potlačeno. Rozhodující vliv zde mají auxiny produkované právě v rostlinném vrcholku, odkud jsou následně transportovány bazipetálně až do kořenů. Po dekapitaci vrcholku je odstraněn zdroj auxinů a postranní pupeny jsou uvolněny z inhibice, totéž bylo pozorováno po aplikaci exogenních CK (Cline, 1991). Molekulární mechanismus byl studován na hrachu, auxiny zde negativně regulují expresi IPT v postranních pupenech a tím také biosyntézu CK. Dekapitace tak vede k nárůstu koncentrace CK ve stonku do chvíle, než roli SAM nepřevzme některý z doposud dormantních pupenů (Tanaka et al., 2006).

Přímý vliv CK byl pozorován také v souvislosti s aktivitou kambia, které umožňuje sekundární tloušťnutí stonků. Transgenní topol (*Populus tremula* x *tremuloides*) nadexprimující geny pro CKX pod kontrolou promotoru CK receptoru z břízy měl v důsledku snížené hladiny aktivních CK výrazně tenčí stonek oproti WT. Ovlivněna byla i anatomie buněk tvořících cévní svazky (Nieminen et al., 2008). Ve shodě s těmito výsledky je úplná ztráta kambia a snížená tloušťka stonků i kořenů u huseníčku s vyřazenými geny pro IPT. Exogenní aplikace CK však aktivitu kambia u těchto rostlin stimulovala úměrně jejich dávce (Matsumoto-Kitano et al., 2008). Diferenciace cévních svazků kořene přitom začíná již v průběhu embryogeneze, floém a prokambium jsou zde

zakládány asymetrickým dělením buněk. Pro tento proces nezbytný gen WOODEN LEG (Mähönen et al., 2000) se ukázal být totožný s CK receptorem AHK4 (Inoue et al., 2001).

S výjimkou výše popsaného vývoje cévních svazků jsou účinky CK v kořenovém systému oproti jejich pozitivnímu působení na nadzemní část zcela opačné, jak dokladuje řada experimentů. Nadexprese CKX u huseníčku vedla k výraznému snížení aktivity SAM, rostliny měly zakrslou nadzemní část včetně listů. CK deficientní fenotyp má naopak zvýšený počet buněk apikálního meristému kořene (RAM; root apical meristem) vedoucí k delšímu primárnímu kořeni oproti WT, zároveň dochází k jeho intenzivnějšímu větvení (Werner et al., 2003b). Stejně znaky byly pozorovány také u rostlin s vyřazenými IPT geny (Miyawaki et al., 2006) či geny pro AHK (Riefler et al., 2006). Růst postranních kořenů je umožněn polárním transportem auxinů vedoucím k asymetrickému buněčnému dělení na rozhraní xylému a pericyklu. CK se tomto podílí negativní regulují exprese auxinových transportérů (Laplaze et al., 2007). Tento způsob regulace, kdy auxiny indukují *de novo* organogenezi a CK přímo ovlivňují jejich distribuci se zdá být jedním z obecných mechanismů interakce obou skupin fytohormonů (Pernisová et al., 2009). Další příklad protichůdných účinků CK a auxinů je možné nalézt již během rané embryogeneze, kdy dochází k dělení první buňky zakládající linie kmenových buněk kořene. Zatímco v apikální dceřiné buňce probíhá CK signalizace bez narušení, auxiny v bazální buňce aktivují transkripci ARR typu A a dochází k inhibici CK signálu (Müller & Sheen, 2008).

Významná úloha je CK připisována také v souvislosti oddálením senescence rostlin. Exprese IPT kontrolovaná senescencí regulovaným promotorem v tabáku vedla k významnému prodloužení délky života rostliny při zachování fotosyntetické aktivity (Gan & Amasino, 1995). Dále je studován dopad změněných hladin CK na tvorbu květů, rýže se sníženou expresí CKX jich měla více, což ovlivnilo i výnos (Ashikari et al., 2005). Dle předpokladu byl jejich počet naopak nižší u huseníčku nadexprimujícího CKX, překvapením ovšem byla tvorba větších semen (Werner et al., 2003b). Na závěr stojí za zmínku také vliv CK na parametry zdroje a místa spotřeby (sink) některých metabolitů. CK deficientní rostliny tabáku měly nižší obsah chlorofylu a docházelo u nich ke změnám na úrovni některých organel, ale obsah rozpustných sacharidů ve zdrojových listech nebyl významně ovlivněn. Naopak sink nadzemních částí obsahoval mnohem méně rozpustných sacharidů než WT, nižší byla i aktivita vakuolární invertasy (štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu) a obsah ATP. Tyto změny ovšem nebyly příliš výrazné u sinku kořenů (Werner et al., 2008).

3.1.4.2 Reakce na vnější podmínky

Kvalita a kvantita světla patří spolu s dostupností vody a minerálních živin k nejdůležitějším faktorům ovlivňujícím život rostlin. Ukazuje se, že mezi světlem a CK signalizací existuje na molekulární úrovni poměrně úzký vztah, ústřední je přitom interakce mezi fosforylovaným ARR4 (typ A) a fytochromem B (phyB) (Mira-Rodado et al., 2007). Jedná se o hlavní fotoreceptor pro červené světlo, který ovlivňuje řadu procesů jako je elongace buněk, vyhýbání se stínu či regulace nasazování květů v závislosti na délce dne. phyB může existovat ve dvou vzájemně převeditelných formách, přičemž neaktivní forma absorbuje červené světlo (R; red), zatímco aktivní forma vzdálené červené světlo (FR; far-red). Přechod mezi nimi je dán právě absorpcí příslušného záření (Fankhauser, 2001). Expresní profily ARR4 s phyB se do značné míry překrývají, ARR4 navíc stabilizuje aktivní formu fotoreceptoru (Sweere et al., 2001).

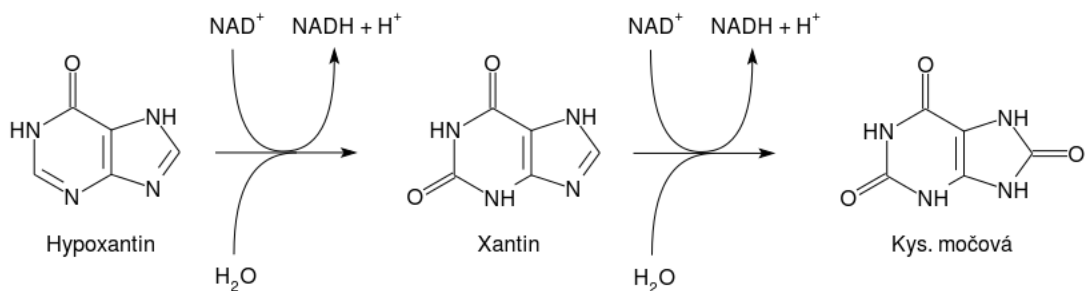
Rostliny v husté vegetaci mohou být často zastíněny svými konkurenty v boji o světlo, což se projeví změnou spektra záření, které na ně dopadá. Konkrétně klesne poměr R/FR v důsledku absorpce červeného světla fotosystémy konkurenčních rostlin. Tato změna je díky phyB zaregistrována a dochází k auxiny indukovanému zvýšení exprese CKX. Výsledkem je pokles hladin CK, zastavení růstu listů a naopak urychlení prodlužovacího růstu ve snaze přerůst konkurenci (Carabelli et al., 2007). Svou nezastupitelnou úlohu mají phyB a ARR4 společně s ARR3 v udržení cirkadiálního rytmu a jeho synchronizaci s délkou osvitů. V tomto případě se ovšem jedná o proces na CK nezávislý. Pro správnou funkci cirkadiálního oscilátoru stačí pouze bazální exprese obou ARR a její zvýšení v důsledku exogenní aplikace CK nevedlo k žádným defektům (Salomé et al., 2006). Nedávno se také ukázalo, že světlo funguje jako morfogenický signál pro iniciaci listových primordií. Osvit rostliny prostřednictvím CK uvolní z inhibice propagaci buněk SAM, čímž je zajištěn jejich dostatek pro založení nových listů. Světlo dále ovlivní subcelulární lokalizaci auxinových transportérů, změna gradientu auxinů následně vede k usměrnění růstu vyvolaného CK vstříc tvorbě nových listových primordií (Yoshida et al., 2011).

Vliv CK je popsán i v souvislosti s rostlinným stresem různého původu. Rostliny tabáku exprimující IPT pod stresem indukovaným promotorem měly díky oddálení senescence výrazně zvýšenou odolnost proti suchu. Mutantní rostliny si během dvoutýdenního sucha dokázaly zachovat relativně vysoký obsah vody a fotosyntetickou aktivitu, byť sníženou. Obnovené zalévání u nich navíc vyvolalo energický růst, zatímco WT rostliny během experimentu uvadly (Rivero et al., 2007). Limitujícím faktorem růstu je také dostatek dusíku v půdě. U kukuřice pěstované s jeho omezeným přísunem byla po dodání nitrátu

pozorována akumulace iP nukleotidů a různých forem tZ v kořenech, následně vzrostla hladina tZR v xylémové míze a nakonec tZ v listech. Zvýšené hladiny CK se udržely nejméně po dobu jednoho dne (Takei et al., 2001). Později byla prokázána rychlá indukce genu AtIPT3 v odezvě na dodání nitrátu rostlinám dlouhodobě stresovaným jeho nedostatkem (Takei et al., 2004b). CK signalizace dále participuje na regulaci příjmu fosforu, síry nebo železa a podílí se i na interakci s některými mikroorganismy, ať už se jedná o patogeny či symbiotické bakterie (Werner & Schmölling, 2009).

3.2. Xantin:NAD⁺oxidoreduktasa

Enzymy schopné katalyzovat oxidaci široké škály purinů, ale také pyrimidinů a pterinů byly izolovány z celé řady organismů od bakterií po člověka. Jedná se zejména o xantin:NAD⁺oxidoreduktasu (XDH, xantindehydrogenasa; EC 1.17.1.4) katalyzující primárně oxidaci hypoxantinu na xantin a dále až na kyselinu močovou (Obr. 3), významně se tedy podílí na degradaci nukleových kyselin. U savců pak může dojít ke konverzi enzymu na xantin:O₂oxidoreduktasu (XO, xantinoxidasa; EC 1.17.3.2), která využívá jako akceptor elektronů kyslík za tvorby superoxidu a peroxidu vodíku. Této reakce je schopná i XDH, byť jako finální akceptor výrazně preferuje NAD⁺ (Hille & Nishino, 1995). Přeměna XDH na XO byla pozorována během skladování XDH při -20 °C (Stripe & Corte, 1969), reverzibilně k ní dochází oxidací thiolových skupin cysteinu, ireverzibilně pak částečnou proteolýzou enzymu na specifických místech (Hille & Nishino, 1995).



Obrázek 3. Reakční schéma XDH.

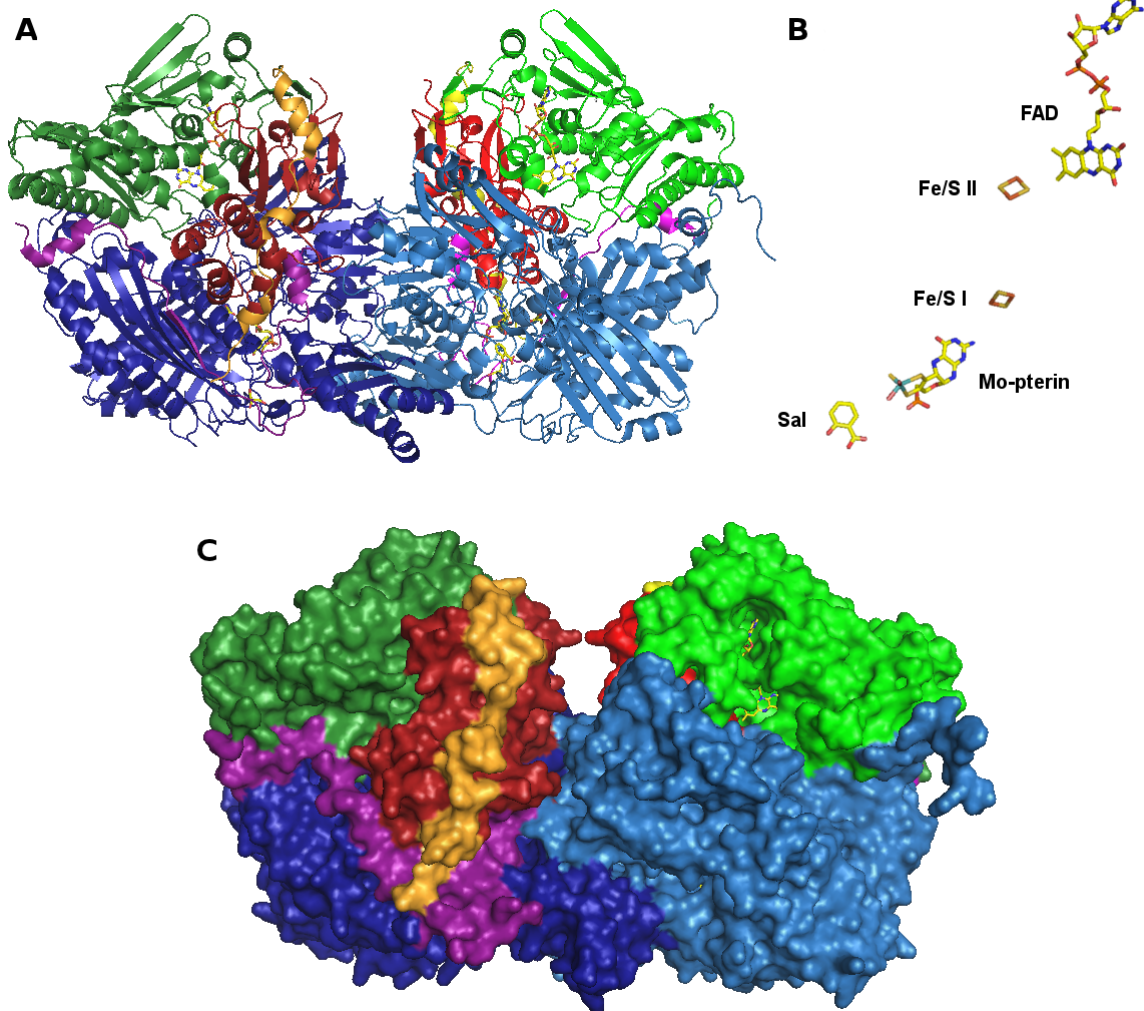
3.2.1 Struktura a průběh reakce xantindehydrogenasy

Primární struktura XDH je napříč různými organismy vysoce konzervovaná. Jedná se o homodimerní enzym, jehož molekulová hmotnost je přibližně 290 kDa, přičemž každý z monomerů obsahuje asi 1330 aminokyselin a během katalýzy pracuje nezávisle

(Rodríguez-Trelles et al., 2001). Z důvodů její snadné dostupnosti je nejlépe prostudována XDH izolovaná z kravského mléka, jejíž strukturu se jako první podařilo rozluštit rentgenovou krystalografií. Enzym byl krystalován jako komplex s kyselinou salicylovou, která je jeho inhibitorem. Surová data byla získána analýzou zmraženého krystalu s rozlišením 2,1 Å a struktura XDH byla vyřešena díky kombinaci metody molekulové náhrady a anomálního rozptylu rentgenového záření na atomech železa obsažených v 2Fe-2S klastrech (Enroth et al., 2000).

Rozměry dimeru jsou 155 x 90 x 70 Å a každá z podjednotek se skládá ze tří domén vzájemně propojených dvěma smyčkami. N-koncová doména (červená na Obr. 4) složená z aminokyselin 1-165 obsahuje dva 2Fe-2S klastry koordinované postranními řetězci cysteinů. Přes oba klastry jsou postupně přenášeny elektrony z katalytického místa obsahujícího molybdopterin na FAD nacházející se v doméně tvořené aminokyselinami 226-531 (zelená na Obr. 4). FAD je přitom kovalentně vázán uvnitř hluboké dutiny, která umožňuje volný přístup molekul rozpouštědla. Do této dutiny také může vstoupit nikotinamidový kruh molekuly NAD⁺, který je finálním akceptorem elektronů. Největší je C-koncová katalytická doména enzymu (modrá na Obr. 4) složená z aminokyselin 590-1332 (Enroth et al., 2000). Ta obsahuje pro reakci ústřední atom molybdenu, jehož ligandy jsou dvě thioenové síry molybdopterinu (-S-), sulfo (=S), oxo (=O) a hydroxo (-OH) skupiny. Samotná reakce je zahájena přenosem protonu z Mo-OH na postranní řetězec blízkého glutamátu, který je stabilizován tvorbou vodíkové vazby směrem k dusíkovému atomu substrátu. Následuje nukleofilní atak Mo-O⁻ na uhlíkový atom substrátu, který má být hydroxylován, a přenos nadbytečného protonu na sulfoskupinu Mo=S. Dochází tak postupně k redukci molybdenu z oxidačního stupně +6 na +4. Do reakce následně vstupuje molekula vody, která umožní rozpad meziprojektu a obnovení Mo-OH za současného transferu elektronů z molybdenu na FAD (Okamoto et al., 2004).

XDH je schopná katalyzovat oxidativní hydroxylaci adeninu (Wyngaarden & Dunn, 1957), kinetinu (Bergmann & Kwietny, 1958) a také iP, tZ a cZ (Chen et al., 1975), přičemž ve všech případech vznikají jako meziprojektu příslušné 8-hydroxyderiváty a nakonec i 2,8-hydroxyderiváty. Rychlost enzymové reakce pro trojici iP, tZ a cZ a jejich 8-hydroxyderiváty však dosahuje ve srovnání s xantinem pouze 31,5-42 %. K_m pro oxidaci xantinu je 1,16 μM, pro uvedené CK se pohybuje v rozmezí 1,81-2,21 μM, je tedy o 56-90 % vyšší (Chen et al., 1975).



Obrázek 4. (A) Struktura XDH z kravského mléka, vykresleno v programu PyMOL na základě experimentálních dat (Enroth et al., 2000). Odpovídající domény obou podjednotek jsou vyznačeny stejnými barvami s rozdílnými odstíny. Domény obsahující 2Fe-2S klastry jsou znázorněny červeně, FAD domény jsou zelené, modře jsou vyobrazeny domény nesoucí molybdopterinové kofaktory. Žluté smyčky spojují 2Fe-2S a FAD domény, fialové se nachází mezi FAD a molybdopterinovými doménami. (B) Rozmístění kofaktorů a navázané kyseliny salicylové uvnitř enzymu. (C) Zobrazení povrchu enzymu, barvy odpovídají popisu v části A.

3.2.2 Xantindehydrogenasa u rostlin

Doposud se podařilo purifikovat XDH, ale nikoli XO, z několika rostlinných druhů včetně pšenice (*Triticum aestivum*) (Montalbini, 1998), různých luštěnin (Montalbini, 2000), hrachu (Sauer et al., 2002) či huseníčku a dalších. Poslední jmenovaný se zdá být výjimečný, neboť většina organismů obsahuje pouze jeden gen pro XDH, u huseníčku však byly nalezeny dva (Hesberg et al., 2004). Kromě purinového katabolismu se u rostlin navíc předpokládá fyziologická úloha XDH v procesech souvisejících s biotickým a abiotickým stresem. Zvýšená exprese nebo aktivita XDH byla pozorována během patogeneze (Montalbini, 1992), sucha, zasolení půdy a zejména senescence, kdy byl nárůst aktivity nejmarkantnější. Není však jednoznačně prokázáno, jestli je důvodem zvýšená potřeba degradace purinů nebo produkce reaktivních kyslíkových radikálů (Hesberg et al., 2004). Druhou možností podporuje zjištění, že za určitých podmínek závislých mimo jiné na dostupnosti substrátů, pH a poměru koncentrací NADH/NAD⁺ může XDH huseníčku efektivně oxidovat NADH za tvorby superoxidu (Zarepour et al., 2010).

3.2.3 Detekce enzymů na elektroforetických gelech

Existuje řada experimentálních metod postavených na různých chemických či fyzikálních principech, které umožňují vizualizovat enzymy na elektroforetických gelech. Mezi běžné techniky patří například imunobloting a autoradiografie, nejčastěji jsou však využívány chromogenní nebo fluorogenní reakce. Přeměna substrátu na barevný respektive fluoreskující produkt přitom může být katalyzována jedнокrokově přímo studovaným enzymem nebo vhodnou spřaženou reakcí (Manchenko, 2003). Detekci XDH po separaci hrubého extraktu huseníčku na nativním polyakrylamidovém gelu je možné provést pomocí chromogenní reakce s tetrazoliovou solí (Hesberg et al., 2004). Nadbytečné elektrony po oxidaci substrátu mohou z FAD přecházet na fenazinmethosulfát, který umožňuje efektivní redukci tetrazoliové soli. Vzniká tak intenzivně zbarvený a ve vodě nerozpustný formazán, který v gelu okamžitě precipituje. Jelikož je tato barvicí směs citlivá na světlo, musí být připravena vždy bezprostředně před použitím a reakce musí probíhat ve tmě (Manchenko, 2003).

3.3. Metody analýzy cytokininů

Rostlinná pletiva jsou tvořena vysoce komplexní směsí nízko- a vysokomolekulárních látek, ve které jsou CK obvykle přítomny v množství fmol až pmol na gram čerstvé hmoty. Jejich analýzu navíc komplikuje fakt, že koncentrace látek s podobnou strukturou

či vlastnostmi je v pletivech řádově vyšší. Samotné CK pak nejsou homogenní skupinou co do fyzikálně-chemických vlastností a doposud není běžné analyzovat všechny jejich formy najednou. Nezbytné je také rozlišit jednotlivé isomery, neboť se obvykle liší svou biologickou aktivitou (Galuszka et al., 2008). Pro ultra-stopovou analýzu látek v takto složitých matricích je proto klíčovým krokem příprava vzorků zahrnující sběr materiálu, extrakci, prekoncentraci a purifikaci (Tarkowski et al., 2009).

3.3.1 Příprava vzorků

Nejsou-li vzorky okamžitě po odběru vhodným způsobem dále zpracovány, je nutné zamrazit je v tekutém dusíku a dále skladovat nejlépe při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby bylo zabráněno enzymatickým přeměnám CK, zejména defosforylaci nukleotidů (Tarkowski et al., 2009). Extrakce homogenizovaného materiálu byla tradičně prováděna tzv. Bieleškiho extrakčním roztokem složeným z methanolu, chloroformu, kys. mravenčí a vody v poměru (v/v) 12:5:1:2 (Bieleški, 1964). Ukazuje se ovšem, že vyloučení chloroformu ze směsi neovlivní extrakční účinnost ani její schopnost inaktivovat nežádoucí enzymy, zároveň je přitom výrazně snížen podíl vyextrahovaných lipofilních kontaminantů. Chloroform je navíc nežádoucí zdravotního a ekologického z hlediska (Hoyerová et al., 2006).

Převažujícím způsobem purifikace a prekoncentrace vzorků je v současné době zejména extrakce na pevné fázi (SPE), případně imunoafinitní extrakce. Vhodnou kombinací sorbentů lze při SPE purifikaci také dosáhnout frakcionace různých skupin CK. Použití silného katexu umožňuje vyvázání všech forem CK z kyselého roztoku, neboť se jedná o slabé báze. Následně může být použit slabý anex (např. DEAE-Sephadex) v sérii s reverzní fází (sorbent C_{18}). Jsou-li na něj vzorky aplikovány v roztoku mravenčanu amonného, CK nukleotidy nesoucí záporný náboj jsou na anexu zadrženy, zatímco CK báze, nukleosidy a glukosidy protečou a zachytí se až na reverzní fázi (Åstot et al., 1998). Alternativou může být například polymerní směsný sorbent katexu a reverzní fáze (MCX), který při vhodné volbě aplikovaných roztoků umožňuje oddělení CK bazí a glukosidů od nukleotidů, ale také auxinů a kys. abscisové (Dobrev & Kamínek, 2002). Nejsелеktivnější metodou je imunoafinitní extrakce, využívá se monoklonálních polyspecifických protilátek proti N^6 substituovaným derivátům adeninu vázaných na pevný nosič. Kritickým parametrem je zde zejména kvalita použité protilátky, výhodou pak možnost jejího opakovaného použití. Životnost se při správném zacházení pohybuje v rozmezí 2-5 let (Tarkowski, 2011). Tyto protilátky ovšem nejsou schopny rozpoznávat CK O-glukosidy, N^7 -glukosidy a nukleotidy, které musí být případně odděleny konvenčními

SPE metodami a enzymaticky štípány β -glukosidasou, respektive alkalickou fosfatase (Novák et al., 2003).

3.3.2 Metody koncové analýzy

Vysoce citlivou a zároveň na přístrojové vybavení nenáročnou metodou stanovení CK je enzymová imunoanalýza, případně radioimunoanalýza, která umožňuje jednodušší detekci, ale klade nároky na manipulaci s radioaktivním materiálem. Využívá se zejména kompetitivního uspořádání, kdy vždy konstantní množství značeného standardu soutěží o vazebná místa protilátek s různými koncentracemi neznačeného standardu, respektive antigenu ve vzorku. Koncentrace neznámého vzorku je pak možné dopočítat ze stanovené kalibrační závislosti. U imunoanalytických metod je vždy nutné počítat s křížovou reaktivitou protilátek, pro kvantitativní analýzu se proto využívá chromatografické předseparace vzorků (Tarkowski et al., 2004). Při použití experimentálního uspořádání s biotinylovanou protilátkou a avidinem značnou alkalickou fosfatase se podařilo dosáhnout limitu detekce menšího než 3 fmol pro iP a iPR (Sotta et al., 1987).

V minulosti byla pro analýzu CK často používána plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), ta se ovšem s příchodem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) dostala do pozadí. Důvodem je převážně nutnost derivatizovat vzorky, jelikož CK nejsou těkavé. Celá analýza se tak komplikuje, v průběhu reakce navíc může vznikat více různých produktů (Tarkowski et al., 2009). Technický posun instrumentace během poslední dekády vedl k výraznému zvýšení separační účinnosti a citlivosti HPLC-MS, díky čemuž je dnes tato metoda pro analýzu CK používána nejčastěji. HPLC a tím spíše modernější ultra-účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) umožňuje dostatečnou separaci CK včetně jejich isomerů, přičemž se obvykle využívá systému reverzních fází a gradientové eluce. Směs obsahující 21 přirozeně se vyskytujících CK a 15 deuterovaných interních standardů je díky tomuto přístupu možné analyzovat během 12 min (Novák et al., 2008). Z chromatografické kolony jsou analyty kapilárou přiváděny do iontového zdroje MS, který má za úkol převést molekuly rozpuštěné v mobilní fázi na ionty v plynném stavu. Z celé řady ionizačních technik je díky svým přednostem (vysoká citlivost, nízké pozadí) využívána zejména ionizace elektrosprejem (Tarkowski et al., 2009). V tomto případě je nezbytné zajistit, aby byla mobilní fáze těkavá a nedošlo ke kontaminaci iontového zdroje krystaly solí. Vhodnou mobilní fází je zejména mravenčan amonný (pH=4,0) v kombinaci s methanolem (Novák et al., 2003). Ionty následně pokračují do analyzátoru, výhodou je použití přístroje

umožňujícího sledování produktu rozpadu iontů (MRM), jako je trojitý kvadrupól nebo kvadrupól s analyzátozem doby letu, jelikož detekce v tomto režimu je vysoce selektivní. Prekurzorový iont o zvoleném poměru m/z je v kolizní cele přístroje rozbit srážkou s molekulou inertního plynu a dále je monitorován pouze signál odpovídající jeho charakteristickému fragmentu (Tarkowski et al., 2011).

Jelikož rostlinné hormony a růstové regulátory neúčinkují nezávisle na sobě, ale jejich signální dráhy tvoří provázanou síť, je pro důsledné pochopení regulace vývojových procesů rostlin nezbytná znalost jejich hladin za různých vnějších i vnitřních podmínek. Trendem posledních let proto stává takzvaná hormonomická analýza, jejímž cílem je stanovení koncentrací co největšího počtu fytohormonů současně. Dochází tak k úsporám času, laboratorního materiálu ale i vzorků. Problémem zůstávají velké rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech různých skupin fytohormonů, a také mezi analyty v rámci jedné skupiny. Množství stanovovaných látek je tímto omezeno a důsledkem jsou často i vyšší limity detekce. Velkou výzvou do budoucna zůstává také zavedení dostatečně citlivých analytických metod, který by umožnily stanovení celého spektra fytohormonů na buněčné úrovni (Podlešáková et al., 2012).

Následující 3 kapitoly budou zveřejněny v květnu 2015. Tato část diplomové práce obsahuje metody a výsledky, které nebyly k datu odevzdání publikovány.

4. Materiál a metody

5. Výsledky

6. Diskuse

7. Závěr

- Teoretická část diplomové práce stručně shrnuje dosavadní poznatky o strukturní rozmanitosti, metabolismu, přenosu signálu a fyziologických funkcích CK. Dále se zabývá strukturou a reakčním mechanismem XDH, jakož i její úlohou v rostlinách a možnostmi detekce její enzymové aktivity. Poslední část této kapitoly je věnována přehledu nejvýznamnějších metod používaných pro analýzu CK.
- Experimentální část zahrnuje popis vývoje metody purifikace OHCK pomocí SPE. Na základě stanovených hodnot návratností byl ze tří variant vybrán směsný sorbent Oasis™ MCX, který je v práci dále využit pro zpracování reálných vzorků z huseníčku, hrachu a ječmene.
- Dále byla vyvinuta metoda UHPLC-MS/MS pro koncovou analýzu OHCK v rostlinném materiálu. Byly také stanoveny některé její analytické parametry, jako je LOD, LOQ a lineární dynamický rozsah.
- Pomocí nativní elektroforézy a aktivního barvení byla zmapována aktivita XDH v kořenech, stoncích a listech zvolených pokusných rostlin v několika vývojových stádiích. Na základě těchto výsledků a dostupné literatury byl vybrán vhodný rostlinný materiál pro následný pokus o identifikaci OHCK.
- Nad rámec cílů této práce byl proveden experiment zkoumající možnosti identifikace XDH po nativní elektroforéze proteomickými metodami.
- V závěru experimentální části jsou popsány výsledky pokusu o identifikaci OHCK ve zvoleném rostlinném materiálu. Za daného experimentálního uspořádání nebyla tato snaha úspěšná. Pouze v případě vzorku ze senescentních listů hrachu byl detekován signál, který by potenciálně mohl patřit 8-OHtZ. Jednoznačnou identifikaci ovšem nebylo možné uskutečnit.
- Výsledky diplomové práce jsou diskutovány proti publikované literatuře a na závěr jsou nastíněny možnosti dalšího experimentálního postupu.

8. Seznam použité literatury

- Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5994-5998.
- Amasino R. (2005) 1955: kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiol.* **138**, 1177-1184.
- 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**, 741-745.
- Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G. (1998) Precolumn derivatization and capillary liquid chromatographic/frit-fast atom bombardment mass spectrometric analysis of cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Mass Spectrom.* **33**, 892-902.
- Auer C. A., Cohen J. D. (1993) Identification of a benzyladenine disaccharide conjugate produced during shoot organogenesis in *Petunia* leaf explants. *Plant Physiol.* **102**, (541-545).
- Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F., Rattan S. I. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett.* **393**, 197-200.
- Bassil N. V., Mok D., Mok M. C. (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **102**, 867-872.
- Benková E., Witters E., Van Dongen W., Kolář J., Motyka V., Brzobohatý B., Van Onckelen H. A., Macháčková I. (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiol.* **121**, 245-252.
- Bergmann F., Kwietny H. (1958) Oxidation of kinetin by mammalian xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **28**, 100-103.
- Bielecki R. L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal. Biochem.* **9**, 431-442.
- Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N⁶-(D²- isopentenyl)adenine. *Can. J. Biochem.* **53**, 37-41.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.

- Bürkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn C., Frommer W. B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 13–26.
- Burrows W. J., Armstrong D. J., Kamínek M., Skoog F., Bock R. M., Hecht S. M., Dammann L. G., Leonard N. J., Oocolowitz J. (1970) Isolation and identification of four cytokinins from wheat germ transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **9**, 1867-1872.
- Carabelli M., Possenti M., Sessa G., Ciolfi A., Sassi M., Morelli G., Ruberti I. (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* **21**, 1863-1868.
- Cary A. J., Liu W., Howell S. H. (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Cline M. G. (1991) Apical dominance. *Bot. Rev.* **57**, 318-358 .
- Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G. (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J. Exp. Bot.* **54**, 2511-2517.
- D'Agostino I. B., Deruère J., Kieber J. J. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* **124**, 1706-1717.
- Dewitte W., Scofield S., Alcasabas A. A., Maughan S. C., Menges M., Braun N., Collins C., Nieuwland J., Prinsen E., Sundaresan V., Murray J. A. (2007) *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 14537-14542.
- Dobrev P. I., Kamínek M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **950**, 21-29.
- Doležal K., Åstot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Strnad M., Sandberg G. (2002) Identification of aromatic cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid chromatography/frit – fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Growth Regul.* **36**, 1-9.
- Dortay H., Mehnert N., Bürkle L., Schmölling T., Heyl A. (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* **273**, 4631-4644.
- Ellis R. J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 241-244.

- Enroth C., Eger B. T., Okamoto K., Nishino T., Nishino T., Pai E. F. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10723-10728.
- Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375–381.
- Fankhauser Ch. (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 11453–11456.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121-130.
- Frébortová J., Novák O., Frébort I., Jorda R. (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *Plant J.* **61**, 467-481.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.* **268**, 450–461.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmölling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255-267.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008) Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Ve Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 34 Bioactive Natural Products (Part N)* (Atta-ur-Rahman, ed.), pp. 203-264, Elsevier, Amsterdam, Nizozemí.
- Gan S., Amasino R. M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Gaudinová A., Dobrev P. I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Friedecký D., Motyka V. (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Plant Growth Regul.* **24**, 188–200.

- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **49** (2), 161-169.
- Haberlandt G. (1913) Zur Physiologie der Zellteilung. *Sitzungsberg Akad. Wiss. Berlin, Phys. Math.* **C1**, 318-345.
- Hesberg Ch., Hänsch R., Mendel R. R., Bittner F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 13547-13554.
- Heyl A., Ramireddy E., Brenner W. G., Riefler M., Allemeersch J., Schmülling T. (2008) The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**, 1380-1395.
- Hille R., Nishino T. (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* **9**, 995-1003.
- Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* **138**, 196-206.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75–83.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J., Wareing P. F. (1975) A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.
- Hosny M., Ragab E. A., Mohammed A. E. I., Shaheen U. Y. (2009) Isolation and structure identification of new cytokinins from *Gleditsia caspia*. *ARKIVOC* **14**, 109-117.
- Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004) N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822-47832.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Solcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151-1159.
- Hutchison C. E., Kieber J. J. (2002) Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 47-59.
- Hutchison C. E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., Maxwell B. B., Perdue T. D., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J. (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell.* **18**, 3073-3087.

- Chaves Das Neves H. J., Pais M. S. S. (1980) A new cytokinin from the fruits *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron Lett.* **21**, 4387-4390.
- Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M. (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.
- Chen C., Smith O. C., McChesney J. D. (1975) Biosynthesis and cytokinin activity of 8-hydroxy and 2,8-dihydroxy derivatives of zeatin and N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine. *Biochemistry* **14**, 3088-3093.
- 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.
- Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P., Tsiantis M. (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* **15**, 1560-1565.
- Kakimoto T. (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.
- Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 677-685.
- Kamboj J. S., P.S. Blake P. S., Baker D. A. (1998) Cytokinins in the vascular saps of *Ricinus communis*. *Plant Growth Regul.* **25**, 123-126.
- 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*. *J. Biol. Chem.* **279**, 14049-14054.
- Klämbt D., Thies G., Skoog F. (1966) Isolation of cytokinins from *Corynebacterium fascians*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 52-59.
- Kobayashi H., Morisaki N., Tago Y., Hashimoto Y., Iwasaki S., Kawachi E., Nagata R., Shudo K. (1997) Structural identification of a major cytokinin in coconut milk as 14-O-(3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinofuranosyl]-4-O-(α -L-arabinofuranosyl)- β -d-galactopyranosyl)-trans-zeatin riboside. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 260-264.
- Koshimizu K., Matsubara S., Kusaki T., Mitsui T. (1967) Isolation of a new cytokinin from immature yellow lupin seeds. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 795-801.

- Krall L., Raschke M., Zenk M. H., Baron C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315-318.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Kuroha T., Kato H., Asami T., Yoshida S., Kamada H., Satoh S. (2002) A *trans*-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *J. Exp. Bot.* **53**, 2193–2200.
- Kwade Z., Swiatek A., Azmi A., Goossens A., Inzé D., Van Onckelen H., Roef L. (2005) Identification of four adenosine kinase isoforms in tobacco BY-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**, 17512-17519.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laplaze L., Benková E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennett M. (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**, 3889-3900.
- Leibfried A., To J. P., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J. J., Lohmann J. U. (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.
- Letham D. S., Miller C. O. (1965) Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.* **6**, 355–359 .
- Letham D. S., Wilson M. M., Parker C. W., Jenkins I. D., Macleod J. K., Summons R. E. (1975) Regulators of cell division in plant tissue. XXIII. The identity of an unusual metabolite of 6-benzylaminopurine. *Biochim. Biophys. Acta.* **399**, 61-70.
- Letham D. S., Parker C. W., Duke C. C., Summons R. E., MacLeod J. K. (1976) O-glucosylzeatin and related compounds – a new group of cytokinin metabolites. *Ann. Bot.* **41**, 261–263
- Letham D. S., Summons R. E., Parker C. W., MacLeod J. K. (1979) Regulators of cell division in plant tissues. XXVII. Identification of an amino-acid conjugate of 6-benzylaminopurine formed in *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Planta* **146**, 71-74.

- Letham D. S., Palni L. M. S., Tao G. Q., Gollnow B. I., Bates C. M. (1983) Regulators of cell division in plant tissues XXIX. The activities of cytokinin glucosides and alanine conjugates in cytokinin bioassays. *J. Plant Growth. Regul.* **2**, 103-115.
- Letham D. S., Zhang R. (1989) Cytokinin translocation and metabolism in lupin species. II. new nucleotide metabolites of cytokinins. *Plant Sci.* **64**, 161–165.
- Letham D. S., Smith N. G., Willcocks D. A. (2003) Cytokinin metabolism in *Narcissus* bulbs: chilling promotes acetylation of zeatin riboside. *Funct. Plant Biol.* **30**, 525-532.
- MacLeod J. K., Summons R. E., Parker C. W., Letham D. S. (1975) Lupinic acid, a purinyl amino acid and a novel metabolite of zeatin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **19**, 809-810.
- Mähönen A. P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P. N., Helariutta Y. (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev.* **14**, 2938-2943.
- 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.
- Manchenko G. P. (2003) Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels, pp. 5-6, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989) An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiol.* **90**, 1630-1635.
- Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E., Mok D. W. (2001) A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5922-5926.
- Matsumoto-Kitano M., Kusumoto T., Tarkowski P., Kinoshita-Tsujimura K., Václavíková K., Miyawaki K., Kakimoto T. (2008) Cytokininins are central regulators of cambial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20027-20031.
- McGaw B. A., Horgan R. (1983) Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown-gall tissue. *Planta* **159**, 30-37.
- McGaw B. A., Heald J. K., Horgan R. (1984) Dihydrozeatin metabolism in radish seedlings. *Phytochemistry* **23**, 1373-1377.
- Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. (1995a) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1393.

- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955b) Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2262-2263.
- Miller C. O. (1961) A kinetin-like compound in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **47**, 170-174.
- Mira-Rodado V., Sweere U., Grefen C., Kunkel T., Fejes E., Nagy F., Schäfer E., Harter K. (2007) Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **58**, 2595-2607.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. *Plant J.* **37**, 128–138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16598-16603.
- Moffatt B., Pethe C., Laloue M. (1991) Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking Idenine Ihosphoribosyltransferase Ictivity. *Plant Physiol.* **95**, 900-908.
- Montalbini P. (1992) The inhibition of rust fungus growth in allopurinol-treated bean plants: indirect evidence for the involvement of xanthine oxidoreductase in the biotrophism of *Uromyces phaseoli*. *J. Phytopath.* **134**, 218-228.
- Montalbini P. (1998) Purification and some properties of xanthine dehydrogenase from wheat leaves. *Plant Sci.* **134**, 89-102.
- Montalbini P. (2000) Xanthine dehydrogenase from leaves of leguminous plants: purification, characterization and properties of the enzyme. *J. Plant Physiol.* **156**, 3-16.
- Mougel C., Zhulin I. B. (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 582-584.
- Müller B., Sheen J. (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094-1097.
- Nandi S. K., Letham D. S., Palmi L. M. S., Wong O. C., Summons R. E., (1989) 6-benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Sci.* **61**, 189-196.
- Nieminen K., Immanen J., Laxell M., Kauppinen L., Tarkowski P., Doležal K., Tähtiharju S., Elo A., Decourteix M., Ljung K., Bhalerao R., Keinonen K., Albert V. A., Helariutta Y.

- (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20032-20037.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowská D., Norbaek R., Åstot C., Doležal K., Sandberg G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8039-8044.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **480**, 207–218.
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- Okumura F. S., Katani Y., Ariga T., Masumura M., Kuraishi S. (1959) Syntheses of kinetin-analogues. II. *Bull. Chem. Soc. Japan* **32**, 883–887.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971) Conversion of N-(delta-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiol.* **48**, 775-778.
- Pastori G. M., del Río L. A. (1997) Natural senescence of pea leaves (an activated oxygen-mediated function for peroxisomes). *Plant Physiol.* **113**, 411-418.
- Pernisová M., Klíma P., Horák J., Válková M., Malbeck J., Souček P., Reichman P., Hoyerová K., Dubová J., Friml J., Zažímalová E., Hejátko J. (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3609-3614.
- Phillips D. A., Torrey J. G. (1972) Studies of cytokinin production by *Rhizobium*. *Plant Physiol.* **49**, 11-15.
- Planchais S., Glab N., Tréhin C., Perennes C., Bureau J. M., Meijer L., Bergounioux C. (1997) Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *Plant J.* **12**, 191-202.
- Podlešáková K., Tarkowská D., Pěňčík A., Oklešťková J., Turečková V., Floková K., Tarkowski P. (2012) Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem. Listy* **106**, 373-379.
- Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling T. (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40-54.
- Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmard A., Murray J. A. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.

- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19631-19636.
- Rodríguez-Trelles F., Tarrío R., Ayala F.J. (2001) Xanthine dehydrogenase (XDH): episodic evolution of a “neutral” protein. *J. Mol. Evol.* **53**, 485-495.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9972-9977.
- Salomé P. A., To J. P., Kieber J. J., McClung C. R. (2006) *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell* **18**, 55-69.
- Sauer P., Frébortová J., Šebela M., Galuszka P., Jacobsen S., Peč P., Frébort I. (2002) Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 393-400.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959–2963.
- Shani E., Ben-Gera H., Shleizer-Burko S., Burko Y., Weiss D., Ori N. (2010) Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *Plant Cell* **22**, 3206-3217.
- Shantz E. M., Steward F. C. (1955) The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6351–6353.
- Shaw G., Mok M. C., Mok D. W. S. (1987) Urines, pyrimidines, and imidazoles. LXIII: Synthesis of O-β-D-xylopyranosyl-(E)-zeatin, a new cytokinin metabolite. *J. Chem. Res. (S)*, 110-111.
- Shevchenko A., Tomas H., Havliš J., Olsen J. V., Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860.
- Schmitz R. Y., Skoog F. (1972) Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiol.* **50**, 702-705.
- Skoog F., Miller C. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**, 118–131.
- Skoog F., Strong F. M., Miller C. O. (1965) Cytokinins. *Science* **148**, 532-533.

- Sotta B., Pilate G., Pelese F., Sabbagh I., Bonnet M., Maldiney R. (1987) An avidin-biotin solid phase ELISA for femtomole isopentenyladenine and isopentenyladenosine measurements in HPLC purified plant extracts. *Plant Physiol.* **84**, 571-573.
- Stirpe F., Della Corte E. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
- Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. (1992) Immunodetection and identification of N⁶-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in *Populus x canadensis* moench cv *Robusta* leaves. *Plant Physiol.* **99**, 74-80.
- Strnad M., Hanuš J., Vaněk T., Kamínek M., Ballantine J. A., Fussell B., Hanke D. E. (1997) *meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* moench. cv. *Robusta*). *Phytochemistry* **45**, 213-218.
- Suttle J. C., Banowetz G. M. (2000) Changes in *cis*-zeatin and *cis*-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiol. Plant.* **109**, 68–74.
- Suzuki T., Zakurai K., Imamura A., Nakamura A., Ueguchi C., Mizuno T. (2000) Compilation and characterization of histidine- containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2482–2485.
- Sweere U., Eichenberg K., Lohrmann J., Mira-Rodado V., Bäurle I., Kudla J., Nagy F., Schafer E., Harter K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**, 1108-1111.
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol.* **42**, 85-93.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004a) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866-41872.
- Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004b) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1053-1062.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* **45**, 1028-1036.

- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol. Plant.* **117**, 579-590.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy* **98**, 834 – 841.
- Tarkowski P., Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N. (2009) Analytical methods for cytokinins. *Trends. Analyt. Chem.* **28**, 323-335.
- Tarkowski P., Václavíková K., Novák O., Pertry I., Hanuš J., Whenham R., Vereecke D., Šebela M., Strnad M. (2010) Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **680**, 86-91.
- Tarkowski P. (2011) Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace. *Habilitační práce* – UP Olomouc, Česká republika.
- Taylor J. L., Zaharia L. I., Chen H., Anderson E., Abrams S. R. (2006) Biotransformation of adenine and cytokinins by the rhizobacterium *Serratia proteamaculans*. *Phytochemistry* **67**, 1887-1894.
- To J. P., Haberer G., Ferreira F. J., Deruere J., Mason M. G., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J. (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**, 658-671.
- Turner J. E., Mok D. W., Mok M. C., Shaw G. (1987) Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3714-3717.
- Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 231-235.
- Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **224**, 771-786.
- Vreman H. J, Thomas R., Corse J. (1978) Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **61**, 296-306 .
- Vyroubalová S., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes

- putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* **151**, 433-447.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10487-10492.
- Werner T., Hanuš J., Holub J., Schmülling T., van Onckelen H., Strnad M. (2003a) New cytokinin metabolites in IPT transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Physiol Plant.* **118**, 127-137.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. (2003b) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner T., Holst K., Pörs Y., Guivarc'h A., Muströph A., Chriqui D., Grimm B., Schmülling T. (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *J. Exp. Bot.* **59**, 2659-2672.
- Werner T. and Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.
- Whitty C. D., Hall R. H. (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can. J. Biochem.* **52**, 787-799.
- 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.
- Wyngaarden J. B., Dunn J. T. (1957) 8-hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 150-156.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017-1023.
- Zarepour M., Kaspari K., Stagge S., Rethmeier R., Mendel R. R., Bittner F. (2010) Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Mol. Biol.* **72**, 301-310.
- Zheng B., Deng Y., Mu J., Ji Z., Xiang T., Niu Q., Chua N., Zuo J. (2006) Cytokinin affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and *Arabidopsis* response regulator 4-dependent manner. *Physiol. Plant.* **127**, 277-292.

9. Seznam zkratek

2-MeS	2-methylthio
8-OHiP	8-hydroxyisopentenyladenin (analogicky 2,8-)
8-OHcZ	8-hydroxy- <i>cis</i> -zeatin (analogicky 2,8-)
8-OHtZ	8-hydroxy- <i>trans</i> -zeatin (analogicky 2,8-)
9G	9-glukosid
AcN	acetonitril
AHK	histidinkinasa (huseníček)
AHP	fosfotransferový protein (huseníček)
APS	peroxodisíran sodný
ARR	regulátor odpovědi (huseníček)
BAP	6-(benzylamino)-purin
BCA	bicinchoninová kyselina
CBB	Coomassie brilliant blue
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12)
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyl difosfát
DTT	dithiothreitol
ENT	transportér CK ribosidů; equilibrative nucleoside transporters
FW	hmotnost za čerstvého stavu (fresh weight)
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP	isopentenyladenin
IPT	isopentenyltransferasa; adenylátový typ (EC 2.5.1.27)
IS	interní standard
KNOX	KNOTTED1-like homeobox; transkripční faktor
LOD	limit detekce
LOG	fosforibohydrolasa „Lonely guy“
LOQ	limit kvantifikace
MALDI	desorpce a ionizace laserem za účasti matrice
MCX	směsný sorbent – katex a reverzní fáze

MeOH	methanol
MEP	methylerythritol fosfátová dráha
MRM	sledování produktu rozpadu iontů
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid
MVA	mevalonátová dráha
OHCK	hydroxyderiváty cytokininů
<i>o</i> T	<i>ortho</i> -topolin
PAGE	polyakrylamidový gel
phyB	fytochrom B
PMS	fenazinmethosulfát
PUP	purinpermeasa
R	ribosid
R/FR	poměr červeného a vzdáleného červeného světla
RAM	apikální meristém kořene
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
S/N	poměr signál / šum
SAM	apikální meristém stonku
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce na pevné fázi
TEMED	tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TCS	dvousložkový systém
TOF	analyzátor doby letu
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>t</i> Z	<i>trans</i> -zeatin
UHPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie
WT	běžná rostlina (wild-type)
XDH	xantindehydrogenasa (EC 1.17.1.4)
XO	xantinoxidasa (EC 1.17.3.2)