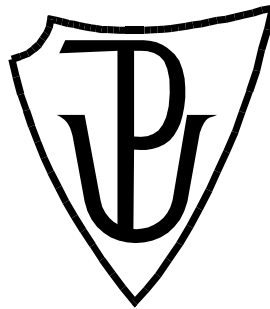


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Izolace cytokininů z tRNA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Věra Dosedělová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2016

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

V Olomouci dne 2. 5. 2016

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za odborné rady a připomínky při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat Bc. Štěpánu Kouřilovi za trpělivost, ochotu a pozitivní přístup.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Věra Dosedělová
Název práce	Izolace cytokininů z tRNA
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Teoretická část bakalářské práce je věnována fytohormonům, především biosyntéze cytokininů. Dále jsou popsány metody sekvenování DNA, typy RNA a funkce cytokininů v tRNA. Experimentální část je zaměřena na screening volných aromatických cytokininů metodou LC-MS v listech z topolů, izolaci tRNA a analýzu tRNA cytokininů. Screeningem bylo zjištěno, že aromatický cytokinin *ortho*-topolin ribosid se vyskytuje v listech všech 13 vybraných klonů rodu *Populus*, a to v koncentračním rozmezí 0,2-443,1 pmol·g⁻¹ čerstvé hmoty. Volná báze *ortho*-topolin byla detekována pouze u 7 klonů, a to v koncentračním rozmezí 0,9-169,4 pmol·g⁻¹ čerstvé hmoty. Dále byl stanoven obsah *ortho*-topolin ribosidu v tRNA izolované z listů klonu *P. deltoides*, vybraného podle nejvyššího obsahu volných aromatických cytokininů. Izolovaná tRNA byla podrobena alkalické hydrolýze, kde průměrná koncentrace *o*TR byla 0,33 ng·μg⁻¹ tRNA. Množství *cis*-zeatin ribosidu bylo vzhledem k *o*TR poloviční a N⁶-isopentenyladenosinu pětinnové. Závěrem byl změřen časový profil aromatických cytokininů mezi pátou a jedenáctou hodinou. Ukázalo se, že hladina volných cytokininů je nejvyšší v devět hodin, zatímco vázané v tRNA ve sledovaném časovém rozmezí stále zůstávaly na bazální úrovni.

Klíčová slova	Cytokininy, tRNA, biosyntéza cytokininů, tRNA isopentenyltransferasa
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Věra Dosedělová
Title	Isolation of cytokinins from tRNA
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

Theoretical part of this bachelor thesis deals phytohormones, especially cytokinin biosynthesis. Further DNA sequencing, types of RNA and functions of cytokinins in tRNA are described. Experimental part is focused on screening of free aromatic cytokinins in poplar leaves by LC-MS method, tRNA isolation and analysis of tRNA cytokinins. By screening it was discovered that aromatic cytokinin *ortho*-topolin riboside occurred in leaves of all 13 chosen clones of *Populus* genus in concentration range 0,2-443,1 pmol·g⁻¹ fresh weight. Free base *ortho*-topolin was detected only in 7 clones in concentration range 0,9-169,4 pmol·g⁻¹ fresh weight. Next the amount of *ortho*-topolin riboside in tRNA isolated from leaves of *P. deltoides* chosen due to the highest amount of free aromatic cytokinins was determined. Isolated tRNA was submitted to alkaline hydrolysis, where an average concentration of *o*TR was 0,33 ng·μg⁻¹ tRNA. Amount of *cis*-zeatin riboside was half given *o*TR and amount of N⁶-isopentenyladenosine was one-fifth. At the end time profile between nine and eleven o'clock was measured. It was proved that level of free aromatic cytokinins was highest at nine o'clock, while bound in tRNA remained on basal level.

Keywords	Cytokinins, tRNA, cytokinin biosynthesis, tRNA isopentenyltransferase
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Fytohormony	10
2.1.1 Auxiny	10
2.1.2 Gibbereliny	11
2.1.3 Kyselina abscisová	12
2.1.4 Ethylen	13
2.2 Cytokininy	14
2.2.1 Isoprenoidní cytokininy	14
2.2.1.1 Chemická struktura	14
2.2.1.2 Biosyntéza	15
2.2.1.3 Původ isopentenylového řetězce	15
2.2.1.4 Původ zeatinu	16
2.2.2 Aromatické cytokininy	18
2.2.2.1 Chemická struktura	18
2.2.2.2 Biosyntéza	18
2.3 DNA	20
2.3.1 Struktura	20
2.3.2 Metody sekvenování DNA	23
2.4 RNA	27
2.4.1 Transkripce	27
2.4.2 Mediátorová RNA	27
2.4.3 Translace	29
2.4.4 Ribosomální RNA	29
2.4.5 Transferová RNA	29
2.4.5.1 Cytokininy v tRNA	32
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1 Materiál a přístroje	33
3.1.1 Chemikálie	33
3.1.2 Přístroje a pomůcky	34
3.1.3 Biologický materiál	35
3.2 Metody	36
3.2.1 Příprava cytokininových standardů	36
3.2.2 Optimalizace metody LC-MS pro měření aromatických cytokininů	37
3.2.3 Příprava kalibrační řady	38

3.2.4 Zpracování rostlinného materiálu	39
3.2.4.1 Extrakce.....	39
3.2.4.2 Purifikace cytokininů pomocí SPE	39
3.2.5 Screening volných ARCK pomocí LC-MS.....	39
3.2.6 Izolace tRNA.....	40
3.2.7 Spektrofotometrické měření tRNA	40
3.2.8 Agarosová elektroforéza	41
3.2.9 Hydrolýza tRNA	41
3.2.9.1 Alkalická hydrolýza	41
3.2.9.2 Enzymatická hydrolýza pomocí nukleasy S1	41
3.2.9.3 Enzymatická hydrolýza pomocí nukleasy P1	42
3.2.9.4 Defosforylace nukleotidů	42
3.2.10 Purifikace tRNA cytokininů pomocí SPE.....	42
3.2.11 Analýza cytokininů v tRNA pomocí LC-MS	43
4 VÝSLEDKY	44
4.1 Přenesení LC-MS metody pro měření aromatických cytokininů.....	44
4.2 Analýza volných aromatických cytokininů pomocí LC-MS	46
4.3 Izolace cytokininů jako složek tRNA	52
4.4 Analýza cytokininů v tRNA pomocí LC-MS	53
5 DISKUZE.....	56
6 ZÁVĚR	58
7 LITERATURA.....	59
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63

Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši s klíčovými slovy: cytokininy, tRNA, biosyntéza cytokininů, tRNA isopentenyltransferasa.
2. Analyzovat volné aromatické cytokininy v rostlinném materiálu.
3. Izolovat cytokininy z rostlinné tRNA.

1 ÚVOD

Cytokininy jsou isoprenoidní nebo aromatické N⁶ deriváty adeninu vyskytující se v rostlinách ve dvou formách, tj. jako volné nebo vázané v tRNA. Jejich koncentrace se pohybuje ve fmol-pmol·g⁻¹ čerstvé hmoty. Regulují buněčné dělení, senescenci, apikální dominanci, syntézu fotosyntetických barviv nebo tvorbu chloroplastů. Cytokininy vázané v tRNA se nacházejí v pozici 37 takových tRNA, které se při translaci vážou na kodony začínající uracilem. Modifikované nukleotidy v tRNA obvykle plní určitou funkci, kdy např. N⁶-isopentenyladenosin zvyšuje přesnost a účinnost translace stabilizováním kodon-antikodonové interakce. Funkce rostlinných tRNA cytokininů avšak ještě není zcela vysvětlena, nicméně jejich syntéza degradací tRNA pravděpodobně přispívá k udržování celkové homeostáze.

Isoprenoidní cytokininy jsou ve srovnání s aromatickými mnohem více prostudované, protože jsou v rostlinách zastoupeny ve větším množství. Důvodem může být i fakt, že aromatické cytokininy byly dlouho považovány za syntetické látky, takže mnoho aspektů včetně jejich biosyntézy čeká na objasnění. Co se týče rostlinné tRNA, zatím byla popsána přítomnost pouze isoprenoidních cytokininů, především N⁶-isopentenyladenosinu, *cis*-zeatin ribosidu a *trans*-zeatin ribosidu. Analytické metody studia fytohormonů jsou citlivější a přesnější (např. vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií), což umožňuje detekci a kvantifikaci širšího spektra analytů.

Cílem této bakalářské práce je analýza volných aromatických cytokininů v rostlinném materiálu a izolace cytokininů z tRNA se zaměřením na aromatické zástupce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Fytohormony

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou malé organické molekuly kontrolující růstové, vývojové a životní procesy rostlin od embryogeneze až po senescenci. V rostlinných buňkách řídí buněčné dělení, diferenciaci a apoptózu. Z makroskopického hlediska mají vliv na klíčení semen, vývoj orgánů, celkovou stavbu rostlin, květenství, zrání ovoce nebo reakce na vnější podmínky (Bishopp *et al.*, 2006).

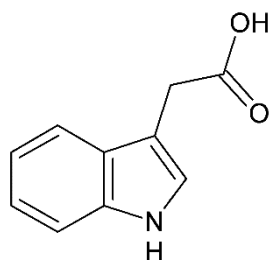
Hormony působí ve velmi nízkých koncentracích, kdy jejich aktivita spočívá v přenosu signálu mezi buňkami, pletivy a orgány v rostlině. Signální transdukce je proces zahrnující transport vysílajícího intracelulárního nebo extracelulárního signálu neseného signální molekulou na receptor za vzniku buněčné odpovědi (Wang a Irving, 2011).

Rostlinný vývoj je řízen klasickými skupinami hormonů: auxiny, gibbereliny, cytokininy, kyselinou abscisovou a ethylenem. Strigolaktony, brassinosteroidy, jasmonáty a kyselina salicylová patří mezi nejnověji objevené fytohormony a současným výzkumem se seznam fytohormonů pravděpodobně rozšíří (Záveská Drábková *et al.*, 2015). V následujícím textu budou zmíněny nejznámější zástupci fytohormonů s cytokininy v samostatné kapitole.

2.1.1 Auxiny

Auxiny patří mezi nejdéle a nejvíce studované fytohormony. Mezi přirozené auxiny se řadí kyselina indolyl-3-máselná, fenylactová, 4-chlor-indolylactová a především kyselina indolyl-3-octová (IAA, Obr. 1) jakožto nejvýznamnější auxin (Sauer *et al.*, 2013).

Hlavním prekurzorem IAA je aminokyselina tryptofan. V *Arabidopsis thaliana* se nejdříve za přítomnosti enzymu tryptofan aminotransferasa Arabidopsis (TAA, EC 2.6.1.99) přemění tryptofan na indol-3-pyruvát (IPA). Následuje reakce enzymu YUCCA flavin monooxygenasa (EC 1.14.13.168) za vzniku IAA (Mashiguchi *et al.*, 2011).



Obr. 1 Strukturální vzorec kyseliny indolyl-3-octové.

Nejlépe popsaná signální dráha auxinu souvisí s intracelulárním receptorem TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), který je součástí podjednotky E3 ubiquitin ligasy (EC 2.3.2.27). Navázání auxinu na receptor umožní interakci komplexu s Aux/IAA (AUXIN/INDOLE ACETIC ACID) proteiny, což způsobí jejich degradaci 26S proteasomem, uvolnění transkripčních faktorů a zahájení nebo potlačení exprese cílového genu (Sauer *et al.*, 2013).

Nejvíce IAA se syntetizuje v mladých listech rostlin a množství IAA je přímo úměrné buněčnému dělení a elongaci buněk, takže limituje velikost rostlin (Ljung *et al.*, 2001). Auxiny se také podílejí na vytvoření odpovědi na gravitropismus, fototropismus a abiotický stres, udržení apikální dominance inhibicí růstu bočních pupenů, stárnutí rostliny, zrání plodů nebo opadu listů (Sauer *et al.*, 2013).

2.1.2 Gibereliny

Gibereliny (GA) představují skupinu tetracyklických diterpenoidních karboxylových kyselin s *ent*-giberelanovým skeletem. GA zastupuje přes 130 různých látek, ale pouze kyselina giberelová (GA₃, Obr. 2), GA₁ a GA₄ jsou biologicky aktivní (Podlešáková *et al.*, 2012).

Biosyntéza giberelinů vychází z *trans*-geranylgeranyl difosfátu (GGPP) syntetizovaného z isopentenyl difosfátu. GGPP je přeměněn přes cyklický *ent*-kauren na GA₁₂-aldehyd jakožto prekurzor všech GA. Následuje řada oxidativních kroků, kde konečným je hydroxylace za přítomnosti enzymu GA 3-oxidasa (EC 1.14.11.15) a vzniku biologicky aktivních GA (Hedden a Thomas, 2012).

Signální dráha GA začíná GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1) receptorem, kde po interakci s GA dojde ke konformační změně a navázání DELLA proteinů. Formace GA-GID1-DELLA komplexu stimuluje polyubiquitinaci a degradaci DELLA proteinů, jakožto represorů GA odpovědi. Výsledkem je uvolnění transkripčních faktorů a regulace transkripce (Davière a Achard, 2013).

Působení GA je velmi různorodé a často druhově specifické. Stimulují růst stonku a jsou důležité i pro růst kořenů. Gibereliny ovlivňují počátek květenství, určení pohlaví, tvorbu pylu a pylové láčky, klíčení semen nebo růst plodů (Pharis a King, 1985).

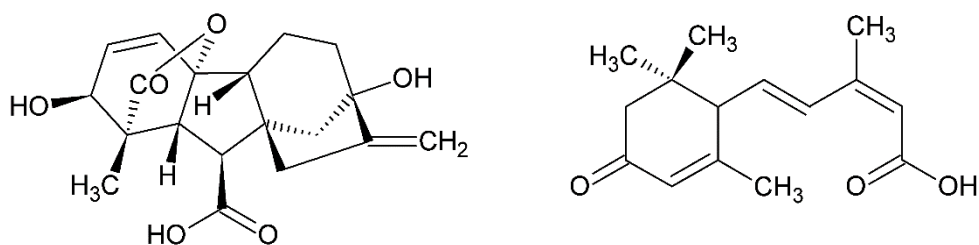
2.1.3 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) se svou strukturou řadí mezi seskviterpeny s cyklickou částí v molekule (Obr. 2). Rozlišují se *cis*- a *trans*-izomery podle pozice karboxylové skupiny na uhlíku C2 (Podlešáková *et al.*, 2012).

Biosyntéza ABA je spojená s biosyntézou karotenoidů, kde se nejdříve methylethritol fosfátovou drahou (MEP) syntetizuje isopentenyl difosfát (IPP) z glyceralddehyd-3-fosfátu a kyseliny pyrohroznové. Dráha pokračuje přes syntézu β -karotenu a dalších karotenoidů, jejichž štěpením a oxidací vzniká ABA (Hirai *et al.*, 2000).

ABA zahajuje signální dráhu vazbou na receptory PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (PYR/PYL/RCAR), což způsobí interakci s proteinovou fosfatasou 2C (PP2C, negativní regulátor). Výsledkem formace PYR/PYL/RCAR-PP2C komplexu je inhibice PP2C a aktivace proteinkinasy 2 (SnRK2), která je pozitivním regulátorem signální dráhy (Umezawa *et al.*, 2010).

ABA kontroluje vývoj embrya tím, že zabraňuje jeho zakrnutí. Když embryo vyspěje, ABA zastaví jeho růst, iniciuje klíčení a v průběhu maturace aktivuje syntézu zásobních proteinů a lipidů (Raz *et al.*, 2001). ABA reaguje na působení stresorů, kdy např. v případě sucha zabrání ztrátě vody uzavřením průduchů (Leung a Giraudat, 1998).



Obr. 2 Strukturální vzorec kyseliny giberelové (vlevo) a kyseliny abscisové (vpravo).

2.1.4 Ethylen

Ethylen je nejjednodušší alken, jedná se o plynnou látku lehčí než vzduch.

Prekurzorem ethyleny je aminokyselina methionin, která se přeměňuje přes S-adenosylmethionin a kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou na ethylen.

V *Arabidopsis thaliana* existuje pět různých receptorů: ETR1 (ethylene resistant 1), ETR2, ERS1 (ethylene response sensor 1), ERS2 a EIN4 (ethylene insensitive 4). Výsledkem interakce ethyleny s ETR1 receptorem je aktivace EIN2, který figuruje jako pozitivní regulátor transkripčních faktorů v jádře (Wang *et al.*, 2002).

Ethylen podněcuje zrání ovoce v období zvýšené respirace. Jeho koncentrace je až do počátku zrání konstantní, ale s počátkem zrání jeho množství náhle vzroste (Burg a Burg, 1965). Ethylen také urychluje stárnutí listů, což se projevuje jejich zežloutnutím (Zacarias a Reid, 1990). U *Arabidopsis thaliana* ethylen vyvolává růst kořenového vlášení na neobvyklých místech (Tanimoto *et al.*, 1995).

2.2 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou isoprenoidní nebo aromatické N⁶ substituované deriváty adeninu. Vyskytují se nejen v rostlinách, ale i v bakteriích, hmyzích škůdcích nebo houbách.

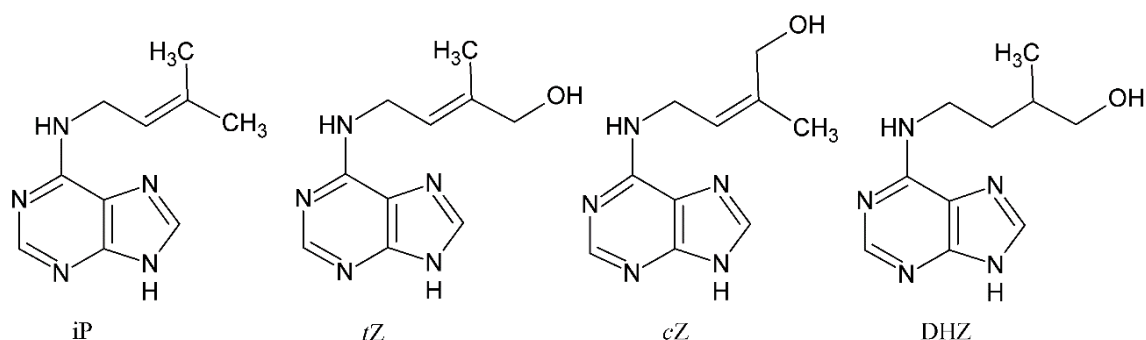
CK výrazně ovlivňují buněčné dělení, snižují apikální dominanci, řídí transportní procesy, oddalují senescenci listů nebo stimulují syntézu fotosyntetických barviv. (Pavlová a Fischer, 2011).

Hormonální aktivita CK je založena na principu dvoukomponentní signální dráhy. Skládá se ze sensorové histidinkinasy a regulátoru odpovědi. Při vazbě CK na receptor se spustí autofosforylace histidinkinasy s následným přenosem fosfátové skupiny na Asp residua regulátoru odpovědi. Signál se dále až do jádra buňky šíří stejným principem pomocí fosfotransferových proteinů (Hwang *et al.*, 2012).

2.2.1 Isoprenoidní cytokininy

2.2.1.1 Chemická struktura

Isoprenoidní cytokininy (ISCK) jsou ve většině organismů vázané v tRNA, ale v rostlinách existují i ve formě volných bází. Nejjednodušším zástupcem je N⁶-isopentenyladenin (iP). Hydroxylací postranního isopentenylového řetězce vznikají dva izomery: *cis* (*cZ*) a *trans*-zeatin (*tZ*). V dihydrozeatinu (DHZ) je násobná vazba hydroxylovaného isopentenylového řetězce redukována. Zmínění zástupci jsou zobrazeni na Obr. 3.



Obr. 3 Strukturální vzorce isoprenoidních cytokininů: N⁶-isopentenyladenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin (DHZ).

ISCK se vyskytují ve třech vzájemně přeměnitelných formách s rozdílnou biologickou aktivitou: volné báze, ribosidy (ribosa navázaná v poloze N⁹ purinového kruhu, Obr. 4) a nukleotidy (vazba fosfátu na ribose v pozici 5'). Glukosylací (Obr. 4) se ISCK přeměňují na inaktivní zásobní látky za vzniku O- a N-glukosidů (Yevdakova *et al.*, 2008).

2.2.1.2 Biosyntéza

Biosyntéza ISCK (Obr. 4) spočívá v přenosu isopentenylového řetězce na adenin. Dosud byly objeveny dvě dráhy: *de novo* biosyntéza a degradace tRNA. V obou případech jsou vzniklé nukleotidy aktivovány odštěpením fosforibosylové skupiny fosforibohydrolasou „lonely guy“ (LOG, Kurakawa *et al.*, 2007).

Při *de novo* biosyntéze enzym adenylát-isopentenylyltransferasa (IPT, EC 2.5.1.27) katalyzuje přenos isopentenylového řetězce na nukleotidy adeninu: ATP, ADP nebo AMP (Kakimoto, 2001).

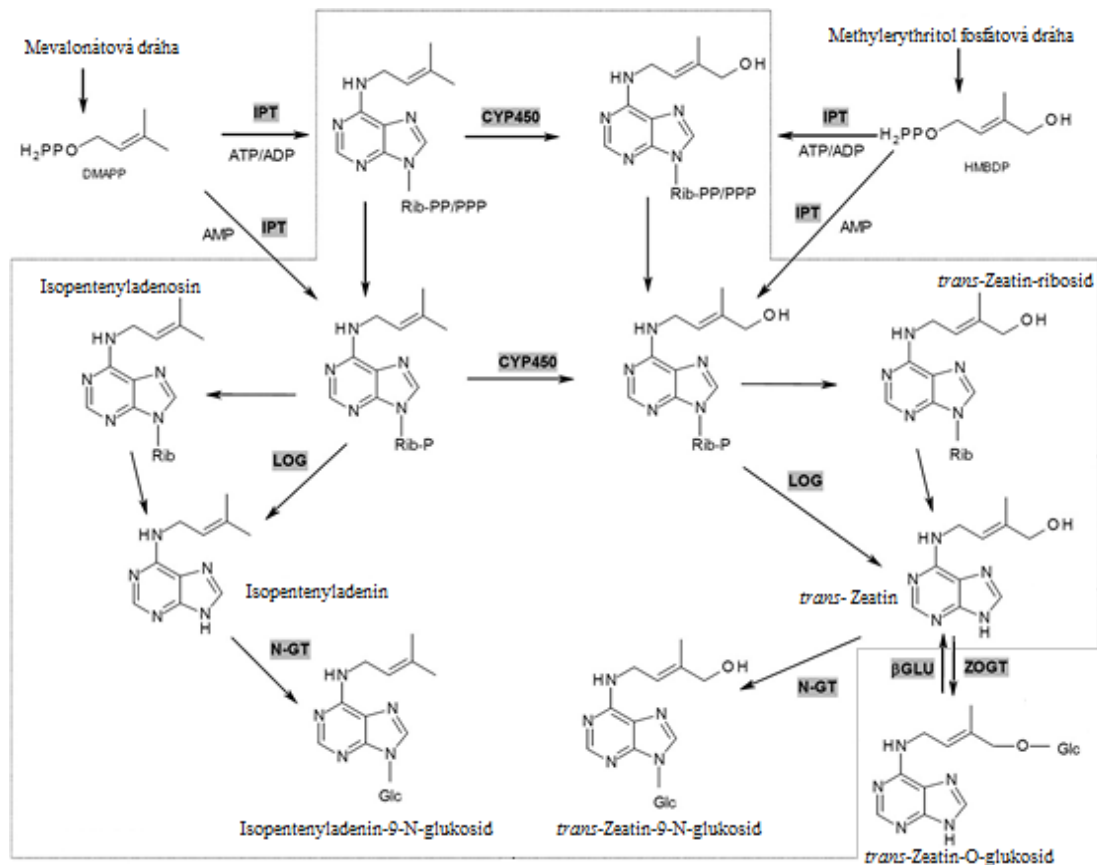
tRNA obsahuje velké množství modifikovaných nukleotidů, mezi které patří i ISCK. Jsou umístěny na pozici 37 antikodonového ramena takových tRNA, které rozpoznávají kodony začínající uracilem (UNN). Po prenylaci probíhající za účasti enzymu tRNA-isopentenylyltransferasa (tRNA-IPT, EC 2.5.1.75) dochází k degradaci tRNA a uvolnění CK nukleotidů (Chen, 1997).

2.2.1.3 Původ isopentenylového řetězce

Isopentenylový řetězec pochází ze dvou různých drah: mevalonátové (MVA) a methylerythritol fosfátové dráhy (MEP).

Při MVA nejdříve kondenzují tři molekuly acetyl-CoA, které se redukují na mevalonát. Vzniklý mevalonát je dvakrát fosforylován na mevalonát-5-difosfát, následuje přeměna přes isopentenyldifosfát na dimethylallyl difosfát (DMAPP).

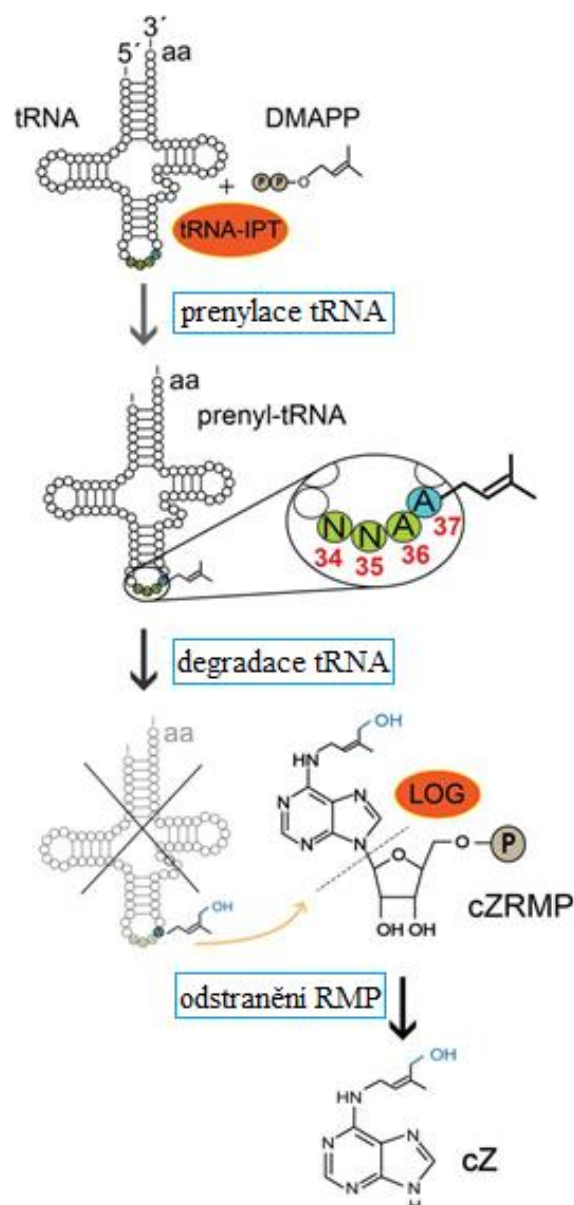
MEP je založená na kondenzaci pyruvátu s glycerinaldehyd-3-fosfátem za tvorby 1-deoxy-D-xylulose-5-fosfátu, reakce pokračuje na methylerythritol fosfát. Konjugací s cytidinfosfátem, fosforylací a cyklizací vzniká (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP, Rohmer *et al.*, 1993). DMAPP a HMBDP působí jako CK prekurzory.



Obr. 4 Biosyntéza *N*⁶-isopentenyladeninu, *trans*-zeatinu a jejich přeměna na nukleosidy s vyznačenými enzymy (upraveno a převzato z Frébort *et al.*, 2011). DMAPP (dimethylallyl difosfát), HMBDP ((*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát), IPT (adenylát-isopentenyltransferasa), CYP450 (cytochrom P450 monoxygenasa), LOG (fosforibohydrolasa „lonely guy“), N-GT (N-glukosyltransferasa, EC 2.4.1.118), β-GLU (β-glukosidasa, EC 3.2.1.21), ZOGT (zeatin-O-glukosyltransferasa, EC 2.4.1.203).

2.2.1.4 Původ zeatinu

V případě, že je *trans*-zeatin syntetizován přes iP a jeho následnou hydroxylací enzymem cytochrom P450 monoxygenasa (EC 1.14.14.1), jedná se o dráhu závislou na iP. Co se týče dráhy nezávislé na iP, zde je tZ produkován přímým přenosem hydroxylovaného řetězce z HMBDP prekursoru na nukleotidy adeninu. Biosyntéza cZ (Obr. 5) je zatím vysvětlena pouze degradací tRNA (Miawaki *et al.*, 2006).



Obr. 5 Syntéza *cis*-zeatinu (*cZ*, převzato z Hrtyan *et al.*, 2015). tRNA-isopentenyltransferasa (tRNA-IPT) katalyzuje přenos dimethylallyl difosfátu (DMAPP) na pozici A37 v tRNA za tvorby prenyl-tRNA. Degradací se uvolní *cis*-zeatin ribosid monofosfát (cZRMP), který je působením lonely guy (LOG) enzymem a odstraněním ribosylmonofosfátu (RMP) přeměněn na *cZ*.

2.2.2 Aromatické cytokininy

Aromatickým cytokininům (ARCK) byla v historii věnována menší pozornost pravděpodobně kvůli nižšímu zastoupení v rostlinách a také proto, že byly až do objevu topolinů považovány za čistě syntetické látky. Název topolin je odvozen od topolu, z něhož byly poprvé izolovány.

Obecně ARCK mají větší vliv na metabolismus a růstové procesy, především morfogenezi a senescenci. Naopak ISCK výrazněji regulují růstové procesy zahrnující stimulaci buněčného cyklu (Holub *et al.*, 1998).

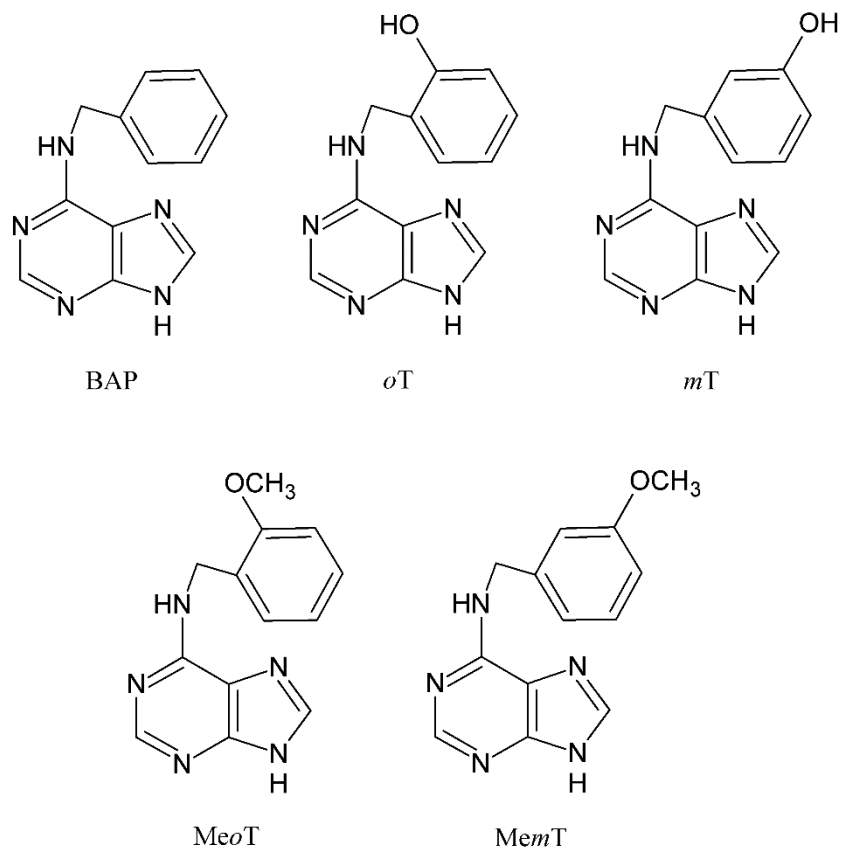
2.2.2.1 Chemická struktura

Základním ARCK je 6-benzyladenin (BA). *Meta*-topolin (*mT*, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin) a *ortho*-topolin (*oT*, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin) se řadí mezi hydroxylované deriváty BA. V přírodě se vyskytují i jejich N⁹-substituované deriváty (Strnad *et al.*, 1992; Strnad *et al.*, 1997).

Mezi přírodní ARCK se také řadí methoxyderiváty BA a jejich 9-β-D-ribofuranosidy. Jedná se o *ortho*-methoxytopolin (*MeoT*, 6-(2-methoxybenzylamino)purin) a *meta*-methoxytopolin (*MemT*, 6-(3-methoxybenzylamino)purin, Tarkowská *et al.*, 2003). Nejdůležitější strukturní vzorce ARCK jsou znázorněny na Obr. 6.

2.2.2.2 Biosyntéza

Biosyntéza ARCK nebyla dosud objasněna, ale z chemické struktury vyplývá, že je v porovnání s ISCK odlišná. Díky přítomnosti aromatického jádra je možné, že má původ v metabolismu fenolů (Strnad 1997).



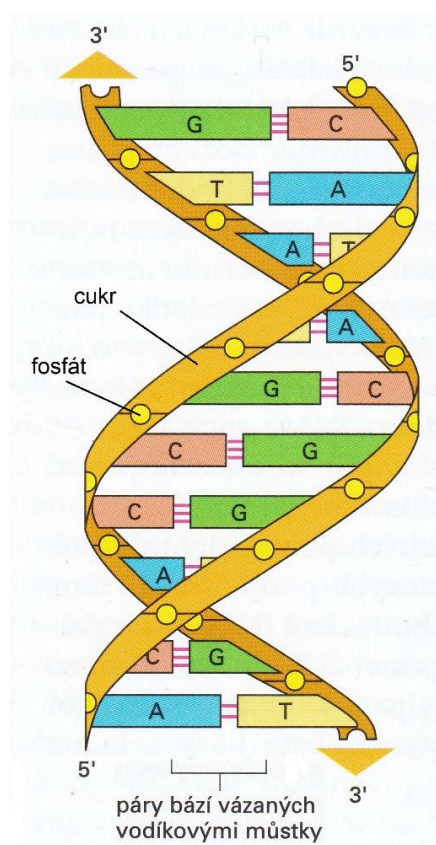
Obr. 6 Strukturní vzorce aromatických cytokininů: 6-benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (*o*T), *meta*-topolin (*m*T), *ortho*-methoxytopolin (MeoT) a *meta*-methoxytopolin (MemT).

2.3 DNA

Veškerá genetická informace každého živého organismu je určena genomem, který se skládá z genů. Geny, jakožto funkční jednotky definované sekvencí deoxyribonukleové kyseliny (DNA), jsou zodpovědné za produkci specifických proteinů. Sekvence genu se přepíše do sekvence ribonukleové kyseliny (RNA), která v mnoha případech umožní expresi proteinu s definovanou funkcí (Lewin, 2008a).

2.3.1 Struktura

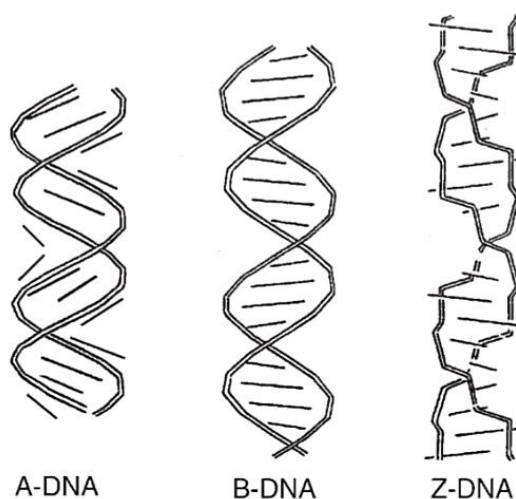
Molekula DNA (Obr. 7) je dvoušroubovice skládající se ze dvou antiparalelních polynukleotidových řetězců, které se obtáčejí okolo společné osy. Každý řetězec tvoří cukr-fosfátovou vnější kostru s purinovými a pyrimidinovými bázemi kolmými na osu dvoušroubovice. Jednotlivé nukleotidy spojené 3',5'-fosfodiesterovou vazbou obsahují sacharid 2-deoxyribosu, na který je glykosidovou vazbou vázána dusíkatá báze.



Obr.7 Molekula DNA se schematicky vyznačenými stavebními podjednotkami (převzato z Alberts *et al.*, 1998). DNA je tvořena čtyřmi typy nukleotidů (A - adenin, G – guanin, C – cytosin, T – thymin), které jsou kovalentně spojené s cukr-fosfátovou páteří. Molekula se vyskytuje v podobě dvoušroubovice, kterou tvoří dva antiparalelní polynukleotidové řetězce spojené vodíkovými můstky mezi bázemi.

Struktura dvoušroubovice je umožněna spojením vláken přes vodíkové můstky na základě komplementarity bází. V DNA se vyskytují báze purinového a pyrimidinového typu. Mezi purinové báze patří adenin (A) a guanin (G), mezi pyrimidinové cytosin (C) a thymin (T). A a T se spojují za tvorby dvou vodíkových můstků, naopak G a C vytvářejí vodíkové můstky tři. Z toho vyplývá, že pokud známe sekvenci jednoho vlákna, můžeme pomocí párování bází určit sekvenci vlákna druhého (Watson a Crick, 1953).

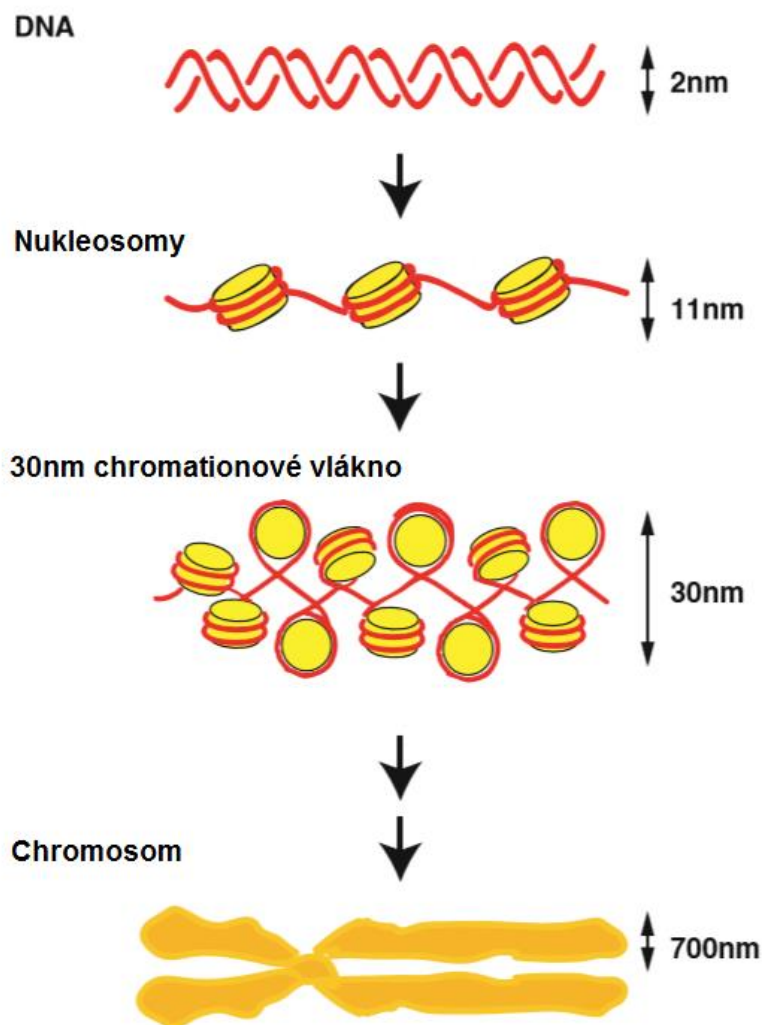
Šroubovice DNA nabývá nejméně tří konformací: A-DNA, B-DNA a Z-DNA (Obr. 8). Ve fyziologických podmínkách se nejčastěji vyskytuje pravotočivá B-DNA o průměru 20 Å, kde mezi jednotlivými bázemi je vzdálenost 3,30-3,37 Å a 10-10,5 bází vychází na jednu otočku. Je možné pozorovat dva žlábků, velký a malý, které se liší šířkou, ale jsou stejně hluboké. V komplexech DNA-protein nebo v silně dehydratovaném prostředí lze pozorovat pravotočivou A-konformaci s průměrem 23 Å, 11-12 bázemi na otočku, kde je mezi nimi vzdálenost 2,59-3,29 Å. Co se týče žlábků, velký žlábek je hluboký a úzký, naopak malý žlábek je široký a mělký. Z-DNA je stabilní pouze v prostředí s vysokou koncentrací solí. Z-konformace je levotočivá, o průměru 18 Å s 12 bázemi na otočku a vzdáleností mezi bázemi 3,7 Å. V Z-DNA je pozorovatelný jenom jeden typ žlábků analogickému k malému žlábků B-konformace (Harteis a Schneider, 2014).



Obr. 8 Konformace šroubovice DNA (převzato z Maiti a Kumar, 2007). Pravotočivou A-DNA o průměru 23 Å lze pozorovat v silně dehydratovaném prostředí. Za běžných podmínek se nejčastěji vyskytuje pravotočivá B-DNA o průměru 20 Å. Levotočivá Z-DNA s průměrem šroubovice 18 Å je stabilní v prostředí o vysoké koncentraci soli.

Živé organismy obsahují molekulu DNA ve třech různých formách: lineární, cirkulární a v podobě nadšroubovice (supercoiling, superhelix). Zmíněné topologie se mohou měnit v závislosti na vnějších podmínkách, nicméně ve většině případů dochází ke vzniku nadšroubovicového vinutí, díky kterému se molekula zmenší (Weil a Vinograd, 1963). Supercoiling je řízen pomocí enzymů topoizomeras. U prokaryot je běžná DNA gyrasa (EC 5.99.1.3), která za hydrolýzy ATP umožní tzv. negativní supercoiling (nadšroubovice se odvíjí v opačném směru jak původní šroubovice). Naopak za nepřítomnosti ATP vzniká pozitivní supercoiling (nadšroubovice se odvíjí ve stejném směru jako původní šroubovice, Liu a Wang, 1978).

DNA eukaryotických buněk se skládá pomocí proteinů histonů za vzniku chromatinu (Obr. 9). Základní jednotkou struktury je nukleosom skládající se ze 147 bp DNA obtočené okolo oktamerního histonového jádra, které obsahuje histony označené H2A, H2B, H3 a H4. Jednotlivé nukleosomy jsou spojené volnými 20 bp úseky DNA (linker DNA), které chrání histon H1. H1 je přítomen v menším množství a není přímou součástí jádra. Vytváří „svorku“, která zabezpečuje interakci mezi DNA a histony, čímž stabilizuje celou strukturu. Podílí se také na vytvoření vyšších struktur chromatinu, kdy se předpokládá existence tzv. „30 nm vlákna“. Jedná se o běžný helix o průměru zhruba 30 nm s šesti nukleosomy na otočku. Pozorování 30 nm vlákna *in vivo* se zatím podařilo v jádrech spermií hvězdice (*Patiria miniata*) a kuřecích erytrocytech. Chromatin se dále skládá, dochází k větší kompresi molekuly DNA, až při buněčném dělení lze pozorovat zcela spiralizovaný chromatin – chromosomy (Horowitz *et al.*, 1994; Zlatanova *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2006).



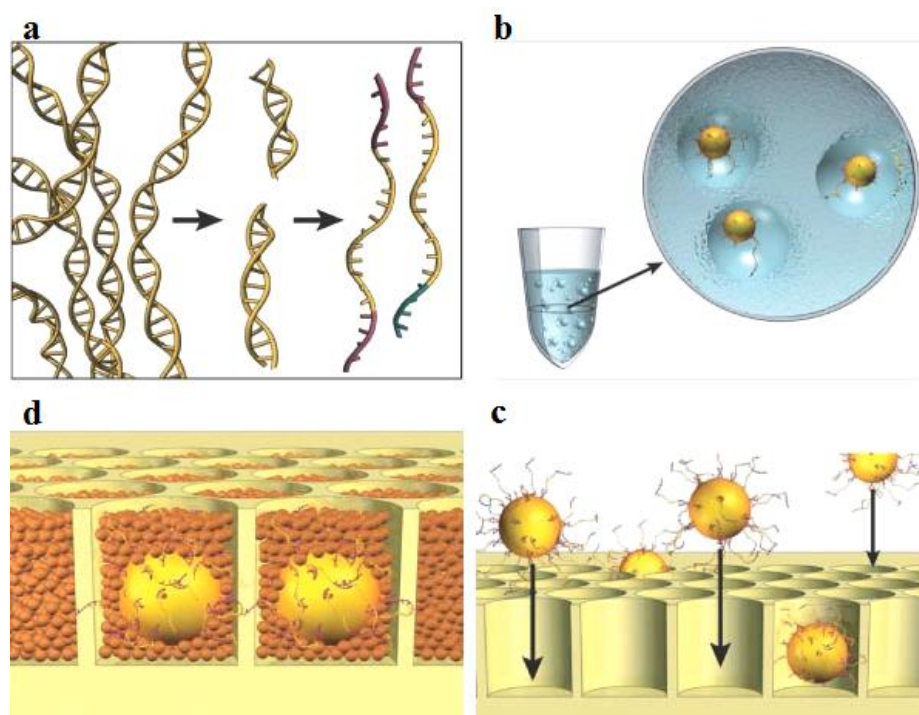
Obr. 9 Struktura chromatinu (převzato z Maeshima a Eltsov, 2008). Molekula DNA o průměru 2 nm je obtočená okolo oktamerního histonového jádra skládající se z histonů H2A, H2B, H3 a H4 za formace nukleosomu. Nukleosomy jsou pravděpodobně poskládané ve 30nm vlákno a další kompresí vzniká chromosom.

2.3.2 Metody sekvenování DNA

Cílem sekvenování je stanovení pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Klasická Sangerova metoda je založená na principu reakce DNA polymerasy (EC 2.7.7.7), kde stanovená sekvence je komplementární k původní sekvenci. Reakční směs obsahuje mimo normálních deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) i 2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP), který po začlenění do rostoucího řetězce DNA plní funkci koncového inhibitoru. Provádí se čtyři na sobě nezávislé reakce, pokaždé s jiným typem ddNTP a sekvence se stanoví elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (Sanger *et al.*, 1977).

Maxamova-Gilbertova metoda stanoví sekvenci značeného jednořetězcového fragmentu pomocí chemických činidel, které specificky modifikují jeden nebo dva typy bází ve čtyřech vzorcích. Dimethylsulfát způsobuje na guaninu metylaci dusíku N⁷ a na adeninu dusíku N³, kde výsledkem je zvýšená citlivost řetězce ke štěpení při vysoké teplotě piperidinem. V případě bází pyrimidinového typu je řetězec atakován hydrazinem. Jednotlivé fragmenty jsou rozděleny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a autoradiograficky detekovány (Maxam a Gilbert, 1977).

Mezi novější postupy se řadí pyrosekvenování založené na určení sekvence syntézou DNA v reálném čase. K reakční směsi s DNA polymerasou se postupně přidávají jednotlivé dNTP. Pokud dojde k začlenění nukleotidu, uvolní se difosfát, který je za přítomnosti adenosin-5'-fosfosulfátu ATP sulfurylasou (EC 2.7.7.4) převeden na ATP. Enzym luciferasa (EC 1.13.12.7) využívající luciferin a ATP jako substráty způsobí uvolnění světelného kvanta, které lze zaznamenat detektorem a jehož intenzita je úměrná počtu přidaných bází. Na konci každého cyklu enzym apyrasa (EC 3.6.1.5) degraduje přebytečné nukleotidy (Ronaghi *et al.*, 1996). Pyrosekvenování využívá technologie 454 firmy Roche (Obr. 10). Izolovaná molekula DNA je štěpena na jednořetězcové fragmenty, jejichž konce jsou ošetřeny adaptérovými sekvencemi. Adaptéry se liší nukleotidovým složením, z nichž jeden se vyznačuje přítomností biotinu umožňující vazbu fragmentu na streptavidinovou kuličku. Poměr streptavidinových kuliček a fragmentů je upraven tak, aby jedna kulička nesla pouze jedno vlákno DNA. Následně jsou jednotlivé kuličky zachyceny v kapkách olejové emulze, kde proběhne amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Po odstranění oleje a denaturaci DNA vláken se kuličky vpraví do jamek pikotitrační destičky. Do každé jamky se navíc přidají menší kuličky s imobilizovanými enzymy pro pyrosekvenování. Destička se opakovaně promývá každým se čtyř dNTP a CCD (charge-coupled device) senzor zachycuje emitované fotony z každé jamky (Margulies *et al.*, 2005).

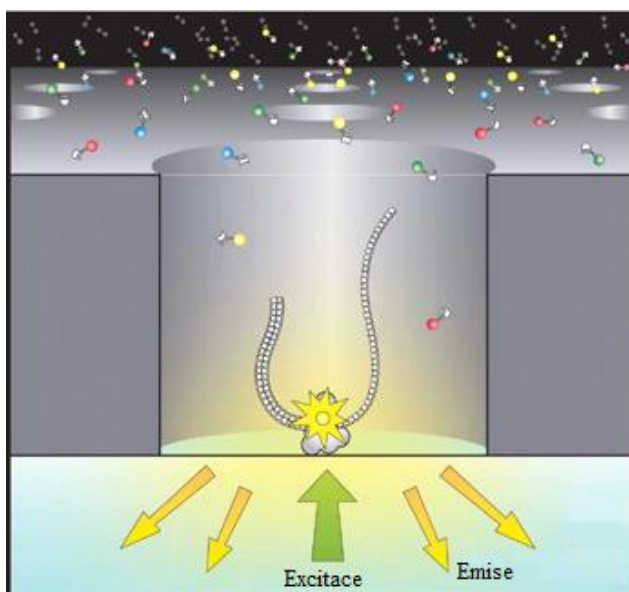


Obr. 10 Technologie 454 (převzato z Margulies *et al.*, 2005). Izolovaná DNA je fragmentována, denaturována a konce vláken jsou označeny adaptéry (a). Vždy jedno vlákno je navázáno na povrch streptavidinové kuličky a v olejové emulzi proběhne PCR (b). Po odstranění emulze a denaturaci DNA jsou kuličky vpraveny do pikotitrační destičky (c) spolu s enzymy pro pyrosekvenování imobilizovanými na povrchu menších kuliček (d).

Illumina (Solexa) sekvenování je obdobně jako pyrosekvenování založené na sekvenaci DNA její syntézou. Jednořetězcové fragmenty izolované genomové DNA jsou přichycené adaptéry k povrchu reakční komory tak, že formují můstek. Následuje „můstková“ PCR za tvorby klastrů. Odštěpením jednoho adaptéru jsou fragmenty linearizovány a denaturací DNA vznikají templáty připravené pro sekvenování. Užívá se sada čtyř reversibilních terminátorů 3'-O-azidomethyl-2'-deoxynukleosidtrifosfátů (A,C,G a T), kdy je každý značen jiným fluoroforem. Po inkorporaci terminátoru v každém cyklu se detekuje báze ozářením laserem s následnou fluorescencí. Přídavek tris(karboxyethyl)fosfinu uvolní fluorofor a regeneruje 3'-hydroxylovou skupinu (Bentley *et al.*, 2008).

Technologie 454 a Illumina se řadí do kategorie sekvenování druhé generace vyznačující se amplifikací fragmentů DNA před vlastní sekvenací. Technologie single-molecule sekvenování neboli sekvenování třetí generace nevyžaduje amplifikační krok, což zkracuje dobu analýzy. Technologie SMRT (single-molecule real-time) firmy Pacific Biosciences určí sekvenci syntézou molekuly DNA v reálném čase (Obr. 11). Měření probíhá na destičce s tisíci jamkami nanofotonické struktury. Detekce probíhá pomocí vlnovodu nultého módu (zero-mode waveguide, ZMW). Jednotlivé dNTP jsou

značené rozdílnými fluorofory. Na dně každého ZMW je vázána DNA polymerasa s jedinou molekulou DNA. Dno ZMW je ozařováno laserem a při zabudování komplementární báze se sleduje fluorescenční signál (Eid *et al.*, 2009).



Obr. 11 Uspořádání technologie SMRT (převzato z Eid *et al.*, 2009). Samotná molekula DNA je společně s DNA polymerasou vázána na dně vlnovodu nultého módu ozařovaného laserem. Při vazbě značeného dNTP se detekuje fluorescence.

2.4 RNA

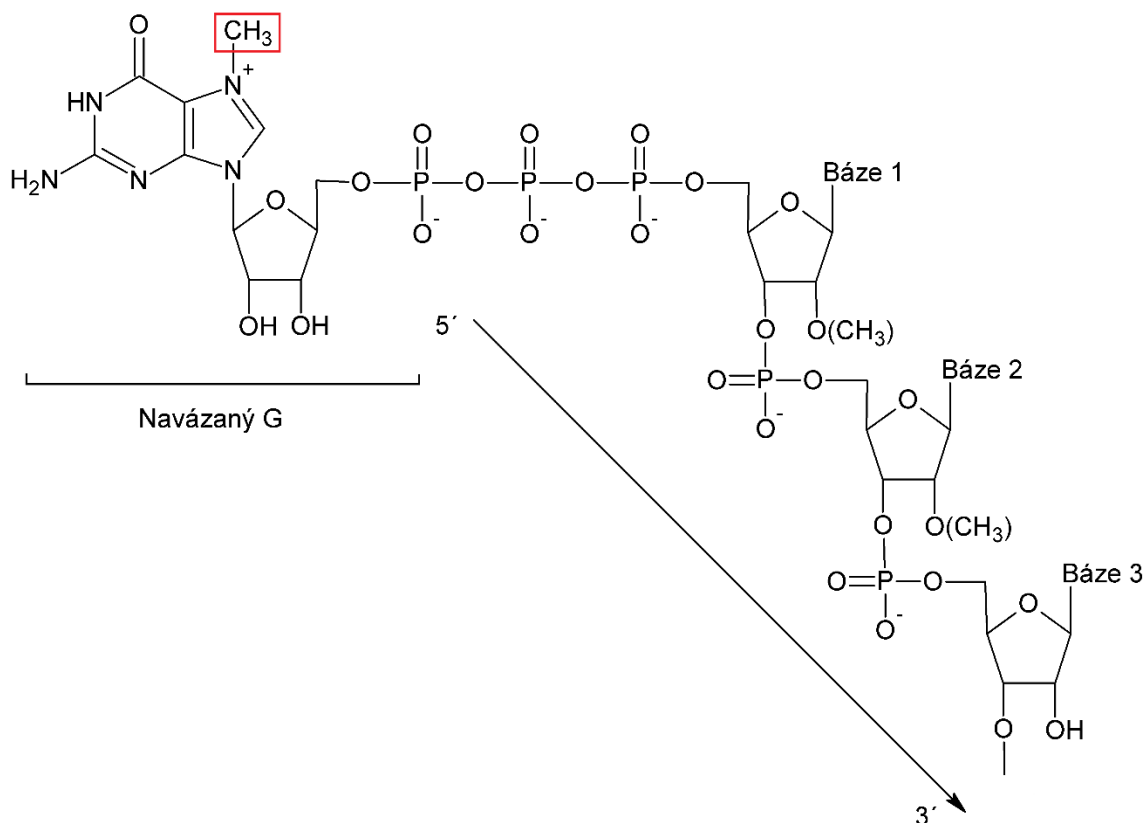
Ribonukleová kyselina (RNA) je svým vzhledem velmi podobá DNA, nicméně se liší sacharidem, bází a strukturou. Sacharidovou složku zastupuje ribosa, thymin je nahrazen uracilem a ve většině případů je RNA jednořetězcová. Díky komplementaritě bází může řetězec nabývat různých trojrozměrných struktur, na základě kterých má RNA různé funkce. RNA hraje důležitou roli v genové expresi, která je řízena třemi hlavními třídami RNA. Mediátorová RNA (mRNA) přenáší kopii sekvence DNA představující funkční protein. Ribosomální RNA (rRNA) se podílí na složení a funkci ribosomu. Transferová RNA (tRNA) přenáší aminokyseliny do ribosomu v průběhu translace (Lewin, 2008b).

2.4.1 Transkripce

Transkripce zahrnuje přepsání genetické informace z DNA na RNA. Při zahájení transkripce (iniciace) dochází k rozvolnění chromatinové struktury a dvoušroubovice DNA a rozpoznání specifické sekvence promotoru pomocí transkripčních faktorů. Klíčovým enzymem reakce je RNA polymerasa (EC 2.7.7.6), která se váže na promotor a katalyzuje na základě komplementarity prodlužování RNA řetězce (elongace) za vzniku primárních transkriptů, které jsou dále upravovány. Ukončení transkripce neboli terminace vede k uvolnění RNA a celého transkripčního komplexu z DNA (Bischler *et al.*, 2002).

2.4.2 Mediátorová RNA

Produktem transkripce v eukaryotních buňkách je pre-mRNA podléhající řadě ko- nebo posttranskripčních úprav, bez kterých by nemohla být exportována z jádra do cytoplazmy a translatována. Mezi úpravy mRNA se řadí především polyadenylace, RNA capping nebo splicing. Polyadenylace spočívá v posttranskripčním přidání polyadenylového řetězce na 3'-konec pre-mRNA pomocí multipodjednotkového proteinového komplexu. Syntézu poly(A) konce a jeho vazbu na pre-mRNA zajišťuje enzym poly(A) polymerasa (EC 2.7.7.19). K reakci jsou nutné mimo jiné poly(A)-vazebné proteiny ochraňující mRNA před degradací (Wahle *et al.*, 1991).



Obr. 12 Chemická struktura čepičky (převzato z Cougot *et al.*, 2004). DNA capping spočívá v navázání GTP na 5'-konec řetězce ve směru opačném oproti ostatním nukleotidům za tvorby 5'-5' anhydridové vazby. Následuje methylace v N^7 pozici (červený rámeček).

Při transkripci bývá iniciačním nukleotidem ATP nebo GTP, ze kterého se odštěpuje jeden fosfát, a na takto ošetřený konec enzym guanylyltransferasa (EC 2.7.7.50) katalyzuje přenos GTP za vytvoření 5'-5' anhydridové vazby. Navázaný nukleotid je opačně orientován oproti ostatním nukleotidům v řetězci. Následuje methylace v N^7 pozici terminálního guaninu. Popsaný mechanismus se označuje pojmem RNA capping (Obr. 12), neboli přidání čepičky (Ensinger *et al.*, 1975). RNA capping a polyadenylace stabilizují molekulu mRNA, umožňují její transport do cytoplazmy a rozpoznání translačním aparátem.

Exony (protein kódující sekvence) jsou v primárním transkriptu přerušeny introny (nekódující sekvence), které je nutné vystříhnout procesem zvaným splicing. Sestřihové místo je definováno specifickou sekvencí v blízkosti hranice mezi intronem a exonem; 5'-konec intronu obsahuje sekvenci GU, 3'-konec AG. Sestřihová místa jsou rozpoznána malými jadernými ribonukleoproteinovými částicemi (snRNP), které ve spojení s dalšími proteiny tvoří velký komplex nazvaný spliceosom zajišťující všechny procesy sestřihu (Krämer, 1996).

2.4.3 Translace

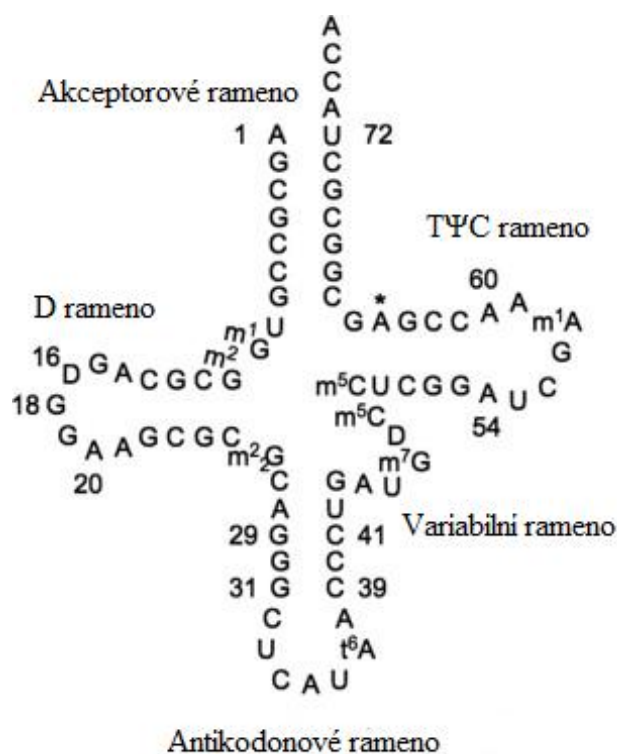
Translace vyjadřuje proces, při kterém je ze sekvence m-RNA syntetizován polypeptidový řetězec. V eukaryotických organismech 40S ribosomální podjednotka při iniciaci rozpoznává 5'-konec mRNA a pohybuje se směrem k iniciačnímu místu obsahující startovací AUG kodon. Nakonec se připojí 60S ribosomální podjednotka. Jedná se o komplexní interakci řízenou řadou iniciačních faktorů. Syntéza začíná vazbou iniciační tRNA_i^{Met} na mRNA a následuje elongační fáze, která zahrnuje čtení jednotlivých kodonů (trojice nukleotidů) a za hydrolyzy GTP syntézu peptidových vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami transportovanými tRNA do ribosomu. Při terminaci terminační faktory rozpoznávají stop kodon, polypeptidový řetězec se hydrolyzou uvolňuje a translační komplex se rozpadá (Jackson *et al.*, 2010).

2.4.4 Ribosomální RNA

Ribosomální RNA se podílí na struktuře ribosomu a má katalytickou funkci při syntéze peptidové vazby. Ribosomy jsou kompaktní ribonukleoproteinové částice skládající se ze dvou podjednotek lišící se velikostí. Eukaryotní ribosomy jsou velké 80S a v případě *Saccharomyces cerevisiae* 40S malá podjednotka obsahuje 18S rRNA a 32 ribosomálních proteinů a velká podjednotka je složená z 25S, 5,8S a 5S rRNA a 45 ribosomálních proteinů. Malá podjednotka je zodpovědná za dekodující proces, kde na základě sekvence mRNA vybírá vhodnou aminoacyl-tRNA. Velká podjednotka katalyzuje za účasti peptidyltransferasy (EC 2.3.2.12) tvorbu peptidové vazby a obsahuje tři vazebná místa: A, P a E. Na A místo se váže aminoacyl-tRNA, P místo nese peptidyl-tRNA a dochází mezi nimi k tvorbě peptidové vazby. Peptidyl-tRNA prodloužená o jednu aminokyselinu se nachází v A místě, nastává translokace ribosomu a deacylovaná tRNA opouští ribosom z E místa a peptidyl-tRNA se posouvá do P místa (Spahn *et al.*, 2001).

2.4.5 Transferová RNA

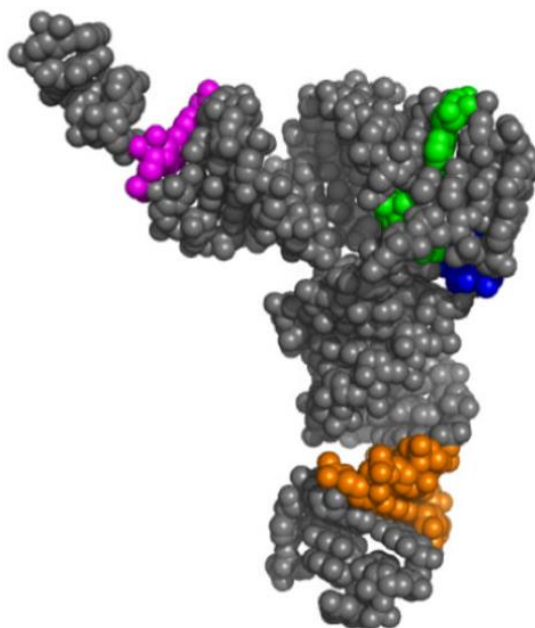
Transferová RNA je obvykle 74-95 nukleotidů dlouhá a její sekvence umožňuje párování bází a vytvoření sekundární struktury ve tvaru jetelového listu (Obr. 13). Číslování bází začíná od 5' konce, čímž lze definovat polohu jednotlivých nukleotidů. Komplementární párování bází formuje ramena: antikodonové, D, akceptorové, TΨC a variabilní. Antikodonové rameno obsahuje antikodonovou smyčku s antikodonovým tripletem, který definuje transportovanou aminokyselinu a komplementárně se váže ke kodonu



Obr. 13 Sekundární struktura tRNA (převzato z Kolitz a Lorsch, 2010). Sekundární struktura ve tvaru jetelového listu je umožněna komplementaritou bází. Antikodonové rameno obsahuje antikodon, který umožňuje interakci s mRNA. Pro D rameno je typický výskyt dihydrouridinových bází, naopak v TΨC rameni je modifikovaná báze pseudouridin. Na akceptorové rameno se vážou aminokyseliny.

na mRNA při translaci. V D rameni se vyskytují dihydrouridinové báze. Akceptorové rameno se skládá z nespárované sekvence na 3'-konci obsahující volnou 2' nebo 3' hydroxylovou skupinu ribosy, přes kterou váže aminokyseliny. Obecně platí, že pro každou aminokyselinu existuje minimálně jedna tRNA. Jednotlivé tRNA se popisují třípísmennou zkratkou aminokyselin, které přenáší, např. tRNA^{Ala}. Název TΨC ramena je odvozen od přítomné sekvence, kde Ψ představuje pseudouridinovou bázi. Variabilní rameno se vyznačuje různým počtem nukleotidů. Terciární sktruktura (Obr. 14) má tvar písmene L a je uskutečněna pomocí vodíkových můstků (Lewin, 2008b).

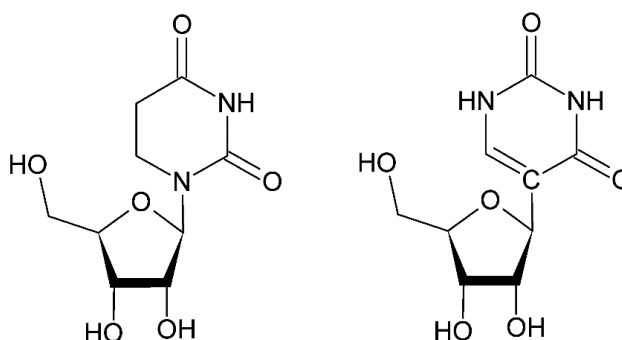
Transferové RNA lze rozdělit podle funkce na iniciační a elongační. Iniciační tRNA pouze přenáší iniciační aminokyselinu methionin a jako jediné se vážou přímo do P místa. Naopak elongační tRNA se podílí na prodlužování polypeptidového řetězce. Iniciační tRNA se vyznačuje specifickou sekvencí v různých místech řetězce. V případě *Saccharomyces cerevisiae* se iniciační tRNA odlišuje od elongační v nukleotidech A1:U72, A54, A60 a přítomností tří GC v antikodonovém rameni (Kolitz a Lorsch, 2010).



Obr. 14 Terciární struktura tRNA (převzato z Kolitz a Lorsch, 2010). Terciární struktura má tvar písmene L a je umožněna pomocí vodíkových můstků.

Aminoacyl-tRNA synthetasa (EC 6.1.1.–) způsobuje aktivaci tRNA ve dvou krocích. Nejdříve katalyzuje syntézu vysokoenergetické vazby mezi ATP a příslušnou aminokyselinou s následným transferem aminokyseliny na volnou 2' nebo 3' hydroxylovou skupinu ribosy 3'-konce tRNA. V buňce se vyskytuje nejméně 20 druhů aminoacyl-tRNA synthetas, z čehož vyplývá, že pro každou aminokyselinu existuje specifický enzym (Tukalo *et al.*, 2013).

Nedílnou součástí tRNA jsou modifikované nukleotidy, které ovlivňují přesnost translace, udržují správný čtecí rámec a strukturu tRNA nebo umožňují rozpoznání tRNA aminoacyl-tRNA synthetasou. Většina modifikujících enzymů jsou specifické a zavádějí změny na určitých pozicích. Dihydrouridin syntasa (EC 1.3.1.91) redukuje dvojné vazby v pozici 5 a 6 uridinu za vzniku dihydrouridinu (Obr. 15). Předpokládá se, že dihydrouridin destabilizuje konformaci a zvyšuje flexibilitu tRNA (Bishop *et al.*, 2002). Pseudouridin (Obr. 15) je izomer uridinu vznikající rotací uracilového kruhu za přítomnosti enzymu pseudouridin synthasy (EC 5.4.99.–; Raychaudhuri *et al.*, 1999). Mezi další modifikace se řadí například methylace, thiolace, karboxylace, hydroxylace nebo vazba báze s isopentenyladeninem nebo lysinem (<http://modomics.genesilico.pl/modifications/>).



Obr. 15 Chemická struktura dihydrouridinu (vlevo) a pseudouridinu (vpravo).

2.4.5.1 Cytokininy v tRNA

Cytokininy jakožto modifikované adeniny lze v tRNA nalézt u rostlin, živočichů a většiny mikroorganismů s výjimkou Archea. Jsou situované v pozici 37 určitých tRNA vedle antikodonu vázající se na kodony začínající U (Golovko *et al.*, 2002). Enzym tRNA-isopentenyltransferasa katalyzuje prenylaci adeninu v pozici 37 (kap. 2.2.1.2).

V mikroorganismech navázaný cytokinin, především N⁶-isopentenyladenosin (iPR), má vliv na přesnost a účinnost translace. Například u *Escherichia coli* iPR zvyšuje přesnost syntézy proteinů tak, že stabilizuje kodon-antikodonovou interakci (Konevega *et al.*, 2006). iPR, jediný CK savčí tRNA, je důležitý pro účinné dekódování UGA kodonů u selenocysteinové tRNA (Warner *et al.*, 2000).

Volné CK představují skupinu důležitých rostlinných hormonů regulující především buněčné dělení a diferenciaci (kap. 2.2). Jejich biosyntéza probíhá buď *de novo* anebo degradací tRNA (kap. 2.2.1.2). Rostlinná tRNA obsahuje mimo iPR například i *trans* a *cis*-zeatin ribosid a jejich 2-methylthio deriváty. Kromě udržování celkové homeostáze CK nebyla funkce CK v tRNA dosud objasněna, ale je možné, že také ovlivňují translaci (Atanasova, 2011).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Agarosa (Sigma-Aldrich, USA)

Amoniak (Merck Millipore, Německo)

Cytokininové standardy (OlChemIm, Česká republika)

Diethylpyrokarbonát (DEPC, Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)

Ethidium bromid (95%, Thermo Fisher Scientific, USA)

Fenol pH 8,0 (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

Hydrogenuhlíčitán sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid zinečnatý (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina chloristá (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina mravenčí (PanReac AppliChem, Německo)

Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)

Methanol (Sigma-Aldrich, USA)

m-Kresol (Sigma-Aldrich, USA)

Nanášecí pufr DNA Gel Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific, USA)

N,N-Dimethylformamid (DMF, Sigma-Aldrich, USA)

Nukleasa P1 z *Penicillium citrinum* (Sigma-Aldrich, USA)

Nukleasa S1 z *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, USA)

Octan draselný (Sigma-Aldrich, USA)

Octan sodný trihydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Octan zinečnatý (Lach-Ner, Česká republika)

Termosensitivní alkalická fosfatasa FastAP (Thermo Fisher Scientific, USA)

Tris-acetát-EDTA pufr 50x koncentrovaný (TAE, VWR International, USA)

Tris báze (Sigma-Aldrich, USA)

Velikostní marker GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko)

Box laminární SCS 2-4 (Merci, Česká republika)

Centrifuga Jouan BR4i (Thermo Fisher Scientific, USA)

Centrifuga Microspin 12 (Biosan, Litva)

Centrifugační koncentrátor CentriVap (Labconco, USA)

Gel Doc EZ system (Bio-Rad, USA)

Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 2,1 \times 100 mm (Waters, USA)

LC-MS systém LC-MS-8050 (Shimadzu, Japonsko)

Magnetická míchačka s ohřevem MSH-300 (Biosan, Litva)

Multi-Vortex V-32 (Biosan, Litva)

pH-metr CX505 (Elmetron, Polsko)

Pipety (Eppendorf, Německo)

Programovatelný rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Litva)

SPE kolony Bond Elut C18 100 mg (Agilent Technologies, USA)

SPE kolony Oasis MCX 6 cc 150 mg (Waters, USA)

Spektrofotometr DS-11 (DeNovix, USA)

Vakuový koncentrátor Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)

3.1.3 Biologický materiál

Listy topolů (* – různé stromy)

	Datum sběru	Čas sběru
<i>Populus alba</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus</i> × <i>berolinensis</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus</i> × <i>canadensis</i> * (starý)	1. 7. 2015	9:00
<i>Populus</i> × <i>canadensis</i> * (starý)	17. 6. 2015	9:00
<i>Populus</i> × <i>canescens</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus deltoides</i> (starý)	8. 7. 2015	9:00
<i>Populus deltoides</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00-11:00 (po 2 hodinách)
<i>Populus</i> × <i>euroamericana</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus laurifolia</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus maximovichi</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus nigra</i> (starý)	8. 7. 2015	9:00
<i>Populus nigra</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus nigra italica</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus</i> × <i>oxford</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus tremola</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00
<i>Populus trichocarpa</i> (mladý)	14. 7. 2015	9:00

3.2 Metody

3.2.1 Příprava cytokininových standardů

Roztoky jednotlivých cytokininových standardů o výsledné koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním naváženého množství komerčního CK v N,N-dimethylformamidu (DMF, Tab. 1).

Tab. 1 Navážky cytokininových standardů při přípravě roztoků o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Cytokinin	Označení cytokininu	Hmotnost navážky [mg]	Objem DMF [μl]
<i>meta</i> -Topolin	<i>mT</i>	0,407	843,5
<i>meta</i> -Topolin ribosid	<i>mTR</i>	0,638	854,4
N ⁶ -benzyladenin	BA	0,579	1285,2
N ⁶ -benzyladenosin	BAR	0,460	643,6
<i>ortho</i> -Methoxytopolin	MeoT	0,786	1539,5
<i>ortho</i> -Topolin	<i>oT</i>	0,738	1529,5
<i>ortho</i> -Topolin ribosid	<i>oTR</i>	0,406	543,7
[² H ₇]N ⁶ -benzyladenin	D-BA	0,442	951,4
[² H ₇]N ⁶ -benzyladenosin	D-BAR	0,481	660,0
[¹⁵ N ₄] <i>meta</i> -Methoxytopolin	15N- <i>MemT</i>	0,710	1369,3
[¹⁵ N ₄] <i>meta</i> -Topolin-9- β -D-glukosid	15N- <i>mT</i> -9G	0,576	706,9
[¹⁵ N ₄] <i>meta</i> -Topolin-9- β -D-ribosid	15N- <i>mT</i> -9R	0,468	620,2
[¹⁵ N ₄] <i>ortho</i> -Topolin	15N- <i>oT</i>	0,488	995,0
[¹⁵ N ₄] <i>ortho</i> -Topolin-9- β -D-glukosid	15N- <i>oT</i> -9G	0,471	578,1
[¹⁵ N ₄] <i>ortho</i> -Topolin-9- β -D-ribosid	15N- <i>oT</i> -9R	0,512	678,5
[¹⁵ N ₄] <i>para</i> -Topolin	15N- <i>pT</i>	0,452	921,6
[¹⁵ N ₄] <i>para</i> -Topolin-9- β -D-glukosid	15N- <i>pT</i> -9G	0,469	575,6
[¹⁵ N ₄] <i>para</i> -Topolin-9- β -D-ribosid	15N- <i>pT</i> -9R	0,509	674,5

3.2.2 Optimalizace metody LC-MS pro měření aromatických cytokininů

ARCK byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Hmotnostní přechody standardů byly definovány přímým nástřikem do MS. Následným měřením na LC-MS a vyhodnocením v softwaru LabSolutions (Shimadzu, verze 5.72) byly stanoveny kolizní energie a retenční časy standardů. Měřilo se v systému reversních fází za použití chromatografické kolony ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 μm , 2,1 \times 100 mm) a mobilní fáze A 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mravenčan amonný o pH 4 a mobilní fáze B methanol. Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 0,25 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ s gradientovou elucí (Tab. 2). Kolona byla termostatována na 40 °C a na kolonu bylo dávkováno 10 μl vzorku. Detekce pomocí hmotnostního spektrometru probíhala v MRM (Multiple Reaction Monitoring) módu, při ionizaci ESI+ (ElectroSpray Ionization), napětí na kapiláře 4kV, desolvatační teplotě 250 °C, průtoku zmlžujícího plynu 3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplotě zdroje 400 °C.

Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) jednotlivých látek byly určeny softwarově funkcí signal-to-noise, průměrem LOD a LOQ získaných z kalibračních přímků jakožto trojnásobek a desetinásobek poměru šum-intenzita signálu.

Tab. 2 Průběh gradientové eluce

Čas [min]	Mravenčan amonný [%]	Methanol [%]
0,1	90	10
0,5	90	10
12	57	43
15	0	100
16	90	10
17,5	90	10

3.2.3 Příprava kalibrační řady

Na přípravu kalibrační řady byly použity roztoky standardů o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (kap. 3.2.1). Nejdříve bylo jedenáct značených cytokininových standardů (Tab. 1) zředěno 445 μl DMF tak, aby jejich výsledná koncentrace v roztoku byla $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Následně bylo připraveno 200 μl roztoku o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ smísením sedmi studených standardů (20 μl každého, Tab. 1) a 60 μl DMF. Roztok studených standardů byl zředěn 10x na výslednou koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (20 μl $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a 180 μl DMF). Stejným způsobem byly nachystány i zásobní roztoky kalibrační řady o koncentracích $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Ze zásobních roztoků byla připravena kalibrační řada roztoků o objemu 100 μl v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kde značené standardy měly v každém případě stejnou koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vypočítané objemy zásobních roztoků, značených CK a DMF jsou zapsány v Tab. 3.

Pro měření na LC-MS byla kalibrační řada 100x zředěna mobilní fází (90 % 15 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ mravenčan amonný, pH 4 a 10 % methanol, v/v), takže výsledná koncentrace kalibrační řady byla $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tab. 3 Příprava 100 μl roztoků kalibrační řady

Výsledná koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	Koncentrace zásobního roztoku [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	Objem zásobního roztoku [μl]	Objem DMF [μl]	Objem značených CK ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) [μl]
$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	50	45	5
$5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	25	70	5
$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	50	45	5
$5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	25	70	5
$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	50	45	5
$5 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$	25	70	5
$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	50	45	5
$5 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$	25	70	5
$1 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$	5	90	5

3.2.4 Zpracování rostlinného materiálu

3.2.4.1 Extrakce

Listy topolů byly zhomogenizovány s kapalným dusíkem v třecí misce a do 2 ml mikrozkušavek bylo naváženo 100–200 mg homogenátu, ke kterému bylo napipetováno 1,5 ml modifikované Bielského extrakční směsi (methanol : voda : kyselina mravenčí – 75 : 20 : 5) a 3 pmol značených interních cytokininových standardů. Směs byla zvortexována a následovala hodinová extrakce při - 20 °C. Po skončení extrakce byla směs zvortexována a centrifugována (12400 g, 5 min). Supernatant byl přepipetován do čistých zkumavek a k sedimentu bylo přidáno 0,5 ml modifikované Bielského extrakční směsi. Směs byla zvortexována a reextrahována při - 20 °C 45–60 minut. Obsah mikrozkušavek byl zpracován stejným způsobem jako při první extrakci a spojené extrakty byly odpařeny na centrifugačním koncentrátoru. Odparky byly rozpuštěny ve 4 ml 1 mol·l⁻¹ kyseliny mravenčí a CK byly purifikovány pomocí SPE.

3.2.4.2 Purifikace cytokininů pomocí SPE

Purifikace CK pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) probíhala na kolonách Oasis MCX 6 cc 150 mg. Kolony byly aktivovány 5 ml methanolu a ekvilibrovány 5 ml 1 mol·l⁻¹ kyseliny mravenčí. Poté byly nanесeny 4 ml vzorku. Následně byly kolony promyty 5 ml 1 mol·l⁻¹ kyseliny mravenčí a 5 ml methanolu. Analyty byly eluovány do zkumavek 4,5 ml elučního činidla (0,35 mol·l⁻¹ hydroxid amonný v methanolu, 4 : 6, v/v). Eluáty byly do sucha odpařeny na centrifugačním koncentrátoru a následně rozpuštěny v mobilní fázi pro měření LC-MS.

3.2.5 Screening volných ARCK pomocí LC-MS

Odpařené vzorky po SPE byly rozpuštěny ve 30 µl mobilní fáze (90 % 15 mmol·l⁻¹ mravenčan amonný o pH 4 a 10 % methanol, v/v). Vzorky byly zfiltrvány za použití Micro-Spin zkumavek s filtrem a přepipetovány do total-recovery vialek.

Volné ARCK v rostlinném materiálu byly analyzovány pomocí LC-MS za podmínek definovaných v kap. 3.2.2.

Kolizní spektra byla měřena v PIS (Product Ion Scan) módu s nastaveným rozsahem fragmentů m/z 50–400 a s kolizními energiemi pro σT - 35 V a σTR - 30 V. Ostatní podmínky měření byly stejné jako při screeningu volných ARCK.

3.2.6 Izolace tRNA

Roztoky použité pro izolaci tRNA byly připraveny z vody ošetřené diethylpyrokarbonátem (DEPC, 0,1% roztok, v/v) a veškeré pomůcky byly autoklávovány. Pracovalo se v rukavicích a v laminárním boxu, aby se zabránilo kontaminaci ribonukleasami.

Listy topolů byly zhomogenizovány pod dusíkem v třecí misce a do 2 ml mikrozkušavek bylo naváženo 100–200 mg rostlinného materiálu. Ke vzorkům bylo přidáno 500 μ l Tris/HCl pufru (pH 7,5) a následovala extrakce na programovatelném rotátoru (15 RPM, 30 min, 4 °C). Ke vzorkům bylo napipetováno 500 μ l fenolu (pH 8,0) a 63 μ l m-kresolu a směs byla zvortexována a centrifugována (1372 g, 15 min, 4 °C). K supernatantu převedeného do čistých mikrozkušavek bylo přidáno 50 μ l 2,5 mol·l⁻¹ octanu draselného a 1250 μ l ethanolu. Vzorky byly zvortexovány a precipitovány přes noc při - 20 °C. Precipitáty byly centrifugovány (18407 g, 30 min, 4 °C), supernatant byl odpipetován a pelety vysušeny. Po 20 min bylo ke vzorkům připipetováno 200 μ l 3 mol·l⁻¹ octanu sodného a vzorky se nechaly třepat na multi-vortexu (6 h, 4 °C). Vzorky byly centrifugovány (18407 g, 45 min, 4 °C) a supernatant byl přepipetován do čistých zkumavek, kde bylo přidáno 200 μ l destilované vody a 800 μ l ethanolu. Vzorky byly zvortexovány a precipitovány přes noc při - 20 °C. Následující den byla provedena centrifugace precipitátu (18407 g, 30 min, 4 °C), supernatant byl odpipetován a pelety vysušeny. K peletům bylo přidáno 100 μ l destilované vody a vzorky se nechaly třepat na multi-vortexu (20 min, 4 °C). Kvůli vysokému obsahu proteinů byly vzorky opět centrifugovány (18407 g, 5 min, 4 °C) a supernatant byl převeden do nových mikrozkušavek.

Izolovaná tRNA byla použita pro spektrofotometrické měření, agarosovou elektroforézu a následnou hydrolyzu s analýzou CK.

3.2.7 Spektrofotometrické měření tRNA

Čistota a koncentrace izolované tRNA byla zjištěna pomocí spektrofotometru DS-11 s nainstalovanou aplikací pro měření nukleových kyselin. Čistota tRNA byla stanovena

změřením poměrů absorbancí A260/A280 a A260/A230. Pro měření bylo potřeba 1 μl tRNA rozpuštěné ve vodě (blankování destilovanou vodou).

3.2.8 Agarosová elektroforéza

Agarosa byla za horka rozpuštěna v 50x zředěném komerčním Tris-acetát-EDTA pufru (TAE) za vzniku 1% agarosového gelu (0,5 g agarosy, 50 ml TAE). Gel byl po ochlazení nalit do vaničky s předem přidaným 0,07% ethidium bromidem (30 μl) a promíchán hřebínkem, který byl usazen do držáku. Po ztuhnutí gelu (30 min) byl hřebínek odstraněn a gel byl přenesen do elektroforetické vany s TAE pufrům. 5 μl vzorku bylo smíseno s 1 μl nanášecího pufru DNA Gel Loading Dye 6X a směs byla spolu s velikostním markerem GeneRuler 1kb DNA Ladder nanesena na gel. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji a elektroforéza se nechala vyvíjet zhruba 40 minut při 100 V. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen na UV Tray a zařízením Gel Doc EZ system byl pořízen elektroferogram.

3.2.9 Hydrolýza tRNA

3.2.9.1 Alkalická hydrolýza

Ke 30 μl rozpuštěné tRNA bylo přidáno 10 μl 2 mol·l⁻¹ hydroxidu draselného a směs byla přes noc při laboratorní teplotě inkubována. Alkalická hydrolýza byla ukončena neutralizací 10 μl 10% kyseliny chloristé na pH 7,5-8,0 (kontrola pH pomocí pH papírků) za precipitace chloristanu draselného. Po centrifugaci (10000 g, 10 min) byl supernatant přepipetován do čistých mikrozkušavek.

3.2.9.2 Enzymatická hydrolýza pomocí nukleasy S1

Pomocí vakuového koncentrátoru byla z 30 μl rozpuštěné tRNA odpařena většina vodné složky (20 min) a ke vzorkům bylo přidáno 50 μl pufru o pH 4,6 (30 mmol·l⁻¹ octan sodný, 50 mmol·l⁻¹ chlorid sodný, 1 mmol·l⁻¹ octan zinečnatý, 5 % glycerol). Vzorky byly zvortexovány a bylo k nim přidáno 30 U nukleasy S1 (ve výše zmíněném pufru, pH 4,6). Reakční směs byla přes noc při 37 °C inkubována a enzymatická hydrolýza byla ukončena změnou pH hydrogenuhličitanovým pufrům (pH 9,6).

3.2.9.3 Enzymatická hydrolýza pomocí nukleasy P1

Pomocí vakuového koncentrátoru byla z 30 μl rozpuštěné tRNA odpařena většina vodné složky (20 min), ke vzorkům bylo přidáno 50 μl Tris-HCl pufru (pH 7,5) a směs byla zvortexována. Ke vzorkům bylo napipetováno 0,4 U nukleasy P1 (v Tris-HCl pufru, pH 7,5). Reakční směs byla přes noc při 37 °C inkubována a enzymatická hydrolýza byla ukončena změnou pH hydrogenuhličitanovým pufrem (pH 9,6).

3.2.9.4 Defosforylace nukleotidů

Po proběhnutí alkalické a enzymatické hydrolýzy byly vzorky doplněny hydrogenuhličitanovým pufrem (pH 9,6) na celkový objem 600 μl a zvortexovány. Následně bylo přidáno 0,5 U termosensitivní alkalické fosfatasy a reakční směs byla inkubována 2 h při 37 °C. Enzymatická reakce byla ukončena 1250 μl ethanolu a precipitací enzymu při -20 °C přes noc. Po centrifugaci (5000 g, 10 min) byl supernatant přepipetován do nových mikrozkušavek a vzorky byly odpařeny na celkový objem 100-200 μl pomocí vakuového koncentrátoru.

Ke vzorkům byly přidány 3 pmol značených interních cytokininových standardů a 1,5 ml 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mravenčanu amonného pro purifikaci cytokininů v tRNA pomocí SPE.

3.2.10 Purifikace tRNA cytokininů pomocí SPE

Purifikace tRNA cytokininů pomocí SPE byla provedena na SPE kolonách Bond Elut C18 100 mg. Kolony byly aktivovány 2 ml methanolu a ekvilibrovány 4 ml 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mravenčanu amonného. Nanášené vzorky byly rozpuštěny v 1,5 ml 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mravenčanu amonného. Stejný objem mravenčanu amonného byl použit na promytí mikrozkušavek. Kolona byla promyta 2 ml destilované vody a CK byly eluovány 2 ml 80% methanolu s 2% kyselinou mravenčí (v/v).

Eluáty byly do sucha odpařeny na centrifugačním koncentrátoru a rozpuštěny v mobilní fázi pro měření LC-MS.

3.2.11 Analýza cytokininů v tRNA pomocí LC-MS

Odparky po SPE byly rozpuštěny v 30 μl mobilní fáze (90 % 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mravenčan amonný, pH 4 a 10 % methanol, v/v) a měření probíhalo za podmínek popsaných v kap. 3.2.2.

Pro screening CK v tRNA byly do metody přidány standardy N^6 -isopentenyladenosin (iPR), *cis*-zeatin ribosid (cZR) a *trans*-zeatin ribosid (tZR), jejichž parametry byly optimalizovány stejným způsobem jako v případě ARCK (kap. 3.2.2)

6 ZÁVĚR

Úvod teoretické části této bakalářské práce byl věnován fytohormonům, především cytokininům. Byla vysvětlena jejich chemická struktura, hormonální aktivita a biosyntéza. V druhé části byla popsána struktura DNA, metody sekvenování, typy RNA a cytokininy v tRNA.

Experimentální část byla zaměřena na analýzu volných aromatických cytokininů v listech topolů rodu *Populus* metodou LC-MS. Detekován byl *ortho*-topolin ribosid, který byl přítomem ve všech vybraných klonech. Dalším aromatickým cytokininem byl *ortho*-topolin, který byl detekován u 7 klonů. Stanovené koncentrace byly v řádech desetin až stovek $\text{pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Závěrem byla určena jejich dynamiky u sběrů v čase pět až jedenáct hodin, kdy nejvyšší hladiny cytokininů byly pozorovány v devět hodin.

V izolované tRNA byl přítomen N^6 -isopentenyladenosin, *cis*-zeatin ribosid a *ortho*-topolin ribosid. V porovnání s *ortho*-topolin ribosidem (desetiny $\text{ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ tRNA) bylo množství *cis*-zeatin ribosidu poloviční a N^6 -isopentenyladenosinu pětina. Dynamika aromatického cytokininu v tRNA nebyla pozorována.

7 LITERATURA

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 630 stran.
- Atanosova L. (2011): Cytokinin-like nucleosides in major RNA species of maize (*Zea mays* L.) roots. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* **64**, 1123-1130.
- Bentley D.R., Balasubraminian S., Swerdlow H.P., Smith G.P., Milton J., Brown C.G., Hall K.P., Evers D.J., Barnes C.L., Bignell H.R., Boutell C.G., Bryant J., Carter R.J., Cheetham R.K., Cox A.J., Ellis D.J., Flatbush M.R., Gormley N.A., Humphray S.J., Irving L.J., Karbelashvili M.S., Kirk S.M., Li H., Liu X., Maisinger K.S., Murray L.J., Obradovic B., Ost T., Parkinson M.L., Pratt M.R., Rasolonjatovo I.M.J., Reed M.T., Rigatti R., Rodighiero C., Ross M.T., Sabot A., Sankar S.V., Scally A., Schroth G.P., Smith M.E., Smith V.P., Spiridou A., Torrance P.E., Tzonev S.S., Vermaas E.H., Walter K., Wu X., Zhang L. *et al.* (2008): Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53-59.
- Bishop A.C., Xu J., Johnson R.C., Schimmel P., de Crécy-Lagard V. (2002): Identification of the tRNA-dihydrouridine synthase family. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 25090-25095.
- Bishopp A., Mähönen A.P., Helariutta Y. (2006): Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**, 1857-1869.
- Bischler N., Brino L., Carles C., Riva M., Tschochner H., Mallouh V., Schultz P. (2002): Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *The EMBO Journal* **21**, 4136-4144.
- Burg S.P., Burg E.A. (1965): Relationship between ethylene production and ripening in bananas. *Botanical Gazette* **126**, 200-204.
- Cirera S. (2013): Highly efficient method for isolation of total RNA from adipose tissue. *BMC Research Notes* **6**, 472.
- Cougot N., van Dijk E., Babajko S., Séraphin B. (2004): Cap-tabolism. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 436-444.
- Davière J.M., Achard P. (2013): Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**, 1147-1151.
- Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., deWinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D., Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Korf J., Turner S. (2009): Real-Time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Nature* **323**, 133-138.
- Ensinger M.J., Martin S.A., Paoletti E., Moss B. (1975): Modification of the 5'-terminus of mRNA by soluble guanylyl and methyl transferases from vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2525-2529.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002): Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 161-169.
- Harteis S., Schneider S. (2014): Making the bend: DNA tertiary structure and protein-DNA interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 12335-12363.
- Hedden P., Thomas S.G. (2012): Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal* **444**, 11-25.
- Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H. (2000): Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 1448-1458.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D.E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.

- Horgan R., Hewett E.W., Horgan J.M., Purse J., Wareing P.F. (1975): A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.
- Horowitz R.A., Agard D.A., Sedat J.W., Woodcock C.L. (1994): The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *The Journal of Cell Biology* **125**, 1-10.
- Hrtyan M., Šliková E., Hejátko J., Růžička K. (2015): RNA processing in auxin and cytokinin pathways. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4897-4912.
- Hwang I., Sheen J., Müller B. (2012): Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 353-380.
- Chen C.M. (1997): Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum* **101**, 665-673.
- Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T.V. (2010): The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 113-127.
- Juříková S. (2016): *Cytokininy v řasách*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kolitz S.E., Lorsch J.R. (2010): Eukaryotic initiator tRNA: finely tuned and ready for action. *FEBS Letters* **584**, 396-404.
- Konevega A.L., Soboleva N.G., Makhno V.I., Peshekhonov A.V., Katunin V.I. (2006): Effect of modification of tRNA nucleotide 37 on the tRNA interaction with the A and P sites of the *Escherichia coli* 70S ribosome. *Molecular Biology* **40**, 669-683.
- Krämer A. (1996): The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 367-409.
- 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.
- Lasotová E. (2015): *Purifikace a charakterizace tRNA isopentenyltransferasy z kukuřice*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Leung J., Giraudat J. (1998): Abscisic signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 199-222.
- Lewin B. (2008a): Genes Are DNA. In: *GENES IX*. (DeChambeau D.W., Sether C.), Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 2-22.
- Lewin B. (2008b): Messenger RNA. In: *GENES IX*. (DeChambeau D.W., Sether C.), Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 127-150.
- Liu L.F., Wang J.C. (1978): *Micrococcus luteus* DNA gyrase: active components and a model for its supercoiling of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2098-2102.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. (2001): Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**, 465-474.
- Maeshima K., Eltsov M. (2008): Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. *The Journal of Biochemistry* **143**, 145-153.
- Maiti M., Kumar G.S. (2007): Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives. *Medical Research Reviews* **27**, 649-695.
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.

- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K., Kamiya Y., Kasahara H. (2011): The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18512-18517.
- Maxam A.M., Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 560-564.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16598-16603.
- Modomics – A database of RNA modifications: <http://modomics.genesilico.pl/modifications/> (20. 1. 2016).
- 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.
- Pavlová L., Fisher L. (2011): Cytokiny. In: *Růst a vývoj rostlin*. (Jakubec I.), Karolinum, Praha, 96-101.
- Pharis R.P., King R.W. (1985): Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **36**, 517-568.
- Podlešáková K., Tarkowská D., Pěňčík A., Oklešťková J., Turečková V., Floková K., Tarkowski P. (2012): Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy* **106**, 373-379.
- Prinsen E., Kamínek M., van Onckelen H.A. (1997): Cytokinin biosynthesis: a black box?. *Plant Growth Regulation* **23**, 3-15.
- Raychaudhuri S., Niu L., Conrad J., Lanes B.G., Ofengand J. (1999): Functional effect of deletion and mutation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 18880-18886.
- Raz V., Bergervoet J.H.W., Koornneef M. (2001): Sequential steps for arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**, 243-252.
- Robinson P.J.J., Fairall L., Huynh V.A.T., Rhodes D. (2006): EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6506-6511.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical journal* **295**, 517-524.
- Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., Nyren P. (1996): Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* **242**, 84-89.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013): Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2565-2577.
- Spahn C.M.T., Beckmann R., Eswar N., Penczek P.A., Sali A., Blobel G., Frank J. (2001): Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* - tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**, 373-386.
- 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 Physiology* **99**, 74-80.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- 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.
- Tanimoto M., Roberts K., Dolan L. (1995): Ethylene is a positive regulator of root development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**, 943-948.

- 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. *Physiologia Plantarum* **117**, 579-590.
- Tukalo M.A., Yaremchuck G.D., Kovalenko O.P., Kriklivyi I.A., Gudzera O.I. (2013): Recognition of tRNAs with a long variable arm by aminoacyl-tRNA synthetases. *Biopolymers and Cell* **29**, 311-323.
- Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tanokura M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2010): Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1821-1839.
- Wahle E., Martin G., Schiltz E., Keller W. (1991): Isolation and expression of cDNA clones encoding mammalian poly(A) polymerase. *The EMBO Journal* **10**, 4251-4257.
- Wang K.L.C., Li H., Ecker J.R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* **14**, S131-S151 (S-supplement).
- Wang Y.H., Irving H.R. (2011): Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 494-500.
- Warner G.J., Berry M.J., Moustafa M.E., Carlson B.A., Hatfield D.L., Faust J.R. (2000): Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA^{[Ser]^{Sec} lacking isopentenyladenosine. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 28110-28119.}
- Watson J.D., Crick F.H.C. (1953): Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.
- Weil R., Vinograd J. (1963): The cyclic helix and cyclic forms of polyoma viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **50**, 730-738.
- Yevdakova N.A., Motyka V., Malbeck J., Trávníčková A., Novák O., Strnad M., von Schwanberg K. (2008): Evidence for importance of tRNA-dependent cytokinin biosynthetic pathway in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulators* **27**, 271-281.
- Zacarias L., Reid M.S. (1990): Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum* **80**, 549-554.
- Záveská Drábková L., Dobrev P.I., Motyka V. (2015): Phytohormone Profiling across the Bryophytes. *PLoS ONE* **10**(5):e0125411. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125411>.
- Zlatanova J., Caiafa P., Van Holde K. (2000): Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *The FASEB Journal* **14**, 1697-1704.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

15N-MemT	[¹⁵ N ₄] <i>meta</i> -methoxytopolin
15N-mT-9G	[¹⁵ N ₄] <i>meta</i> -topolin-9-β-D-glukosid
15N-mT-9R	[¹⁵ N ₄] <i>meta</i> -topolin-9-β-D-ribosid
15N-oT	[¹⁵ N ₄] <i>ortho</i> -topolin
15N-oT-9G	[¹⁵ N ₄] <i>ortho</i> -topolin-9-β-D-glukosid
15N-oT-9R	[¹⁵ N ₄] <i>ortho</i> -topolin-9-β-D-ribosid
15N-pT	[¹⁵ N ₄] <i>para</i> -topolin
15N-pT-9G	[¹⁵ N ₄] <i>para</i> -topolin-9-β-D-glukosid
15N-pT-9R	[¹⁵ N ₄] <i>para</i> -topolin-9-β-D-ribosid
ARCK	aromatický cytokinin
BA	N ⁶ -benzyladenin
BAR	N ⁶ -benzyladenosin
CK	cytokinin
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
D-BA	[² H ₇]N ⁶ -benzyladenin
D-BAR	[² H ₇]N ⁶ -benzyladenosin
DMF	N,N-dimethylformamid
ESI	ionizace elektrospřejem
FIA	flow injection analysis
iPR	N ⁶ -isopentenyladenosin
ISCK	isoprenoidní cytokinin
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeoT	<i>ortho</i> -Methoxytopolin
MRM	multiply reaction monitoring
mT	<i>meta</i> -Topolin
mTR	<i>meta</i> -Topolin ribosid
oT	<i>ortho</i> -Topolin
oTR	<i>ortho</i> -Topolin ribosid
PIS	product ion scan
SPE	extrakce na pevné fázi
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid