

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský  
výzkum**



**Vliv kultivačních podmínek na metabolismus cytokininů u  
sinice *Nostoc* PCC 7120**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Michaela Němcová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2014

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Michaela Němcová
Název práce:	Vliv kultivačních podmínek na metabolismus cytokininů u sinice <i>Nostoc PCC 7120</i>
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení chemické biologie a genetiky
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	<p>Tato práce se zabývá studiem vlivu světla a dusíkaté výživy na obsah cytokininů v cyanobakterii <i>Nostoc</i> sp. <i>PCC 7120</i>. <i>Nostoc</i> byl kultivován v bezdusíkatém médiu nebo v přítomnosti dusičnanů za různých světelných podmínek a z jeho buněk byly přečištěny metabolity cytokininů pomocí extrakce na pevné fázi. Obsah cytokininů byl stanoven metodou ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získané výsledky nasvědčují tomu, že při nízké intenzitě osvětlení indukuje světlo u cyanobakterie syntézu cytokininů nezávisle na zdroji dusíkaté výživy. Při vysoké intenzitě osvětlení je světlem indukovaná biosyntéza cytokininů potlačena přítomností dusičnanu.</p>
Klíčová slova:	Cytokininy, cyanobakterie, <i>Nostoc PCC7120</i> , extrakce na pevné fázi
Počet stran:	41
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and Suriname: Michaela Němcová

Title of thesis: Effect of cultivation conditions on cytokinin metabolism in cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120

Type of thesis: Bachelor

Department: Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics

Supervisor: doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract: This work studies the effects of light and nitrogen nutrition on cytokinin content in cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Nostoc* was grown in a nitrogen-free medium or in the presence of nitrate under different light conditions, and cytokinin metabolites were purified from the cells by solid phase extraction. Cytokinin content was determined by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The results suggest that light induces the synthesis of cytokinins in cyanobacteria independently of the source of nitrogen nutrition at low light intensity. The light-induced cytokinin biosynthesis is however suppressed by the presence of nitrate at high light intensity.

Keywords: Cytokinins, cyanobacteria, *Nostoc* PCC 7120, solid phase extraction

Number of pages: 41

Number of appendices: 0

Language: Czech

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

V Olomouci dne .....

Závěrem bych chtěla vyjádřit svoje upřímné poděkování za vědecký přístup ve vedení práce, věnovaný čas, hodnotné a důležité připomínky a náměty svoji vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D.

Nespornou zásluhu na průběhu bakalářské práce a to konkrétně za měření vzorků a vyhodnocování dosažených výsledků měl pan Mgr. Ondřej Novák, Ph.D. Mé poděkování patří i laborantce Haně Martínkové za její laboratorní vedení a cenné poznatky k dané problematice a paní Mgr. Michaele Mrvkové za pomoc při zpracování získaných dat.

## Obsah

Seznam zkratk	7
1. Cíle práce	9
2. Teoretická část	10
2.1. Vliv dusíkaté výživy na růst cyanobakterií	10
2.1.1. Asimilace dusičnanů a dusitanů	12
2.1.2. Fixace dusíku	12
2.1.3. Asimilace amoniaku	14
2.1.4. Asimilace močoviny	14
2.2. Interakce mezi cytokininy a dusíkem ve vývoji rostlin	16
2.2.1. Cytokininy	16
2.2.2. Biosyntéza cytokininů	18
2.2.3. Degradace a inaktivace cytokininů	19
2.2.4. Signální dráha cytokininů	20
2.2.5. Osud rostliny řízený dusíkem	21
2.2.6. Biosyntéza CK v přítomnosti dusičnanu	21
2.2.7. Regulace příjmu dusíku CK	22
2.3. Metody chemické analýzy cytokininů	23
2.3.1. Příprava vzorků	23
2.3.2. Extrakce a purifikace	23
2.3.3. Kapalinová chromatografie	24
3. Experimentální část	26
3.1 Biologický materiál	26
3.2 Pracovní roztoky a materiál	26
3.3 Přístrojové vybavení	27
3.4 Metody	27
3.4.1. Stanovení obsahu chlorofylu	27
3.4.2. Příprava biologického materiálu	27
3.4.3. Purifikace cytokininů z buněk <i>Nostoc</i>	28
3.4.4. Stanovení cytokininových metabolitů metodou UPLC- MS	29
4. Výsledky a diskuze	30
5. Závěr	36
6. Seznam použité literatury	37

## Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
AP	alkalická fosfatasa
ATP	adenosintrifosfát
B	frakce obsahující volné báze, ribosidy a N-glukosidy
BA	benzyladenin
cAMP	cyklický adensinmonofosfát
CE-MS	spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií
CK	cytokinin
CKX	cytokinindehydrogenasa
CMP	cyklický monofosfát
cZ	cis-zeatin
cZOG	cis-zeatin O-glukosid
cZR	cis-zeatin ribosid
cZRMP	cis-zeatin ribosid monofosfát
cZROG	cis-zeatin ribosid O-glukosid
DHZ	dihydrozeatin
DHZOG	dihydrozeatin O-glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZRMP	dihydrozeatin ribosid monofosfát
DHZROG	dihydrozeatin ribosid O-glukosid
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GS	glutaminsyntetasa
GS-GOGAT	glutaminsynthetasa-glutamát synthasa
HK	histidinkinasový senzor
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
HN	high nitrate, vysoká koncentrace dusíku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS/MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPt	histidin fosfopřenašečový protein

IA	imunoafinitní
IAA	indol-3-octová kyselina
IAC	imunoafinitní chromatografie
IDH	isocitrátdehydrogenasa
iP	6-isopentenyloadenosin
iP9G	6- isopentenyloadenin-9-glukosid
iPR	6-isopentenyloadenosin
iPRMP	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosine-5'-monophosphate
IPT	isopentenyltransferasa
LN	low nitrate, nízká koncentrace dusíku
MEP	methylethritol fosfátová dráha
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MVA	melavonátová dráha
NAD(P)H	nikotinamidadeninukleotid(fosfát)
NT	frakce obsahující nukleotidy
OG	frakce obsahující O-glukosidy
PFO	pyruvát:ferredoxinoxidoreduktasa
PGPB	růst podporující bakterie
PI	preimunní
RIA	radioimunoanalýza
RR	regulátor odpovědi (response regulator)
SCX	strong cation exchange
SPE	solid phase extraction
TCS	two-component regulatory system, dvoukomponentní systém
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferasa
tZ	trans-zeatin
tZ9G	trans-zeatin-9-glukosid
tZOG	trans-zeatin O-glukosid
tZR	trans-zeatin ribosid
tZROG	trans-zeatin ribosid O-glukosid



# 1. Cíle práce

- Literární přehled známých poznatků o interakci cytokininů a dusíkaté výživy při vývoji rostlin
- Literární přehled známých poznatků o odezvě sinic na různé zdroje dusíkaté výživy
- Kultivace sinice *Nostoc* PCC 7120 v bezdusíkatém médiu nebo v přítomnosti dusičnanů za různých světelných podmínek
- Přechištění cytokininových metabolitů z buněk
- Stanovení obsahu cytokininů metodou HPLC/MS
- Vyhodnocení a diskuse výsledků

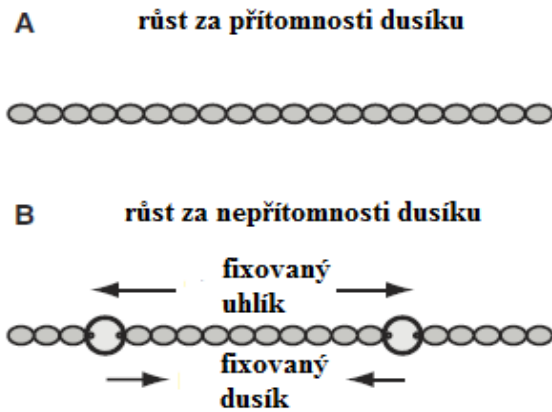
## 2. Teoretická část

### 2.1. Vliv dusíkaté výživy na růst cyanobakterií

Cyanobakterie představují různorodou skupinu gramnegativních bakterií schopných oxygenní fotosyntézy (Margulis, 1975) a zároveň se jedná o domnělé předchůdce chloroplastů eukaryotických rostlin (Wallace, 1982; Pakrasi, 1995). Přitom se na základě fosilních důkazů jedná z hlediska evolučního vývoje o velmi starobylé organismy, které se na Zemi objevily více jak před 3 miliardami let (Adams, 2000). Mnoho druhů sinic je schopno fixace dusíku. Nicméně, oxygenní fotosyntéza a fixace dusíku jsou neslučitelné procesy, protože enzym nitrogenasa je inaktivována kyslíkem. Sinice používají převážně dva mechanismy pro oddělení této činnosti: biologickými cirkadiálními hodinami se od sebe oddělí časově, mnohobuněčností a buněčnou diferenciací se oddělí prostorově (Toepel a kol., 2008).

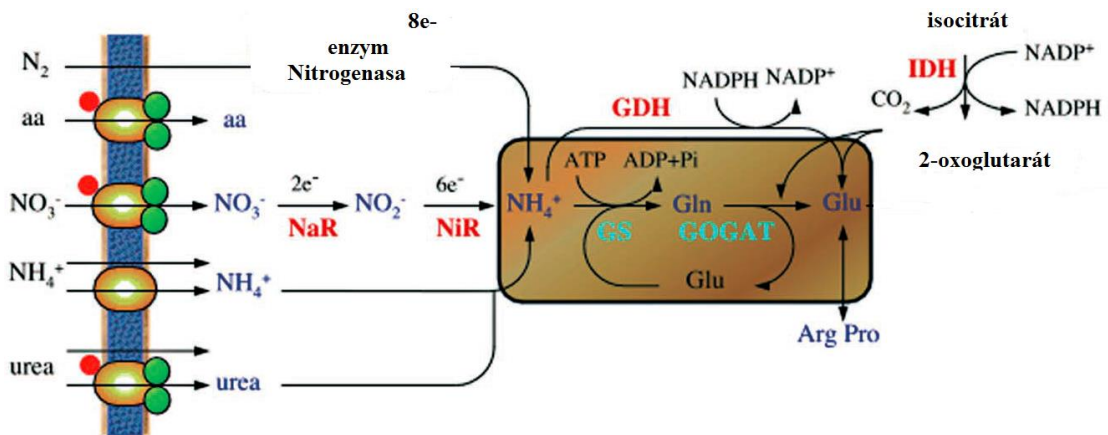
Důležitým objevem bylo to, že sinice obsahují gramnegativní buněčnou stěnu, kterou tvoří dvě odlišné membrány, plasmatická a vnější, a peptidoglykanová vrstva, která je mnohem silnější než u jiných gramnegativních bakterií a zároveň je mezi těmito membránami uložena (Hoiczyk a Hansel 2000). Vnější buněčná stěna je obohacena glykokalyxem, který chrání buňku před vysoušením, fágy a predátory. Sinice také obsahují rozsáhlou vrstvu vnitřních thylakoidních membrán. Fylogenetické studie sinic prokázaly, že genetické vztahy jsou někdy v rozporu s morfologickou klasifikací (Lyra a kol., 2001; Iteman a kol., 2002; Gugger a Hoffmann, 2004). Porovnání morfologických a genetických údajů vede totiž k tomu, že v důsledku nedostatečných údajů o sekvenovaném kmeni může dojít ke ztrátě některých důležitých vlastností, jako jsou přítomnost plynových váčků (Lehtimaki a kol., 2000) nebo i forma kolonie (Gugger a kol., 2002) při dlouhodobé laboratorní kultivaci, což komplikuje identifikaci.

V přítomnosti zdroje dusíku jako je dusičnan nebo amoniak, roste *Nostoc* sp. kmen PCC 7120 (často nazývaná také *Anabaena* sp. PCC 7120) jako dlouhé vlákno obsahující stovky fotosyntetizujících vegetativních buněk (Obr. 1A). V nepřítomnosti dusíku (Obr. 1B) produkuje heterocyty, což jsou diferencované buňky fixující dusík, které se tvoří v polopravidelných intervalech mezi úseky vegetativních buněk (Kumar a kol., 2009) a slouží k fixaci vzdušného dusíku. *Nostoc* se ukázal být excelentním modelem pro studium stanovení osudu buňky, diferenciaci a diferenciací genové exprese během prokaryotického mnohobuněčného vývoje (Kumar a kol., 2009).



**Obrázek 1** Tvorba heterocyt u *Nostoc PCC 7120* (upraveno z Kumar a kol., 2009)

Sinice představují klíčové biokatalyzátory v  $N_2$  cyklu (Vitoušek a kol., 2002). Mezi běžně užívané zdroje dusíku u sinic (Obr. 2) patří dusičnany, dusitany, amoniak, některé druhy jsou schopny využívat močovinu nebo fixovat atmosferický dusík, další se mohou také přizpůsobit argininu nebo glutaminu. Dusitany a dusičnany jsou redukovány nitrát a nitritreduktasami, enzymy závislémi na ferredoxinu, arginin je metabolizován kombinací močovinového cyklu a arginasové dráhy, a močovina je degradována pomocí ureas obsahujících  $Ni^{2+}$ . Amoniak přítomný v prostředí nebo vzniklý metabolismem ostatních zdrojů dusíku je začleněn do uhlikatých sloučenin postupnou reakcí glutaminsyntetasy (GS) a glutamátsyntasy (GOGAT). Exprese mnoha genů v asimilaci dusíku je podrobena regulaci a je aktivována transkripčním faktorem NtcA (Flores a kol., 2005).



**Obrázek 2** Metabolické dráhy dusíku u cyanobakterií (upraveno z Muro-Pastor a Florencio, 2003).

Reakce katalyzovaná glutaminsyntetasou (GS) zahrnuje ATP-dependentní amidaci glutamátu, čímž se získá glutamin. Glutamátsyntasa (GOGAT) následně katalyzuje redukcí oxoglutarátu za vzniku dvou molekul glutamátu. Uhlíkový skelet požadovaný pro asimilaci amoniaku je získán z oxoglutarátu, který je syntetizován isocitrátdehydrogenasou (IDH), enzymem citrátového cyklu. V některých sinicích také probíhá přímá aminace oxoglutarátu katalyzovaná glutamátdehydrogenasou (GDH). Její centrální postavení v metabolismu dělá GS-GOGAT cestu citlivou na regulaci rozdílnými podmínkami prostředí, zejména dostupností dusíku a uhlíku. Transkripční faktor NtcA hraje klíčovou roli v regulaci asimilace dusíku prostřednictvím regulace GS.

### 2.1.1. Asimilace dusičnanů a dusitanů

Příjem sloučenin obsahujících dusík vyskytujících se v prostředí často v nízkých koncentracích (1  $\mu\text{M}$ ) do buněk probíhá skrz permeasy, které jsou lokalizovány v cytoplasmatické membráně. Ukázalo se, že na příjmu dusičnanů, dusitanů (Omata a kol., 1993; Luque a kol., 1994) nebo močoviny (Valladares a kol., 2002) se u řady cyanobakterií podílí vícesložkový ABC typ permeas. ABC typ permeas je potřebný k transportu argininu a glutaminu (Quintero a kol., 2001). Tyto permeasy využívají ATP k řízení aktivity a koncentračnímu přenosu jejich substrátů. Intracelulární dusičnan je postupně redukován na dusitan a amoniak pomocí nitrátreduktasy a nitritreduktasy, které jsou produkty *narB* a *nir* genů (Rubio a kol., 1996, Luque a kol., 1993). Tyto geny jsou u řady cyanobakterií seskupeny společně s geny kódujícími nitrátpermeasu za tvorby *nir* operonu (Frías a kol., 1997). Asimilace nitrátu je potlačena v přítomnosti amoniaku, který představuje nejdůležitější zdroj dusíku pro cyanobakterie (Herrero a kol., 2001).

### 2.1.2. Fixace dusíku

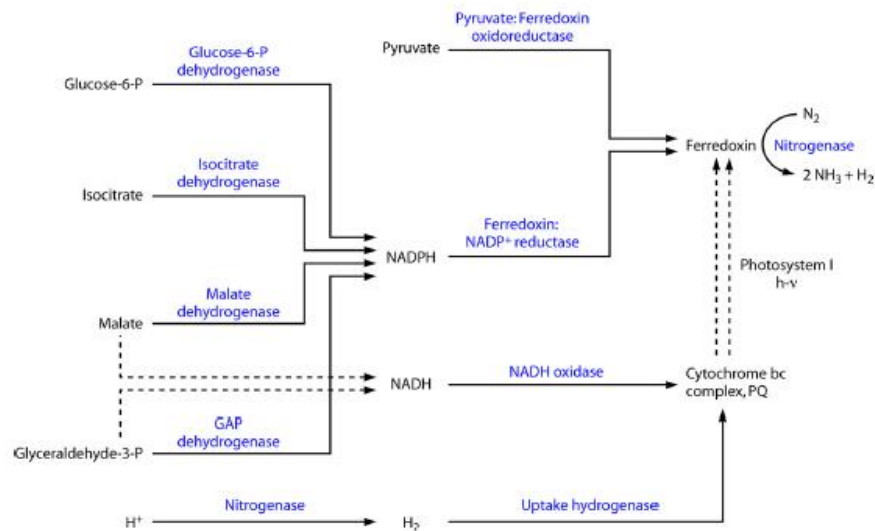
Mnoho sinic dokáže fixovat atmosférický dusík za aerobních podmínek i ve velkém množství. Biologická fixace dusíku je katalyzována enzymem nitrogenasou, která se skládá ze dvou metaloproteinů, proteinu železa (Fe) a proteinu molybden-železa (MFH). Molekula dusíku se skládá ze dvou atomů dusíku spojenými trojnou kovalentní vazbou, díky ní je molekula velmi inertní a nereaktivní. Nitrogenasa katalyzuje rozbití této vazby přidáním tří vodíkových atomů ke každému atomu dusíku (Stephen a kol., 2011). Zatímco některé vláknité sinice (např. *Nostoc*) omezí nitrogenasu na heterocyty, diferencované buňky specializované pro samotnou fixaci dusíku, některé další vláknité kmeny stejně jako jednobuněčné, poskytují aktivitu nitrogenasy ve tmě. (Capone a kol., 1997).

Transport elektronů k nitrogenase byl u heterocytických sinic detailně prostudován. Heterocyty mají velice aktivní cyklickou fosforylaci závislou na ferredoxinu a fotosystému I (Bothe, 1969), která generuje ATP potřebný pro fixaci dusíku. Tyto buňky mají několik Fe-S proteinů podobných ferredoxinu (Fdx). Jeden z nich, speciální FdxH, je exprimován pouze v heterocytech a slouží jako přenašeč elektronů na nitrogenasu. Nicméně mutanti s mutacemi v FdxH mohou rovněž provádět fixaci dusíku vysokou rychlostí (Masepohl a kol., 1997), což naznačuje, že tento protein může být nahrazen jinými. Další ferredoxinu podobný protein, FdxB (PatB), je specificky exprimován v heterocytech (Jones a kol., 2003). Redukční ekvivalenty pro redukci ferredoxinu mohou být syntetizovány několika reakčními cestami (Obr. 3).

V heterocytech, které jsou vystaveny světlu, může být ferredoxin redukován fotosystémem I. Další možností je, že NAD(P)H a dehydrogenasa nebo  $\text{H}_2$  a přijímací hydrogenasa (viz níže) může přivádět elektrony na plastochinon (nebo blízko něho). Ve tmě může být ferredoxin redukován

NAD(P)H a NAD(P)H:ferredoxin oxidoreduktasou (FNR) přítomnou v heterocytech a vegetativních buňkách.

Redukce ferredoxinu může být také dosažena pyruvát – fosforoklastickou reakcí. Zde jsou pyruvát a koenzym A štěpeny na acetyl koenzym A a  $\text{CO}_2$  a zbylé 2 elektrony jsou přeneseny na ferredoxin. Reakce je katalyzována enzymem pyruvát:ferredoxin oxidoreduktasou (PFO), který se běžně vyskytuje v anaerobních organismech, a to jak v obligátních (*Clostridium*), tak ve fakultativních (*Escherichia coli*). U samotných sinic se výskyt PFO nadále zkoumá. Enzym byl původně pozorován u *Anabaena variabilis* (Leach a kol., 1971), mnohem podrobněji byl ale popsán u *Anabaena cylindrica* (Neuer a kol., 1982), kdy extrakty z této sinice katalyzovaly redukci methyl viologenu (jako umělé náhrady ferredoxinu) závislou na pyruvátu za vzniku  $\text{CO}_2$  a syntézy acetohydroxamátu. Reverzní reakce, syntéza z pyruvátu z acetyl koenzymu A,  $\text{CO}_2$  a redukovaného ferredoxinu, byla také prokázána (Bothe a kol., 2010).



**Obrázek 3** Vytváření reaktantů pro fixaci  $\text{N}_2$  u cyanobakterií (převzato z Bothe a kol., 2010)

Mnoho neheterocytických sinic je schopno fixovat dusík, ale prakticky všechny z nich tak činí pouze za anaerobních podmínek, nebo přesněji za snížené koncentrace kyslíku. Ukázalo se, že v některých z nich probíhají tyto dvě nekompatibilní reakce odděleně: fotosyntetická fixace  $\text{CO}_2$  probíhá za světla a fixace  $\text{N}_2$  probíhá za tmy. Proto není v noci nitrogenasa vystavena fotosynteticky produkovanému kyslíku a většina kyslíku ze vzduchu je využita v procesu respirace za vytvoření anaerobních podmínek, a to zejména v hustých kulturách nebo v biofilmech. Nicméně ne všechny neheterocytické sinice vykazují tento cirkadiánní rytmus (Bothe a kol, 2010) a fixace dusíku za světla zůstává u těchto cyanobakterií záhadou

### 2.1.3. Asimilace amoniaku

Amoniak vstupuje do buňky dvěma způsoby, difuzí v případě plynné formy  $\text{NH}_3$  nebo za pomoci specifických permeas v případě formy  $\text{NH}_4^+$ . Velkým zjištěním byl fakt, že enzym glutamátdehydrogenasa začleňující amoniak, je u sinic přítomen pouze v malém množství, nebo zcela chybí (Hoare a kol., 1967; Pearce a kol., 1969). Hlavní metabolickou dráhu asimilace amoniaku u sinic představuje dráha glutaminsyntetasa-glutamátsyntasa GS-GOGAT (Obr. 3). Tato dráha reprezentuje spojovací krok mezi metabolismem uhlíku a dusíku. První enzym GS-GOGAT dráhy, glutaminsyntetasa (GS), syntetizuje glutamin z glutamátu a amoniaku katalytickou reakcí, která vyžaduje energie ATP a bivalentní kationty ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). Aktivita a syntéza GS je regulována v reakci na C a N signály. U cyanobakterií je GS modulována na transkripční a posttranskripční úrovni v závislosti na zásobení uhlíkem a dusíkem. Oba regulační systémy jsou pod kontrolou transkripčního faktoru NtcA, který u sinic kontroluje transkripci genů regulovaných dusíkem. NtcA také potlačuje syntézu dvou inhibičních polypeptidů (IF7 a IF17), které inaktivují GS přímou protein-proteinovou interakcí (Muro-Pastor a kol., 2003).

U cyanobakterií existují dva rozdílné typy glutaminsyntetas. První typ je kódovaný genem *glnA*, druhý genem *glnN*. Glutamátsyntasa syntetizuje glutamát z glutaminu, přenosem jeho amidové skupiny na 2-oxoglutarát. U fotosyntetických organismů byly objeveny dva typy GOGAT drah. První typ využívá ferredoxin, druhý NADH jako donor elektronů. Isocitrátdehydrogenasa (IDH) je enzym odpovědný za syntézu 2-oxoglutarátu, metabolitu potřebného pro funkčnost GS-GOGAT cyklu. 2-oxoglutarát syntetizovaný IDH vstupuje přímo do GS-GOGAT cyklu, protože cyanobakterie mají neúplný citrátový cyklus a 2-oxoglutarát není spotřebován pro tvorbu energie.

### 2.1.4. Asimilace močoviny

Močovina představuje důležitý zdroj dusíku pro mnoho mikroorganismů, zahrnujících některé bakterie, kvasinky, houby a řasy. Ačkoliv některé kvasinky a řasy rozkládají močovinu prostřednictvím ATP a enzymu amidolasy, většina mikroorganismů využívá amidohydrolasu obsahující  $\text{Ni}^{2+}$  nebo ureasu (Valladares a kol., 2002).

Současné znalosti o asimilaci močoviny u cyanobakterií zahrnují identifikaci strukturních genů a genů kódujících přenašeče močoviny. Strukturní geny *ureA*, *ureB* a *ureC* mohou kódovat typické bakteriální ureasy a také přídatné geny potřebné k produkci a aktivaci ureasy, enzymu, který nese bi-nikl centrum, které bylo identifikováno v řadě cyanobakterií, např. *Nostoc* PCC 7120.

Přenos močoviny je zprostředkován sekundární permeasou, Amt (Montesinos a kol., 1998; Vázquez-Bermúdez a kol., 2002). Močovina je degradována na  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{CO}_2$  bakteriální ureasou obsahující nikelnaté ionty. Jsou-li cyanobakteriální buňky inkubovány v přítomnosti omezené koncentrace močoviny, ale s dostatečným zásobením uhlíkem, vycítí buňky vysoký poměr C a N, který určuje expresi genů kódujících permeasy a enzymy potřebné k efektivní asimilaci močoviny

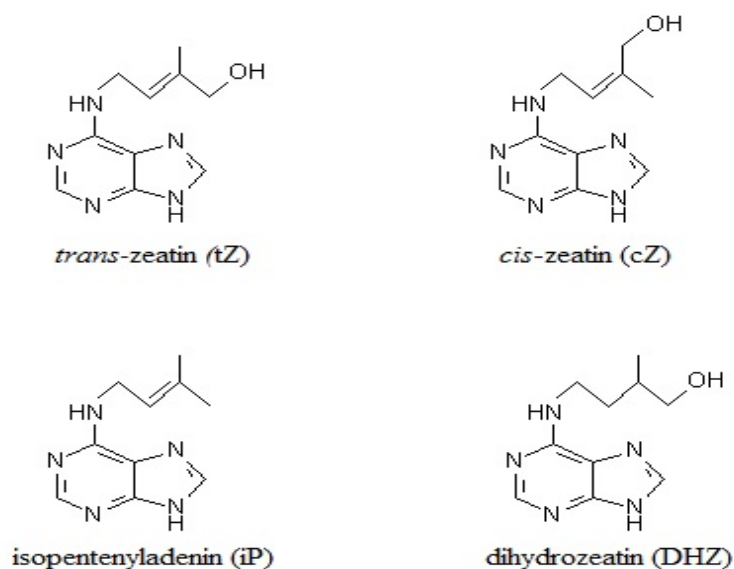
nebo asimilaci alternativních dusíkatých zdrojů. Tato aktivace genové exprese potřebuje transkripční faktor NtcA (Vega-Palas a kol., 1990).

## 2.2. Interakce mezi cytokininy a dusíkem ve vývoji rostlin

### 2.2.1. Cytokininy

U objevu cytokininů (CK) stála hlavně laboratoř F. Skooga již ve 20. letech minulého století. První izolovaná látka byla pojmenována kinetin, a to podle své schopnosti regulovat cytokinesi (Galuszka a kol., 2008). Přítomnost jednotlivých druhů cytokininů závisí na rostlinném druhu a rostlinné tkáni (Hirose a kol., 2008), rovněž také vývojové fázi (Emery a kol., 1998; Quesnelle a Emery, 2007) a environmentálních podmínkách (Takei a kol., 2001; Vyroubalová a kol., 2009).

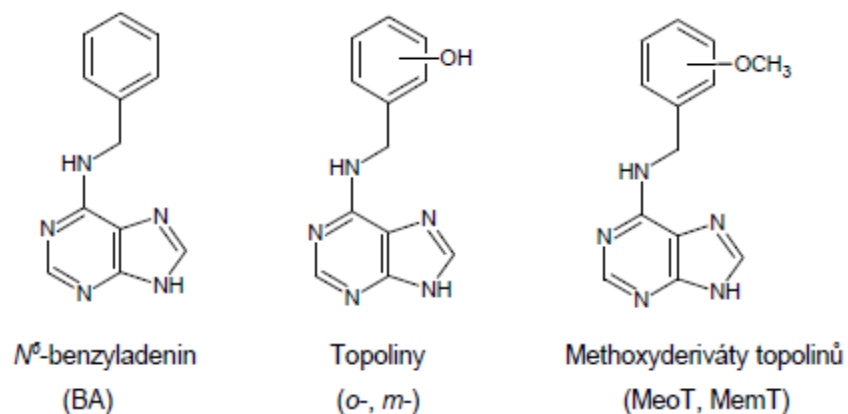
Cytokininy řadíme mezi rostlinné hormony, které spolu s auxiny hrají roli v kontrole vývojových procesů v rostlinách jako je buněčné dělení a diferenciaci, tvorba a růst kořenů, apikální dominance a senescence (Hoyerová a kol., 2006). Také ovlivňují vývoj chloroplastů, opad listů a reakce rostliny na stresové podmínky (Mok a Mok, 2001). Cytokininy, stejně jako další signalizační molekuly, působí při velmi malých koncentracích (1-50 pmol /g čerstvé hmoty, Galuszka a kol., 2008). Z chemického hlediska jsou přírodní cytokininy deriváty adeninu, které mají na pozici  $N^6$  isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec (Frébort a kol., 2011). Cytokininy s isoprenoidním postranním řetězcem (Obr.4) nejčastěji představují nejčastěji se vyskytující typy, mezi které zařazujeme  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)-adenin (iP), trans-zeatin (tZ), cis-zeatin (cZ) a dihydrozeatin (DHZ). Od ostatních isoprenoidních cytokininů (tZ, cZ a DHZ), u kterých je řetězec zakončen hydroxylovou skupinou, se  $N^6$ -isopentenyladenin odlišuje tím, že nese nemodifikovaný postranní řetězec dimethylallylu (Sakakibara, 2006).



Obrázek 4. Struktura isoprenoidních cytokininů



Do skupiny aromatických CK patří kinetin, benzyladenin a o-, m-, p-topolin a jejich methoxyderiváty (Obr. 5) (Mok a Mok 2001; Sakakibara, 2006).



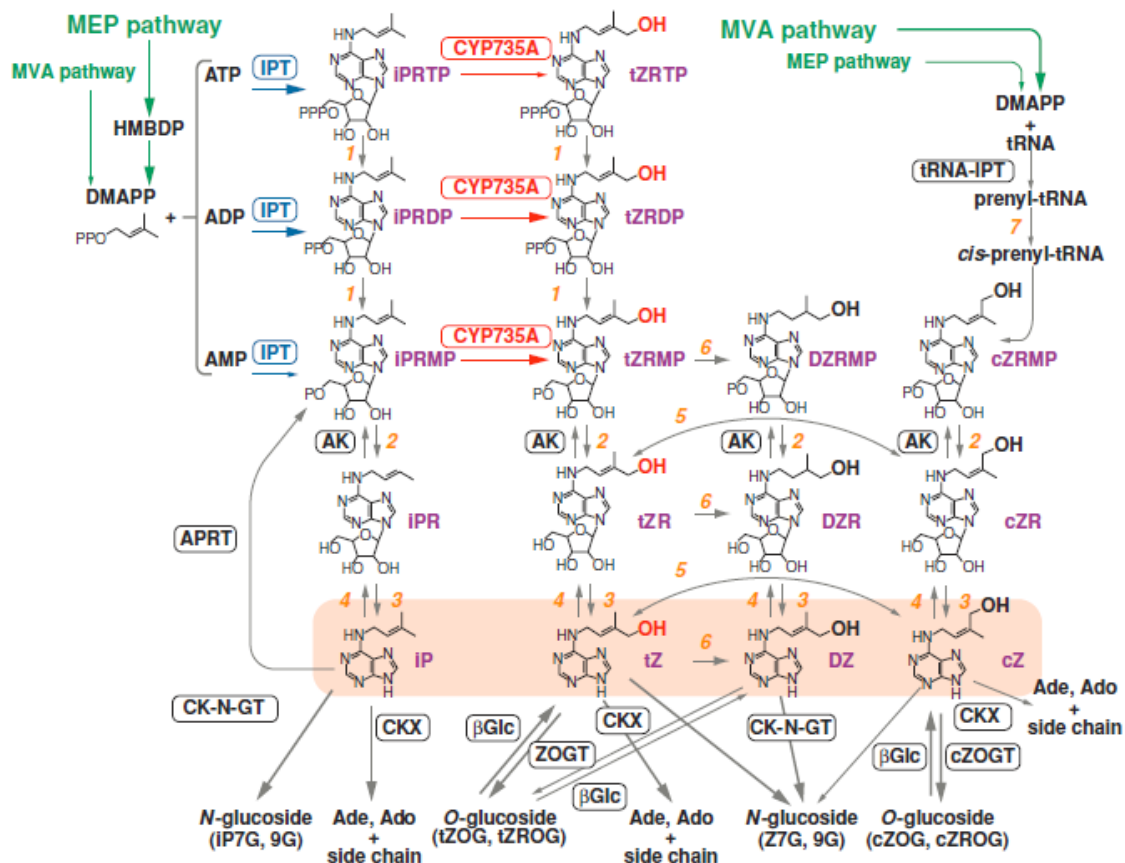
**Obrázek 5.** Struktura aromatických cytokininů

Většina přírodních CK je přítomna jak ve formě volných bází, tak ve formě nukleotidů, nukleosidů, konjugátu s xylosou, glukosou nebo aminokyselinovým zbytkem, jako je alanin (Spíchal, 2012).

## 2.2.2. Biosyntéza cytokininů

Cytokiny jsou syntetizovány zejména v kořenech, ale také ve stoncích rostlin (Letham, 1994; Nordström a kol., 2004). Podstatou primární biosyntézy CK jsou reakce katalyzované enzymy isopentenyltransferasami (IPT), které se vyskytují ve formách adenosinfosfát-IPT a tRNA-IPT (Werner a Schmülling, 2009).

Adenosinfosfát-IPT katalyzuje přenos isopentenylu z dimethylallyl pyrofosfátu (DMAPP) nebo 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfátu (HMBDP) na  $N^6$  adenosin 5'-mono-, di- nebo trifosfátu (Kakimoto, 2001). Produktem této biosyntézy jsou isopentenyladenosin-5'-fosfáty. tRNA-isopentenyltransferasa katalyzuje N-prenylaci adenosinu vázaného na tRNA (Kasahara a kol., 2004). Následný krok biosyntézy CK spočívá v hydrolytické aktivaci cytokininových nukleotidů za pomoci fosforibohydrolasy (tzv. Lonely Guy; LOG). LOG je enzym, který byl poprvé popsán u rýže (*Oryza sativa*) a jehož úkolem je odštěpení ribosa 5'-monofosfátu z CK nukleotidu. Svou expresí je mapován především ve špičce vrcholového meristému stonku (Kurokawa a kol., 2007). Cytokiny odvozené od tZ jsou syntetizovány z iP nukleotidů, které jsou hydroxylovány za účasti cytochromu P450 monooxygenasy (Takei a kol., 2004). (Obr. 6)



Obrázek 6. Schéma biosyntézy a metabolismu cytokininů (převzato z Werner a Schmülling, 2009)

V rostlinách existují dvě dráhy pro syntézu prekurzorů isoprenoidních CK (Obr. 6). Melavonátová dráha (MVA) působící také v živočiších, houbách, archea i některých bakteriích začíná kondenzací tří molekul acetyl-CoA a následnou redukcí na mevalonát. Tato redukce je inhibována statiny (např. lovastatin nebo mevastatin). Mevalonát je následně dvakrát fosforylován za vzniku mevalonát-5-difosfátu. Další fosforylace je poháněna isopentenylfosfátem (IPP), který izomerizuje na DMAPP. Methylerythritolfosfátová dráha (MEP) lokalizovaná v plastidech začíná kondenzací pyruvátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu produkující 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát. Ten je následně převeden na methylerythritol fosfát. Tento krok je katalyzován enzymem reduktoisomerasou, který je inhibován phosphidomycinem (Proteau, 2004). Methylerythritol fosfát je konjugován s cytidylfosfátovou částí, po které následuje další fosforylace, uvolňování cyklického monofosfátu CMP a cyklizace. Snížení výnosů HMBDP, který může být dále redukován na isopentenyl pyrofosfát, a dokonce v menší míře na DMAPP. I když je úroveň HMBDP v plastidech 5 krát vyšší než DMAPP, mohou oba pracovat jako prekurzory cytokininů (Sakakibara a kol, 2004).

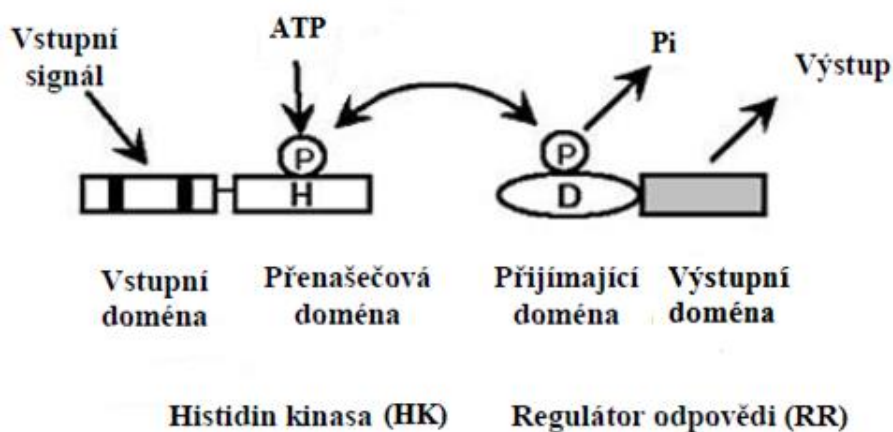
Z biologického hlediska nejvíce aktivní cytokinininy odvozené od tZ a iP jsou v rostlinách produkovány převážně biosyntetickou dráhou lokalizovanou v chloroplastech pomocí ATP/ADP IPT. I když se můžeme setkat s některými rozdíly, probíhá biosyntéza CK u bakterií v podstatě jako u rostlin: de novo syntézou a degradací tRNA. *Nostoc* PCC 7120 a *Anabaena variabilis* ATCC 29413 mají geny pro tRNA- i de novo IPT, vysoce homologní k rostlinným IPT (Frébort a kol., 2011). Měřením afinity IPT *Arabidopsis thaliana* a *Agrobacterium tumefaciens* k akceptoru ATP, ADP a AMP bylo zjištěno, že rostlinná IPT upřednostňuje ATP a ADP, zatímco bakteriální IPT má pro změnu vysokou afinitu k AMP. Cytokinininy také vznikají degradací tRNA. Byly zjištěny v hydrolyzátech tRNA nesoucí antikodon komplementární ke kodónu začínajícímu uracilem. V antikodónu se nachází prenylovaný adenosin (Sakakibara, 2006). Tímto způsobem se získává v rostlinách maximálně 40 % cytokininů (Kakimoto, 2003).

### **2.2.3. Degradace a inaktivace cytokininů**

Nedílnou součástí v regulaci cytokininové aktivity v rostlinách představuje proces degradace, který je katalyzován cytokinindehydrogenasou (CKX). Klíčová role spočívá v odstranění postranního řetězce cytokininu na C6 uhlíku. Vzniká tak adenin a vedlejší postranní řetězec. Purinová báze může být dále využita v dalších metabolických dráhách, např. v syntéze mastných kyselin. Spochnost oxidovat všechny typy cytokininů, například *O*-glukosidy nebo cytokinininy s nasazeným aromatickým řetězcem, je u SCX značně omezená (Taiz L, Zeiger E, 2010; Macháčková I, 1998). Tyto cytokinininy mohou být inaktivovány konjugací glukosy v pozicích N3, a N9 na adeninovém kruhu (Sakakibara, 2006).

## 2.2.4. Signální dráha cytokininů

Rozhodujícím a klíčovým mechanismem pro vnitrobuněčný přenos signálu založeným na fosforylaci proteinů proteinkinasami je dvoukomponentní systém (two-component regulatory system) neboli TCS, který využívají zejména prokaryotické organismy jako reakci na extracelulární signál (Hoch 2000; Stock, Robinson a kol., 2000). Byl také objeven u rostlin, kvasinek, a hub. Původně byl tento systém studován na bakteriálním systému, kde slouží jako mechanismus kontroly genové exprese v odpovědi na přírodní podmínky. Mechanismus přenosu signálu v TCS je založen na přenosu fosfátové skupiny mezi histidinem (His) a asparaginem (Asp) (Imamura a kol., 1999). TCS se skládá ze dvou samostatných proteinů: histidinkinasového senzoru (HK) a regulátoru odpovědi (RR, response regulator), který je charakteristický přítomností přijímací domény. Autofosforylace His zbytků u bakterií nastane v přenašečové doméně. Tím dojde k převedení fosfátové skupiny na aspartát přijímací domény (Kakimoto, 2003). Některé bakterie využívají systémy, ve kterých se vyskytují sensorové HK, nesoucí přijímací doménu (Kato a kol., 1997), a zároveň jsou obvykle lokalizovány ve vnitřní membráně bakteriálních buněk. Faktory podílející se na TCS systému u eukaryot jsou mnohem komplikovanější. Eukaryotické HK jsou až na několik HK (*Sln1* *Saccharomyces cerevisiae* a další) lokalizovány v cytoplazmatické membráně (Kanamaru, 2011). Obsahují dále histidin fosfopřenašečový protein (HPt) domény, které nesou fosforylovaný histidinový zbytek, podílející se také na přenosu fosfátu (Kato a kol., 1997). Zahájení signalizační kaskády je způsobeno vazbou biologicky aktivních CK na doménu CHASE histidinkinasového receptoru a autofosforylací histidinu. Na přijímací doménu je poté přenesena fosfátová skupina Asp – zbytku a poté na AHP protein (*Arabidopsis* histidin phosphotransfer protein). Signál je dále přenesen na regulátor odpovědi (Werner a Schmölling, 2009).



Obrázek 7 Model dvousložkového systému (upraveno z Kakimoto, 2003)

## 2.2.5. Osud rostliny řízený dusíkem

Dusík představuje důležitý bioelement, který byl začleněn do biosféry pomocí asimilačních procesů na základě působení mikroorganismů a rostlin (Merrick a Edwards, 1995). Dusík tvoří důležitou limitující živinu pro růst a vývoj rostlin (Kamada-Nobusada a kol., 2013). Po chemické stránce je molekula  $N_2$  velmi stabilní a k jejímu zapojení do oběhu v živých organismech je nepostradatelná její redukce na amonné ionty. Samotná redukce molekulárního dusíku probíhá jen u nemnoha prokaryotních organismů např. půdních bakterií rodů *Azotobacter* a *Clostridium* nebo sinice rodu *Nostoc* (Zehnálek a kol., 2006).

V biosféře je pak přítomen v různých chemických formách. Je absorbován z půdy v anorganické formě v podobě dusičnanu nebo amonných iontů, nebo organické formě, nejčastěji jako volná aminokyselina (Vance, 2001; Miller a Cramer, 2004). U rostlin se vyskytuje převážně ve formě amonných iontů ( $NH_4^+$ ), dusitanů ( $NO_2^-$ ) a dusičnanů ( $NO_3^-$ ).

$N_2$  vstupuje do biologického cyklu třemi směry: biologickou fixací, atmosférickou (spontánní) fixací a Haber-Boschovou průmyslovou fixací. Aminokyseliny, močovina, malé polypeptidy a další biomolekuly obsahující dusík mohou být poté uvolněny zpět do životního prostředí pomocí rozkladu organické hmoty. Tyto organické formy N mohou být také využity pro rostliny a jiné organismy (Jones a kol., 2005).

Dostupnost anorganického dusíku v rhizosféře je rozhodujícím faktorem určujícím rychlost růstu a vývoj rostliny (Takei a kol., 2002). Přítomnost anorganických dusíkatých zdrojů se liší v závislosti na půdních podmínkách. Hlavní formu ve všech přírodních půdách představují dusičnany, zatímco  $NH_4^+$  mohou převažovat za méně příznivých podmínek, např. v rýžových polích. Metabolismus a signalizace CK jsou úzce spojeny s dostupností dusíku (Ruffel a kol., 2011).

## 2.2.6. Biosyntéza CK v přítomnosti dusičnanu

Bylo prokázáno, že kyselina abscisová (ABA), auxiny, a CK hrají roli v koordinaci potřeby a získávání dusíku. Obecně se dá říci, že se systém příjmu skládá z nízko a vysoko afinitních transportérů dusíku kódovaných skupinou genů z rodiny NRT1a NRT2. Exprese NRT genů je regulována mnoha signály. Například, AtNRT2.1, který utváří hlavní část systému vysoko-afinitních transportérů dusíku, je indukován dusičnanem a cukrem, a potlačován asimilačními produkty dusíku a CK (Kiba a kol., 2011).

Exogenní aplikace cytokininů může částečně překonat limitující efekty růstu způsobené nízkou hladinou zásob dusíku v jitrocelu větším (Kiba a kol., 2011). Zásobením dusičnanem způsobuje zvýšení obsahu CK v míze xylému (také v kořenech a výhoncích) kukuřice (Takei a kol., 2001), což naznačuje, že CK funguje jako dálkový signál mezi výhonkem a kořenem (Kiba a kol., 2011). Podobné souvislosti byly zaznamenány také u *Arabidopsis* (Takei a kol., 2004). Kromě toho bylo zjištěno, že klíčení semen *Arabidopsis* pěstovaný při vysokých koncentracích dusičnanů

HN (high nitrate), 10 mM) obsahuje vyšší hladiny CK, než jaké by obsahoval za nízké koncentrace dusičnanů (Miyawaki a kol., 2004; Matsumoto-Kitano a kol., 2008).

V přítomnosti dusičnanu se zvyšuje exprese jednoho z AtIPT genů (AtIPT3). Akumulace CK v přítomnosti dusíku byla značně utlumena u *atipt3* mutantu, což značí, že AtIPT3 je klíčový determinant biosyntézy závislé na dusičnanech (Miyawaki a kol., 2004; Takei a kol., 2004). Exprese AtIPT3, která je podmíněna přítomností dusičnanů, byla také pozorována v izolovaných výhoncích. Microarray analýza ukázala, že exprese AtIPT3 závislá na dusíku je částečně zprostředkována NRT1.1/CHL1 (NRT1.1) proteinem, který funguje jako transportér dusičnanů a zároveň indikátor dusičnanů (Liu a kol., 1999; Ho a kol., 2009; Wang a kol., 2009). Exprese AtIPT3 probíhá ve floému celé rostliny, a tento vzorec exprese se překrývá s NRT1.1 expresí v kořenech. Ve výhoncích je NRT1.1 exprese detekována pouze v mladých listech (Guo a kol., 2001).

### 2.2.7. Regulace příjmu dusíku CK

CK, které jsou produkovány lokálně v kořenech, nebo translokovány ve výhoncích mohou signalizovat dostatek přítomného dusíku. V této souvislosti je jednou z navržených rolí CK negativní regulace genů, které ovlivňují příjem dusíku. Microarray analýzy ukázaly, že exogenní aplikace CK potlačuje u *Arabidopsis* dva AtNRT2 geny (2.1 a 2.3), tři geny ovlivňující transport amonných iontů, tři geny ovlivňující transport aminokyselin a transportní gen pro močovinu. Protože úroveň exprese AtNRT1 dobře koreluje s nízkoafinitní a AtNRT2 s vysokoafinitní transportní aktivitou dusičnanů je pravděpodobné, že represe AtNRT genů cytokininy vede ke snížení aktivity příjmu dusičnanů (Kiba a kol., 2011).

CK potlačuje expresi všech kořenových AtNRT genů. Represe byla pozorována jak za HN (high nitrate), tak LN (low nitrate) podmínek, z čehož vyplývá, že cytokininový efekt je nezávislý na stavu dusíku v rostlině. Na druhou stranu, u dalších fytohormonů nebyla pozorována tak konzistentní represe, což naznačuje, že efekt cytokininů je specifický (Kiba a kol., 2011).

Také bylo zaznamenáno, že CK negativně reguluje další geny vztahující se k získávání živin (pro *Arabidopsis*), jako jsou vysokoafinitní fosfátové transportní, vysokoafinitní transportní geny síranů (SULTR1:2 a SULTR1:4), a geny aktivující se při nízké hladině železa (IRT1, FRO2 a FIT). Podobná regulace byla také zaznamenána u rýže, což ukazuje, že regulace genů vztahujících se k získávání živin cytokininy je běžným mechanismem jak u dvouděložných, tak u jednoděložných rostlin. Efekt CK na AtNRT geny je zprostředkovan cytokerinovými receptory; dvojitý mutant receptorů CRE1 a AHK3 vykazoval sníženou citlivost k represí cytokininy (Kiba a kol., 2011).

## 2.3. Metody chemické analýzy cytokininů

Nejčastěji používanou metodu pro analýzu fytohormonů představuje plynová nebo kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, radioimunoanalýzou nebo enzymovou analýzou (MacDonald a kol., 1985; Strnad a kol., 1992). Zásadní krok celé analýzy spočívá v důsledné přípravě vzorků zahrnující sběr materiálu, extrakci, prekoncentraci a purifikaci. V dnešní době jsou pro analýzu používány převážně metody kapalinové chromatografie nebo kapilární elektroforézy (Tarkowski a kol., 2009). U imunoanalytických metod je vždy nutné počítat s křížovou reaktivitou protilátek, pro kvantitativní analýzu se proto využívá chromatografické předseparace vzorků (Tarkowski a kol., 2004). Kritickým ukazatelem je zde převážně kvalita použité protilátky, výhodou pak možnost jejího opakovaného použití. Životnost se při správném zacházení pohybuje v rozsahu 2-5 let (Tarkowski, 2011). Na druhou stranu nejsou tyto protilátky schopny rozpoznávat CK *O*-glukosidy, *N*-glukosidy a nukleotidy, které musí být případně odděleny konvenčními SPE metodami a enzymaticky štěpeny  $\beta$ -glukosidasou, respektive alkalickou fosfatasou (Novák a kol., 2003). V současné době představuje kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) vysoce používanou metodiku v této problematice (Zhang a kol., 2001; Chiwocha a kol., 2003; Bredmose a kol., 2005; Ge a kol., 2005). V analýze fytohormonů se stále častěji uplatňuje spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) (Podlešáková a kol., 2012).

### 2.3.1. Příprava vzorků

Klíčovým postupem v kterékoliv chemické analýze je příprava vzorků a to především u analytů přítomných ve stopovém množství nebo na úrovni ultra-stopové ve složitých matricích. Aby se zabránilo enzymatické degradaci CK, zejména defosforylaci nukleotidů, je nutné, aby byl rostlinný materiál zamražen tekutým dusíkem a skladován při teplotě -80 stupňů nebo extrahován vhodným rozpouštědlem (Tarkowski a kol., 2009).

### 2.3.2. Extrakce a purifikace

Hlavním úkolem všech extrakčních procesů je převedení látek do extrakčního činidla tak, aby v jejich průběhu nedošlo k degradaci látek a aby byl extrakční výtěžek přijatelně vysoký pro požadované spektrum metabolitů – cytokininové nukleotidy, volné báze, ribosidy, *N*-glukosidy a *O*-glukosidy. Díky tomu jsou většinou pro extrakci volena rozpouštědla jako methanol, ethanol a aceton či vícesložkové extrakční soustavy (Tarkowski a kol., 2009), mezi nimiž má klíčové postavení extrakční směs podle Bielekého, která je složena z methanolu, chloroformu, kyseliny mravenčí a vody v poměru 12:5:1:2 (Bielecki, 1964) a která vytváří příznivé podmínky pro potlačení defosforylace CK mononukleotidů. Velkou nevýhodou tohoto rozpouštědla představuje fakt, že chloroform zvyšuje extrakci lipofilních molekul, které mohou následně zkomplikovat

čištění. V posledních letech se používá extrakční směs obsahující pouze methanol, kyselinu mravenčí a vodu (15:1:4) (Hoyerová a kol., 2006). Nezbytnou součástí postupu je také přidání nejméně jednoho odpovídajícího vnitřního standardu pro sledování možných ztrát při samotném čištění cytokininů (Ljung a kol., 2004). Preventivní opatření proti degradaci CK je založeno na ztrátě funkce enzymů za snížené teploty, nejčastěji v rozmezí 4 °C až -20 °C (Tarkowski a kol., 2009).

Po samotné extrakci je provedena extrakce tuhou fází – solid phase extraction (SPE). Představuje metodu, jejímž cílem je oddělení rozpuštěných látek v kapalině na základě chemických a fyzikálních vlastností. Celý proces probíhá v plastové koloně, která je naplněná pevným sorbentem (Klouda, 2003). Stacionární fázi můžeme rozdělit na anexy a katexy, podle jejich schopnosti zadržovat ionty (anexy zadržují anionty). Na SCX sorbentu dochází k zachycení všech forem CK, jejichž purinová jádra nesou kladný náboj. DEAE interaguje s fosfátovými skupinami CK nukleotidů, zatímco zbytek směsi proteče na C18 kolonu, kde jsou na základě hydrofobní interakce zachyceny CK báze, ribosidy a glykosidy (Novák a kol., 2003, obr. 8).

Posledním krokem purifikace je vysoce specifická imunoafinitní chromatografie (IAC) založená na interakci protilátka - antigen, která poskytuje selektivně obohacený vzorek, čímž výrazně zvyšuje limity detekce stopových analýz (Hauserová a kol., 2005). Imunoafinitní chromatografie nabízí nejvýkonnější metodu pro čištění specifické třídy cytokininových metabolitů (MacDonald a Morris, 1985). Protilátky s nízkou specifitou způsobí navázání širšího spektra cytokininů. Nicméně i tyto protilátky neváží *N7* a *O*-glukosidy cytokininů (Banowetz, 1994; Jordi a kol., 2000), které je třeba analyzovat odděleně (Corbesier a kol., 2003). Cytokinin *O*-glukosidy a nukleotidy vymyté z IAC kolony, mohou být přečištěny za použití stejného typu kolon po hydrolýze  $\beta$ -glukosidasou nebo alkalickou fosfatasou. Výsledkem purifikace jsou tedy tři frakce: frakce nukleotidů, *O*-glukosidů a frakce bází a ribosidů (Novák a kol., 2003).

### **2.3.3. Kapalinová chromatografie**

Ve výzkumu rostlinných hormonů se pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS) daří kromě přesné identifikace rozdílných cytokininů také současně kvantifikovat velmi široké spektrum cytokininů v jednom kroku. Důsledkem toho se pak tento přístup stává standardem v analýze cytokininů v rostlinném materiálu (Nordstrom a kol., 2004).

Výše uvedená hmotnostní spektroskopie – na rozdíl od imunologických metod (RIA a ELISA) je také vhodná při stanovení CK nukleotidů a *O*-glukosidů, které nejsou dobře rozpoznány protilátkami (Saenz a kol., 2003; Novák a kol., 2003). Vzhledem k vysoké selektivitě hmotnostní spektrometrie mohou být různé cytokininy detekovány a stanoveny v částečně purifikovaných vzorcích (Hoyerová a kol., 2006).



Zavedení metody UPLC přineslo vyšší separační účinnost, rozlišení a selektivitu (Nguyen a kol., 2006; Wu a kol., 2007; Nováková a kol., 2009). Rychlá chromatografická separace a nízká koncentrace analytu ve vzorku vyžadovala citlivou a rychlou skenovací metodu, kterou poskytla tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Modernější ultra-účinná kapalinová chromatografie (UPLC) přinesla výrazné zkrácení doby analýzy díky menší velikosti částic o velikosti 2  $\mu\text{m}$  (UPLC) a dále umožňuje dostatečnou separaci CK včetně jejich isomerů, přičemž se obvykle využívá systému reverzních fází a gradientové eluce. 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 a kol., 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 a kol., 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 a kol., 2011).

## 3. Experimentální část

### 3.1. Biologický materiál

Pro experiment byla použita kultura *Nostoc* sp. PCC 7120 (dále jen *Nostoc* 7120).

### 3.2 Pracovní roztoky a materiál

BG 11<sub>0</sub> médium (hydrogenfosforečnan draselný 0,031g; heptahydrátsíranu hořečnatého 0,04 g; chlorid vápenatý 0,028 g; kyselina citronová 0,006 g; železitý citrát amonný 0,006 g; EDTA 0,001 g; uhličitan sodný 0,02 g; směs stopových prvků (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,86 g; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1,81 g; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,222 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,390 g; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0,079 g; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,0494 g; destilovaná voda) A5 1 ml, destilovaná voda 1 l)

BG 11 médium (BG11<sub>0</sub> + dusičnan sodný 1,5g)

β-glukosidasa (2,31 U/mg), Sigma-Aldrich, USA

Alkalická fosfatasa (±3,5 U/mg), EIA Grade, Invitrogen, USA

Bielsky extrakční pufr (60 % methanol + 25 % CHCl<sub>3</sub> + 10 % H<sub>2</sub>O + 5 % HCOOH)

SCX eluční pufr (60 % methanol, 40 % 4 M NH<sub>3</sub>)

Equilibrační směs SCX (50 % methanol + 2 % HCOOH)

PBS (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 15 mM NaCl; pH 7,2)

100 mM hydrogenuhličitan sodný (pH 9,6)

1M mravenčan amonný (pH 5)

10 mM mravenčan amonný (pH 5)

Standardy: [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]tZ, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZR, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZ9G, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZOG, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZROG, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZRMP, [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]cZ, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZ, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZR, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZ9G, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]DHZOG, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZRMP, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iP, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iPR, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iP9G, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iPRMP, (Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého, Olomouc)

Chlorid sodný, Lachner, Česká Republika

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, Lachner, Česká Republika

Hydrogenuhličitan sodný, Lachner, Česká Republika

Octan amonný, Sigma Aldrich, USA

15 mM mravenčan amonný, pH = 4,0

DEAE-Sephadex A25 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

C18 SPE kolony (100 mg, 1 ml), Varian, USABond Elut – SCX, 100 mg/1 ml (Varian, USA)

Preimunní (PI) kolony s agarosovým gelem Affi-Gel 10 (Bio-Rad Labs, Hercules, USA)

Imunoafinitní (IA) kolony s agarosovým gelem Affi-Gel 10 (Bio-RadLabs, Hercules, USA)

s monoklonálními protilátkami anticytokininu NZRD (Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého, Olomouc)

### 3.3 Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf Acquity UPLC® System (Waters, Milford, MA, USA)

Tandemový hmotnostní spektrometr Xevo TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK)

Detektor 2996 PDA (Waters, Milford, MA, USA)

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

Ultrazvuková lázeň Elmasonic S10 (Elma, Německo)

Laminární flowbox biohazard (Viterbro, Itálie)

Inkubátor INB 400 Memmert (Mettler GmbH & Co, Německo)

### 3.4. Metody

#### 3.4.1. Stanovení obsahu chlorofylu

Bylo zcentrifugováno 0,5 ml kultury *Nostoc* 7120 po dobu 5 min při 13 000 ot/min a teplotě 4°C. Bylo odebráno 0,4 ml supernatantu a ke zbytku přidáno 0,9 ml 100 % methanolu. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována ve tmě po dobu 10 min. Vzorek byl poté zcentrifugován opět při 13 000 ot/min 5 min. Změřením absorbance extraktu při vlnových délkách 665 nm a 750 nm byl zjištěn obsah chlorofylu dle vztahu (Meeks a Castenholz, 1971):

$$\text{Chlorofyl a } (\mu\text{g/ml}) = 2 * 12,7 * (A_{665} - A_{750})$$

#### 3.4.2. Příprava biologického materiálu

Za sterilních podmínek byla do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml obsahujících 50 ml média inokulována sinice *Nostoc* 7120 tak, aby koncentrace chlorofylu byla 0,1 µg /ml. Bakterie byly kultivovány v 50 ml bezdusíkatého média (BG11<sub>0</sub>) nebo média obsahujícího dusičnan sodný (BG11) v kultivační komoře SANYO MLR 350H (Sanyo; Osaka, Japonsko) 28 dní, při teplotě 24 °C s režimem den/noc 16/8 hodin. Intenzita osvětlení byla 35 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (nízká) nebo 270 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (vysoká). Vlhkost vzduchu byla 60 %. Po 4 týdnech kultivace byly buňky sklizeny centrifugací (15 min, 13 000 ot/min, 4°C). Buňky byly sklizeny 10 min před koncem temné fáze nebo 5 hodin po vystavení světlu. K přibližně 0,5 g každého vzorku v centrifugačních kyvetách bylo přidáno 15 ml Bielskíeho extrakčního pufru a směs interních standardů (30 µl 10<sup>-7</sup> M bází, 50 µl 10<sup>-7</sup> M nukleotidů a 50 µl 10<sup>-7</sup> M *O*-glukosidů). Vzorky byly extrahovány přes noc při – 20°C . Druhý den byly vzorky centrifugovány 15 min při 4°C a 13 000 ot/min. Supernatanty byly odlity do baněk, k peletu bylo přidáno dalších 15 ml Bielskíeho pufru a po promíchání směsi na vortexu byly vzorky reextrahovány 30 minut při – 20 °C. Poté byly vzorky centrifugovány a supernatanty odlity k odpovídajícím vzorkům z první extrakce.

### **3.4.3. Purifikace cytokininů z buněk *Nostoc***

#### **3.4.3.1. Purifikace pomocí SCX kolonek**

První purifikační krok spočíval v použití iontoměniče SCX (z anglického strong cation exchange). Kolonky SCX (1g/6ml) byly aktivovány 5 ml methanolu a ekvilibrovány 5 ml ekvilibračního roztoku pro SCX. Poté na ně byly naneseny extrakty jednotlivých vzorků. Po promytí 5 ml Bielského pufru a 5 ml methanolu byly vzorky eluovány do zkumavek 4 ml elučního roztoku pro SCX a odpařeny na 0,5 ml vodné fáze v centrifugační vakuové odparce.

#### **3.4.3.2. Purifikace pomocí DEAE Sephadexu a C18 kolon**

Pro další přečištění cytokininů byly připraveny kolonky s DEAE Sephadexem a C18. Prázdné kolonky a frity byly oživeny 5 ml methanolu a 5 ml vody. Posléze byly tyto kolonky propláchnuty destilovanou vodou a 1M mravenčanem amonným. Do takto připravených kolonek bylo pipetou naneseno množství DEAE Sephadexu tak, aby výsledná hladina v rezervoáru činila asi 1 ml nad fritou. Následně byla na gel vložena druhá frit, která byla dotlačena za pomoci špičky těsně nad hladinu gelu. Kolony byly poté promyty 2 ml vody a 4 ml 10 mM mravenčanu amonného. Za pomoci ultrazvuku byly odparky vzorků rozpuštěny ve 4 ml 10 mM mravenčanu a následně zvortexovány. Mezitím byly 2 ml methanolu aktivovány kolonky C18 (100 mg/ 1 ml) a ekvilibrovány 4 ml 10 mM mravenčanu amonného. Stejným roztokem byl rezervoár kolony naplněn o přebytečnou kapku, pomocí které byly obě kolony vzájemně spojeny (Obr. 8) a promyty 10 ml 10 mM mravenčanu amonného. Na spojené kolonky DEAE-Sephadex a C18 byly naneseny rozpuštěné odparky vzorků, posléze byly promyty ještě dalšími 6 ml 10 mM mravenčanu amonného. Frakce nukleotidů byla zachycena na DEAE-Sephadexu, zatímco frakce volných bází a *O*-glukosidů na sorbentu C18. Posléze byly kolonky rozpojeny a DEAE Sephadex kolonky byly spojeny s novými C18 kolonkami, které byly aktivovány a ekvilibrovány stejně, jako v předchozím případě. Na DEAE Sephadex bylo naneseno 10 ml 1 M mravenčanu amonného, čímž došlo k eluci nukleotidů z DEAE Sephadexu a jejich zachycení na spodní koloně C18. Na závěr se pracovalo pouze s C18 kolonkami. Z nich byly zachycené cytokininy eluovány do zkumavek pomocí 4 ml 80% methanolu + 2% kyseliny octové. Finální frakce (eluáty) byly odpařeny do sucha při 37°C na centrifugační vakuové odparce.

#### **3.4.3.3. Imunoafinitní chromatografie**

Poslední purifikační krok spočíval v imunoafinitní chromatografii. Před samotnou purifikací na imunoafinitních kolonkách byly zařazeny preimunní (PI) kolony, za jejichž pomoci jsou z extraktů odstraněny sloučeniny interagující nespecificky s matricí. Mezi každým vzorkem byla provedena regenerace kolon postupně 9 ml vody, 3 ml methanolu, 9 ml vody a 6 ml PBS. Odpařené vzorky bází a *O*-glukosidů byly rozpuštěny v 50  $\mu$ l 70% EtOH a 450  $\mu$ l PBS. K vzorkům bylo přidáno 500

μl PBS, které byly následně naneseny na preimunní kolony. Po projití preimunními kolonami byly vzorky následně 5 x prokapány přes imunoafinitní kolonku (při pátém nanesení byly vzorky 30 min inkubovány s matricí). V tomto kroku došlo k oddělení *O*-glukosidů, které zůstaly v promývacím roztoku. Báze byly získány elucí 3 ml MeOH (-20 °C). Eluáty jednotlivých frakcí byly odpařeny do sucha ve vakuové odparce.

#### **3.4.3.4. Enzymatické štěpení**

Princip tohoto kroku je založen na štěpení *O*-glukosidových (OG) a nukletidových (NT) frakcí enzymy β-glukosidasou nebo alkalickou fosfatasou, za účelem převedení na volné báze. K odpařeným OG frakcím bylo přidáno 200 μl 100 mM NH<sub>4</sub>COOCH<sub>3</sub> (pH 5,0) a poté 50 μl β-glukosidasy ve 100 mM pufru (0,1 mg/1 g živé hmoty). Vzorky byly inkubovány v termostatu za tmy při 37 °C. Po hodinové inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 750 μl PBS. Vzorky byly opakovaně nanášeny na IA kolony (viz imunoafinitní chromatografie). OG frakce byly eluovány 100% MeOH (-20 °C) a odpařeny do sucha. K odpařeným vzorkům NT frakcí bylo přidáno 20 μl 70% EtOH, 180 μl 100 mM hydrogenuhličitanu sodného a 50 μl alkalické fosfatasy (AP). AP je enzym, jehož hlavním úkolem je odštěpit fosfátové skupiny nukleotidů za vzniku ribosidů. Vzorky byly inkubovány ve tmě (2 hod. při 37 °C), poté bylo přidáno 250 μl PBS a vzorky byly čištěny na PI a imunoafinitní kolonce. Po promytí kolon byly NT frakce eluovány 3 ml MeOH (-20 °C). Eluáty byly odpařeny do sucha ve vakuové centrifugační odparce a skladovány při -20 °C.

#### **3.4.4. Stanovení cytokininových metabolitů metodou UPLC- MS**

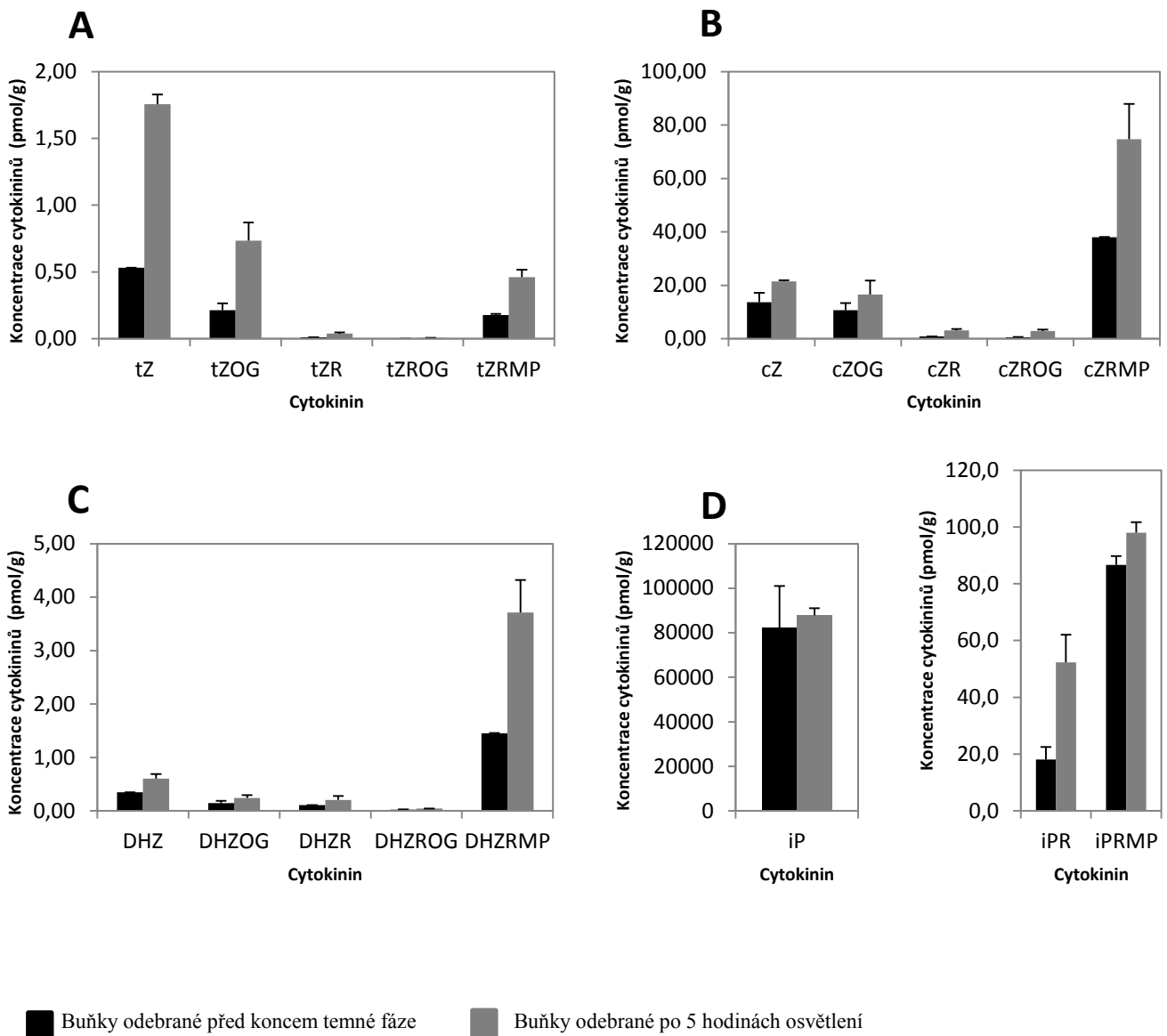
Pro stanovení cytokininů metodou UPLC-MS/MS byly všechny vzorky rozpuštěny ve 20 μl směsi MeOH s 15mM NH<sub>4</sub>COOH, pH 4 (10:90) a převedeny do vialek s mikro-insertem o objemu 0,1 ml. Na kolonu s reverzní fází (BEH C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 μm; Waters) bylo nastříknuto vždy 15 μl každého vzorku. Separace při průtokové rychlosti 0,5 ml/min, teplotě kolony 40 °C a lineárním gradientu methanolu a 15 mM mravenčanu amonného (pH 4,0) v poměru od 10:90 do 100:0 trvala 8 minut. Po kladné ionizaci byl analyt detekován MS/MS v režimu MRM. Analýza byla provedena dle následujících podmínek: teplota zdroje/odpařovacího plynu 120/550 °C; napětí na kapiláře 2,1 kV; průtok plynu v kuželu/po odpaření 600l/h; LM/HM rozlišení 12,5; energie iontů 1 0,9 V; energie iontů 2 0,5 V; vstupní napětí 2,0 V; výstupní napětí 2,0 V a napětí násobiče 650 eV. Jako kolizní plyn byl použit argon. Pro jednotlivé přechody bylo napětí kužele, kolizní energie a doba prodlevy optimalizována pro maximální citlivost. Doba prodlevy pro každý MRM kanál byla vypočtena na 16 skenovacích bodů na pík, během této doby bylo mezikanálové zpoždění 0,1 s a doba cyklů byla 0,55 – 0,65 s. Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Acquity UPLC™ System s detektorem 2996 PDA a hmotnostním analyzátozem XEVO TQ MS (metoda modifikovaná podle Novák a kol., 2008).

## 4. Výsledky a diskuze

Přítomnost cytokininů u cyanobakterií byla publikována v několika studiích, které analyzovaly výskyt cytokininů např. u *Phormidium animale*, *Calothrix*, *Arthronema africanum*, *Anabaena*, *Chroococcidiopsis*, *Synechocystis* (Stirk a kol., 1999; Stirk a kol., 2002; Hussain a kol., 2010). Analýzy ukázaly různý obsah *trans*- a *cis*-zeatinu, zeatin ribosidu, zeatin *O*-glukosidu, a dihydrozeatin ribosidu v sinicích, kdy *cis*-zeatin představoval nejhojnější skupinu, s výjimkou *Anabaeny*, kde nebyl detekován vůbec (Frébort a kol., 2011). Sinice vykazují reakci na vnější přidání CK podporou růstu (Kapoor a Sharma 1981, Suzuki a kol., 2004) a zvýšením rychlosti transkripce (Selivankina a kol., 2006). Studie v oblasti metabolismu cytokininů u cyanobakterií stále nejsou uzavřenou záležitostí. Do dnešní doby nebyly zdaleka objasněny vzájemné interakce a mechanismy. Můžeme se pouze domnívat, že některé sinice obsahují minimální genetický aparát potřebný pro řízení biosyntézy a metabolické kontroly hladiny CK, který se později vyvinul do složitějšího systému.

Z úhlu pohledu vztahu mezi genetickým aparátem a cytokininem je nutné uvést i aplikaci cyanobakterií, protože jsou schopny syntetizovat různé druhy rostlinných hormonů: kromě výše uvedených cytokininů lze rovněž uvést i auxiny, gibereliny, kyselinu abscisovou, ethylén a jasmonáty (Hussain a kol., 2010). Bakterie přispívající k výživě rostlin mají pozitivní vliv na jejich růst a jsou obvykle nazývány „růst podporující bakterie“ (PGPB). Některé PGPB mohou produkovat fytohormony, jako jsou indol octová kyselina (IAA), cytokininy a gibereliny, a tak zvyšovat hladinu hormonů v rostlině (Long a kol., 2008; Islam a kol., 2009).

O funkci cytokininů u cyanobakterií není prozatím příliš známo. Na základě prací publikovaných u rostlin (Zhang a kol., 2010; Mizuno, 2004) jsme se pomocí analýzy CK v buňkách cyanobakterie kultivované za různých podmínek pokusili určit, zda u cyanobakterií existuje souvislost mezi metabolismem cytokininů, světelnými podmínkami a zdrojem dusíku pro výživu. Pro získání vstupních dat k objasnění problematiky funkce cytokininů byly stanoveny metabolity cytokininů v buňkách *Nostoc* sp. PCC 7120, které byly kultivovány v bezdusíkatém médiu (BG11<sub>0</sub>) nebo v médiu obsahujícím dusičnan (BG11) (Rippka a kol., 1979), po dobu 28 dní v růstové komoře při teplotě 24° C, v režimu 8/16 h den/noc a při vlhkosti 60%. *Noctoc* byl kultivován buď při nízké (35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nebo vysoké (270  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) intenzitě osvětlení. Metabolity cytokininů byly ve vzorcích stanoveny s využitím UPLC-MS/MS. Konečné výsledky byly statisticky zpracovány.



**Obrázek 8.** Vliv světla na obsah cytokininů v cyanobakterii *Nostoc* kultivované v dusíkatém médiu při nízké intenzitě osvětlení. A) cytokininy odvozené od tZ, B) cytokininy odvozené od cZ, C) cytokininy odvozené od DHZ, D) cytokininy odvozené od iP.

Obrázek 8A ukazuje koncentraci CK odvozených od tZ v pmol/g čerstvé hmotnosti za situace, kdy byla cyanobakterie *Nostoc* kultivována v dusíkatém médiu za nízké intenzity osvětlení. Před koncem temné fáze byla koncentrace tZ 0,53 pmol/g, tZOG 0,21 pmol/g, tZR 0,012 pmol/g, tZROG nebyl detekován a koncentrace tZRMP činila 0,18 pmol/g. Koncentrace CK po 5 hod osvětlení se u všech derivátů tZ zvýšila. Nejvyšší koncentraci jak před koncem temné fáze, tak 5 hodin po osvětlení vykazoval tZ, nejnižší tZROG. V porovnání s Obr. 9A, kdy byly sinice kultivovány na dusíkatém médiu při vyšší intenzitě osvětlení je patrné, že koncentrace tZ v buňkách odebraných před koncem temné fáze je 6,5 krát větší než po 5 hodinách osvětlení. Koncentrace tZ v buňkách odebraných z bezdusíkatého média za nízké i vysoké intenzity osvětlení

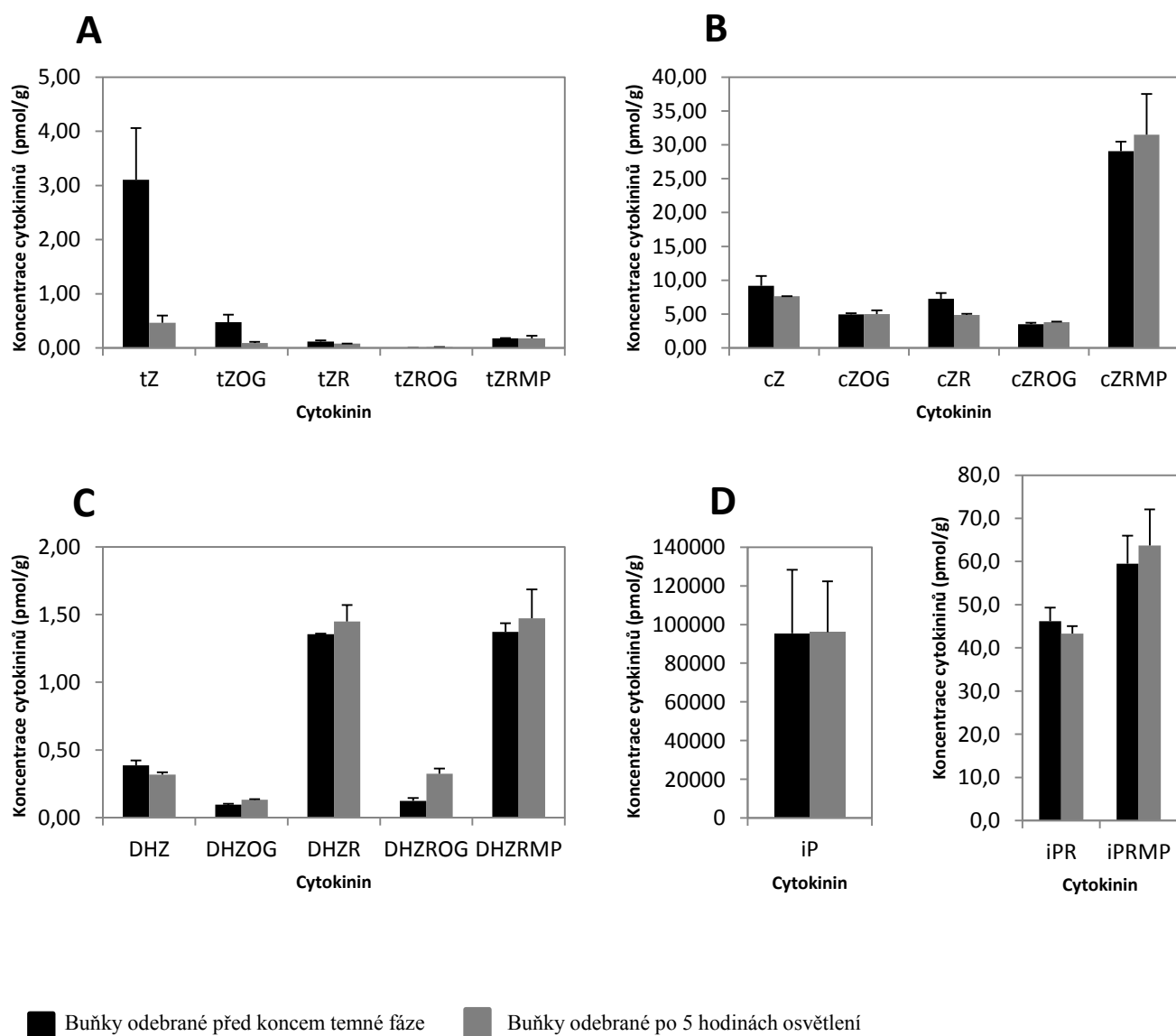
se zvyšuje po 5 hodinách osvětlení v porovnání s odběrem po temné fázi (Obr. 10A, 11A). O poznání vyšších koncentrací derivátů tZ dosahovaly buňky kultivované v dusíkatém médiu za nízké a vysoké intenzity osvětlení. Jejich koncentrace byla v průměru 2 krát větší než u buněk kultivovaných v bezdusíkatém médiu. Pozitivní vliv světla na koncentraci derivátů tZ byl pro *Nostoc* nejvyšší v dusíkatém médiu za nízké intenzity osvětlení (Obr. 8). V obrázku 8B pozorujeme koncentraci CK odvozených od cZ v pmol/g čerstvé hmotnosti u cyanobakterie *Nostoc* kultivované v dusíkatém médiu za nízké intenzity osvětlení. Nejvyšší absolutní hodnota CK byla pozorována u cZRMP 74,69 pmol/g, nejnižší u cZROG 2,85 pmol/g a cZR 3,1 pmol/g. Nejvyšší relativní přírůstek koncentrace buněk odebraných před koncem temné fáze a po 5 hodinách osvětlení byl zaznamenán u cZROG 5.27 krát, nejnižší u cZRMP 1,96 krát. Při kultivaci za zvýšené intenzity osvětlení byla nejvyšší koncentrace CK u buněk odebraných před koncem temné fáze a po 5 hodinách osvětlení zaznamenán u cZRMP 2,43 pmol/g, nejnižší u cZROG 0,31 pmol/g. V bezdusíkatém médiu při nízké intenzitě osvětlení (Obr. 10B) je pozorovatelný nárůst u všech typů cytokininů derivátu cZ buněk po 5 hodinách osvětlení. Nejvyšších hodnot dosahoval cZRMP. Při kultivaci v bezdusíkatém médiu za snížené intenzity osvětlení (Obr. 11B) byla nejvyšší koncentrace pozorována opět u cZRMP (43,21 pmol/g), kde byl zaznamenán i nejvyšší absolutní přírůstek, nejnižší absolutní hodnota byla u cZR a cZROG. V dusíkatém médiu při vysoké intenzitě osvětlení (Obr. 9) byl vliv světla výrazně nižší v porovnání s podmínkami kultivace na bezdusíkatém médiu za zvýšené intenzity osvětlení (Obr. 10), a byl jak pozitivní (metabolity odvozené od DHZ a iP) tak negativní (metabolity odvozené od tZ a cZ). Výjimkou byl obsah derivátů iP v buňkách kultivovaných v bezdusíkatém médiu při nízkém osvětlení (Obr. 10D), kde se koncentrace cyanobakterie snížila, u iPRMP dokonce zvýšila.

V obrázku 8C pozorujeme koncentraci derivátů DHZ v pmol/g čerstvé hmotnosti u cyanobakterie *Nostoc* kultivované v dusíkatém médiu při nízké intenzitě osvětlení. Nejvyšších absolutních hodnot po 5 hodinách osvětlení vykazoval metabolit DHZRMP (3,71 pmol/g), stejně jako u kultivace *Nostoc* v bezdusíkatém médiu za nízké tak vysoké intenzity osvětlení. Pouze v případě kultivace na dusíkatém médiu při vysoké intenzitě osvětlení byly zaznamenány srovnatelné koncentrace u DHZRMP a DHZR (1,47 a 1,45 pmol/g). Nejvyšší relativní nárůst koncentrace za nízké intenzity osvětlení a kultivaci v dusíkatém médiu oproti počátečnímu stavu byl pozorován u DHZRMP, nejnižší u DHZROG.

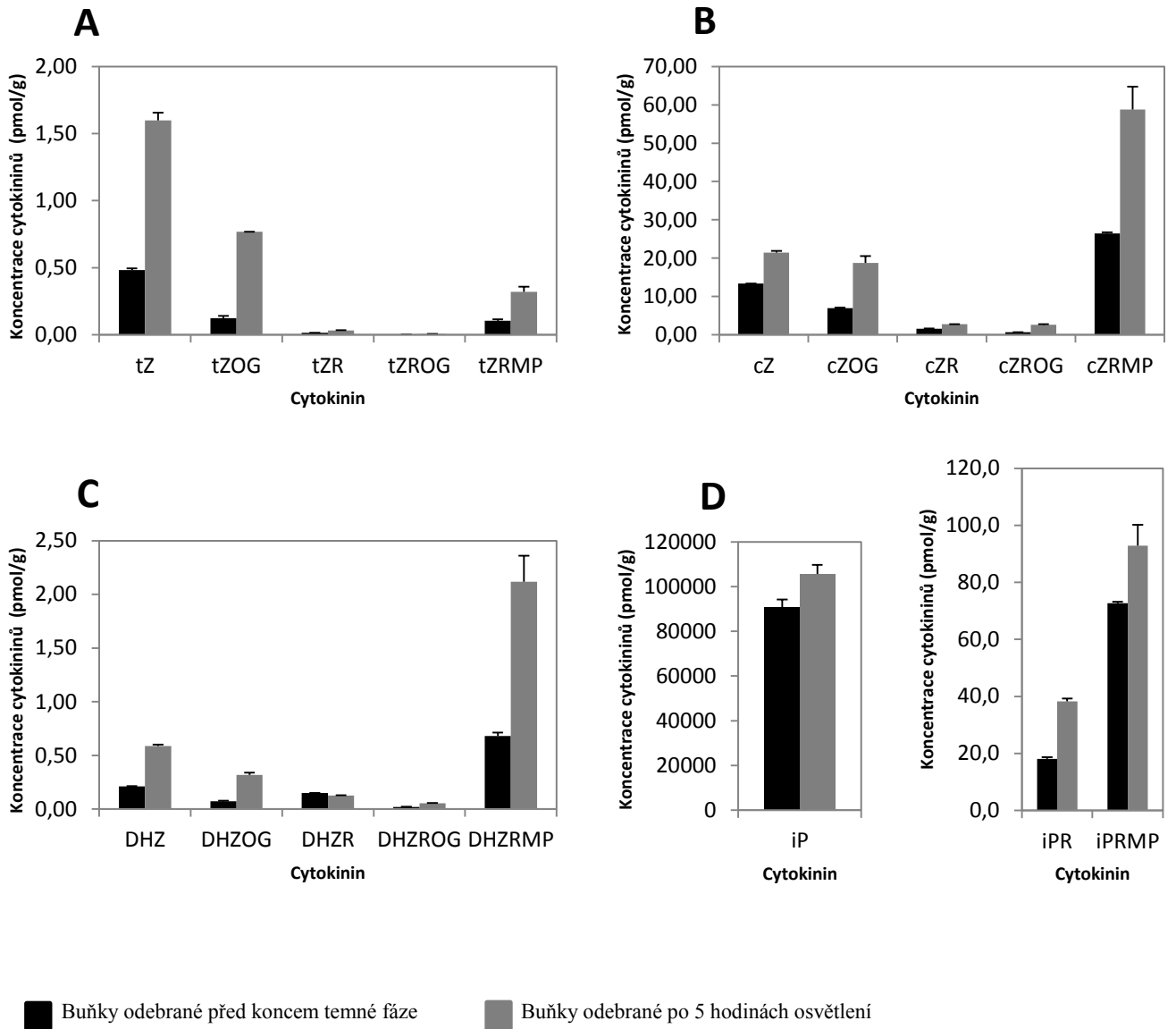
V obrázku 8D sledujeme koncentraci CK odvozených od iP v pmol/g čerstvé hmotnosti. Zde je zřejmé, že nejvyšší koncentrace nabývá metabolit iP, koncentrace při odběru před koncem temné fáze činí 82089 pmol/g a po 5 hodinách osvětlení 87824 pmol/g. Metabolit iPR vykazuje po 5 hodinách osvětlení pokles oproti původnímu stavu, iPRM naopak nárůst. Ve všech případech kultivace, jak na dusíkatém médiu za nízké i vysoké intenzity osvětlení, tak bezdusíkatém médiu za nízké a vysoké intenzity osvětlení lze pozorovat větší koncentrace oproti kultivacím původním. V těchto případech lze upozorovat, že klíčovou roli hraje světlo, jelikož koncentrace všech



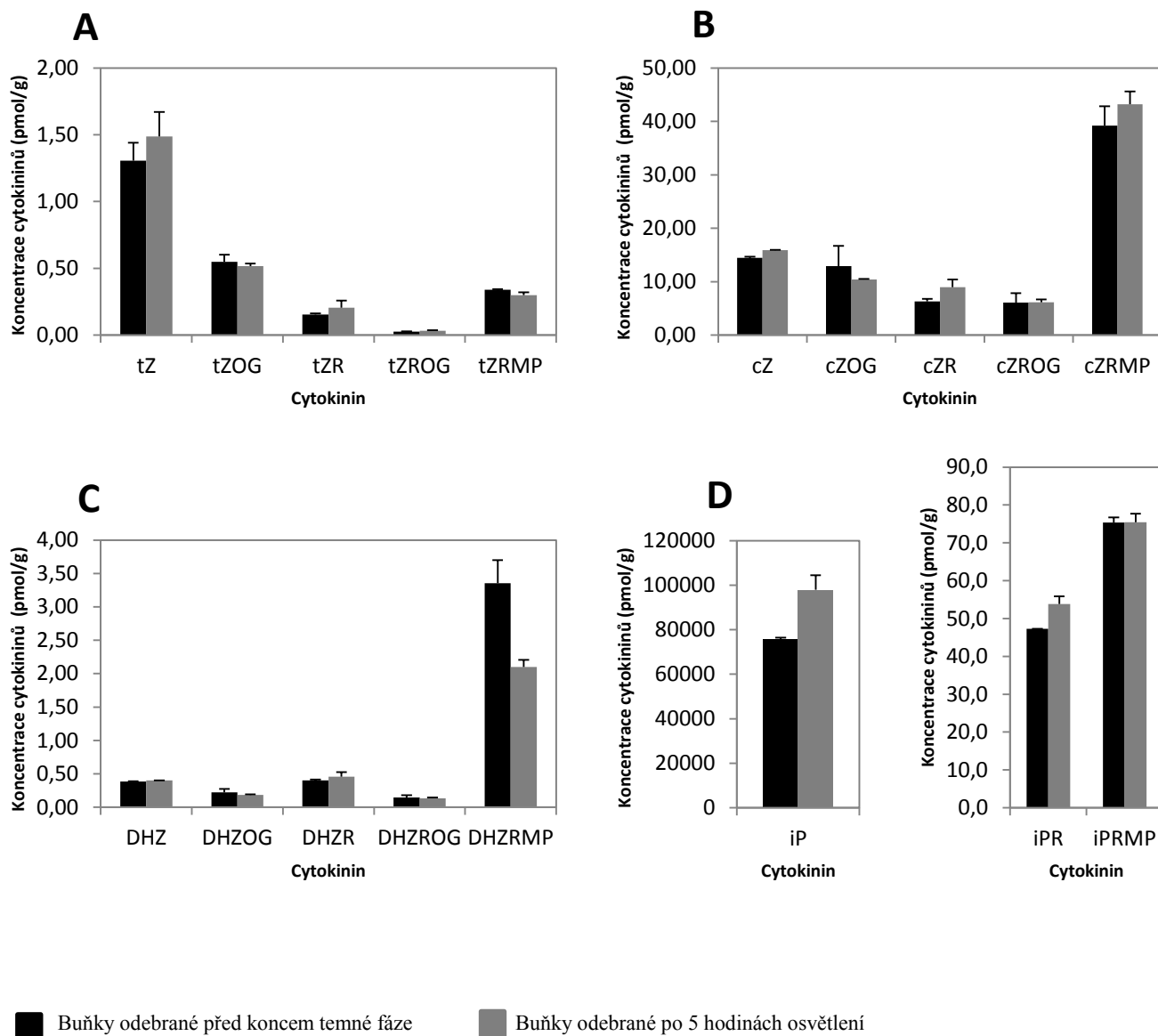
metabolitů se postupně zvyšuje, výjimku představují cyanobakterie kultivované v přítomnosti iPR kultivované v dusíkatém médiu za zvýšené intenzity osvětlení, kdy jejich koncentrace světlem klesla.



**Obrázek 9.** Vliv světla na obsah cytokininů v cyanobakterii *Nostoc* kultivované v dusíkatém médiu při vysoké intenzitě osvětlení. A) cytokinininy odvozené od tZ, B) cytokinininy odvozené od cZ, C) cytokinininy odvozené od DHZ, D) cytokinininy odvozené od iP.



**Obrázek 10.** Vliv světla na obsah cytokininů v cyanobakterii *Nostoc* kultivované v bezdušikatém médiu při nízké intenzitě osvětlení. A) cytokininy odvozené od tZ, B) cytokininy odvozené od cZ, C) cytokininy odvozené od DHZ, D) cytokininy odvozené od iP.



**Obrázek 11.** Vliv světla na obsah cytokininů v cyanobakterii *Nostoc* kultivované v bezdusíkatém médiu při vysoké intenzitě osvětlení. A) cytokinininy odvozené od tZ, B) cytokinininy odvozené od cZ, C) cytokinininy odvozené od DHZ, D) cytokinininy odvozené od iP.

Získané výsledky ukazují, že světlo při nízké intenzitě osvětlení indukuje u cyanobakterie syntézu cytokininů nezávisle na zdroji dusíkaté výživy. Naopak při vysoké intenzitě osvětlení je světlem indukovaná biosyntéza cytokininů potlačena přítomností dusičnanu.

Zdroj dusíku nemá na celkový obsah cytokininů v cyanobakterii *Nostoc* zásadní vliv, oproti rostlinám, které reagují na přítomnost dusíku zvýšením biosyntézy cytokininů, jak již bylo zmíněno v kapitole (2.2.6.). Intenzita metabolismu dusíku u rostlin je rozhodujícím faktorem při přemísťování dusíkatých sloučenin do různých částí rostlin (Zehnálek a kol., 2006). Jeho nedostatek působí u rostlin silnou inhibicí vegetativního růstu (Vaněk a kol., 2002).

## 5. Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla věnována pozornost poznatkům o interakci cytokininů a dusíkaté výživy u rostlin a poznatkům o odezvě sinic na různé zdroje dusíkaté výživy. Byly zde také shrnuty informace o cytokininech a jejich biosyntéze a degradaci.

V praktické části byla kultivována sinice *Nostoc* PCC 7120 v bezdusíkatém médiu nebo v médiu obsahující dusičnany za různých světelných podmínek. Extrakcí na pevné fázi byly z buněk přečištěny cytokininové metabolity. K samotnému stanovení byla použita ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. V téměř všech vzorcích byly detekovány různé metabolity cytokininů, kromě N9, který nebyl detekován vůbec. Dá se předpokládat, že námi určené cytokininy vznikly metabolismem cyanobakterie. Studie v oblasti metabolismu cytokininů u cyanobakterií stále nejsou uzavřenou záležitostí. Do dnešní doby nebyly zdaleka objasněny vzájemné interakce, principy a mechanismy. Z dosažených výsledků se nám potvrdilo, že při vysoké intenzitě osvětlení nedochází k tak výrazné indukci syntézy CK jako při nízké intenzitě nebo bez dusíku. Celkově můžeme konstatovat, že koncentrace všech typů CK u *Nostoc* reaguje na světlo a to buď výrazným nárůstem, v dusíkatém a bezdusíkatém médiu za nízké intenzity osvětlení, nebo mírným poklesem u kultivace na bezdusíkatém médiu za zvýšené intenzity osvětlení u DHZRMP, cyanobakterií kultivovaných v přítomnosti cytokininů odvozených tZ, a dále u cZ, cZR, DHZ, iPR kultivovaných na dusíkatém médiu za zvýšené intenzity osvětlení.

V dalších studiích by bylo vhodné provést analýzy v různých časových intervalech po osvětlení a po setmění. Díky tomuto budou vzorky odebrány ve stejné době, jako při již provedeném experimentu, abychom si mohli ověřit, zda jsou experimenty reprodukovatelné.

## 6. Seznam použité literatury

- Adams G. D. (2000) Heterocyst formation in cyanobacteria. *Microbiology* **3**, 618–624.
- Banowetz G. M. (1994) Immunoanalysis of cytokinins. In *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function* (Mok and Mok, eds.), str. 305–316, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Bielecki R. L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal. Biochem.* **9**, 431–442.
- Bothe H., Schmitz O., Yates G. M., Newton E. W. (2010) Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 529–551.
- Bredmose N., Kristiansen K., Norbaek R., Christensen L. P., Hansen-Moller J. (2005) Changes in concentrations of cytokinins (CKs) in root and axillary bud tissue of miniature rose suggest that local CK biosynthesis and zeatin-type CKs play important roles in axillary bud growth. *J. Plant Growth Regul.* **24**, 238–250.
- Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Perilleux 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.
- Emery R. J. N., Leport L., Barton J. E., Turner N. C., Atkins C. A. (1998) Cis-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Phys.* **117**, 1515–1523.
- Flores E., Frías J. E., Rubio L. M., Herrero A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Research* **83**, 117–133.
- Flores E., Herrero A. (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 164–166.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431–2452.
- Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., Ong E. S. (2005) Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **829**, 26–34.
- 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. In *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 34 Bioactive Natural Products (Part N)* (Atta-ur-Rahman, ed.), str. 203–264, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Hauserová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajduch M., Vydra D., Fuksová K., Strnad M. (2005) Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *J. Chromatogr. A* **1100**, 116–125.
- Herrero A., Muro-Pastor A. M., Flores E. (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 411–425.
- Hoiczuk E., Hansel A. (2000) Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* **182**, 1191–1199.

- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151–1159.
- Hussain A., Krischke M., Roitsch T., Hasnain S. (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Cur.Microbiol.* **61**, 361-369.
- Chiwocha S. D. S., Abrams S. R., Ambrose S. J., Cutler A. J., Loewen M., Ross A. R. S., Kermode A. R. (2003) A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* **35**, 405-417.
- Igarashi D., Izumi Y., Dokiya Y., Totsuka K., Fukusaki E., Ohsumi Ch. (2009) Reproductive organs regulate leaf nitrogen metabolism mediated by cytokinin signal. *Planta* **229**, 633–644.
- Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. (1999) Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* **40**, 733–742.
- Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stopen G. M., Pot C. S., De Visser R., Van Rhijn J. A., Gan S., Amasino R. M. (2000) Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environ.* **23**, 279–289.
- Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**, 677-685.
- Kakimoto T. (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Plant Biol.* **54**, 605-627.
- Kaczmarzyk D., Fulda M. (2010) Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. *Plant Physiol.* **152**, 1598–1610.
- Kamada-Nobusada T., Makita N., Kojima M., Sakakibara H. (2013) Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: The role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1881-1893.
- Kapoor K, Sharma VK (1981) Effect of growth-promoting chemicals on growth, nitrogen fixation and heterocyst frequency of a blue-green alga. *Z. Allg. Mikrobiol.* **21**, 305-311.
- Kato M., Mizuno T., Shimizu T., Hakoshima T. (1997) Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell* **88**, 717–723.
- Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J. Exp. Bot.* **62**, 1399-1409.
- Klouda P. (2003) Extrakce tuhou fázi. In *Moderní analytické metody* (Klouda, ed.), str. 46-49, nakladatelství, město, ČR.
- Kraiser T., Gras D. E., Gutiérrez A. G., González B., Gutiérrez R. A. (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 1455-1466.
- Kumar K., Mella-Herrera R. A., Golden J.W. (2010) Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol* **2**, a000315.

- 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.
- Letham D. S. (1994) Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function* (Mok and Mok, eds.), str. 57-80, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- MacDonald E. M. S., Morris R. O. (1985) Isolation of cytokinins by immunoaffinity chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography radioimmunoassay. *Meth. Enzymol.* **110**, 347-358.
- Macháčková I. (1998) Růstové regulátory. In: *Fyziologie rostlin* (Leinerová, ed), str. 240-285, Academia, ČR
- Meeks J. C., Castenholz R. W. (1971) Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch. Microbiol.* **78**, 25-41.
- Mok D. W., Mok M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Plant Physiol.* **52**, 89-118.
- Muro-Pastor I. M., Florencio F. J. (2003) Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 595-603.
- Nguyen D. T. T., Guillaume D., Rudaz S., Veuthey J. L. (2006) Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.* **29**, 1836-1848.
- 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.* **101**, 8039 - 8044.
- 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.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/singlequadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **480**, 207-218.
- Nováková L., Vlčková H. (2009) A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta* **656**, 8-35.
- Podlešáková K., Zalabák D., Čudejková M., Plíhal O., Szüćová L., Doležal K., Spíchal L., Strnad M., Galuszka P. (2012) Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. *PLoS ONE* **7**(6), e39293.
- Proteau P. J. (2004) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg. Chem.* **32**, 483-493.
- Quesnelle P. E., Emery R. J. N. (2007) Cis-cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth in vitro. *Can. J. Bot.* **85**, 91-103.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kaštovská K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J., Sivonen K. (2005) Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 11-26.

- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. W., Herdman M., Stanier R. G. (1979) Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **11**, 1-61.
- Sáenz L., Jones L. H., Oropeza C., Vlácil D., Strnad M. (2003) Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). *J. Plant Regul.* **39**, 205–215.
- Sakakibara H. (2004) Cytokinin biosynthesis and metabolism, In Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action! (Davies, P. J., ed.), str. 95-112, Kluwer Academic Publishers.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Plant Biol.* **57**, 431–449.
- Sakakibara H., Takei K., Hirose N. (2006) Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Sci.* **11**, 440-448.
- Selivankina S. Y., Zubkova N. K., Kupriyanova E. V., Lyukevich T. V., Kusnetsov V.V., Los D. A., Kulaeva O. (2006) Cyanobacteria respond to cytokinin. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 751-755
- Stirk W. A., Ördög V., vanStaden J. (1999) Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Art.hronema africanum* (cyanobacteria). *J. Phycol.* **35**, 89-92.
- Stirk W. A., Ördög V., vanStaden J., Jäger K. (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* **14**, 215-221.
- Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. (1992) Immunodetection and identification of N(6)-(o-hydroxybenzylamino) purine as a naturally-occurring cytokinin in *Populus x canadensis* Moench, cv. Robusta leaves. *Plant Physiol.* **99**, 74-80.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins- recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biol.* **39**, 267-284.
- Wagner S. C. (2011) Biological nitrogen fixation. *Nat. Educ. Knowledge* 3(10):15
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 26405-26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866-41872.
- Taiz L., Zeiger E. (2010) Cytokinins: Regulators of Cell Division, str. 621-648, In *Plant physiol.*, 5. edice. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- Tarkowski P. (2011) Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace. Habilitační práce – UP Olomouc, Česká republika.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy* **98**, 834-841.
- Tarkowski P., Liya G. E., Yong J. W. H., Tan S. N. (2009) Analytical methods for cytokinins. *TrAC-Trends Analyt. Chem.* **28**, 323- 335.
- Vitoušek P. M., Cassman K., Cleveland C. (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* **57**, 1–45.



Werner T., Schmölling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **12**, 527-538.

Wu N., Clausen A. M. (2007) Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *J. Sep. Sci.* **30**, 1167-1182.

Zehnálek J., Adam V., Kizek R. (2006) Asimilace dusičnanového, amonného a amidického dusíku u zemědělských plodin. *Chem. Listy* **100**, 508–514.

Zhang H. B., Horgan K. J., Reynolds P. H. S., Norris G. E., Jameson P. E. (2001) Novel cytokinins: the predominant forms in mature buds of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* **112**, 127-134.



