



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Biologická aktivita derivátů cytokininů
odvozených od močoviny**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Radek Lefnar
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2014

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

V Olomouci dne 15.5. 2014

.....

Poděkování

Na začátku bych chtěl poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jaroslavu Nislerovi, Ph.D. za skvělý přístup, trpělivost, odborné vedení a věcné připomínky při plnění bakalářské práce. Chtěl bych také poděkovat Jarmile Balonové za provedení senescenčních biotestů. Data ze senescenčních testů jsem použil ve své bakalářské práci ke stanovení IC_{50} jednotlivých látek. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Radek Lefnar
Název práce	Biologická aktivita derivátů cytokininů odvozených od močoviny
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Cytokininy tvoří skupinu rostlinných hormonů, které hrají důležitou úlohu ve fyziologických procesech rostlin. Existují dva typy cytokininů: přirozeně se vyskytující cytokininy, kam patří N⁶ substituované deriváty adeninu a syntetické cytokininy, z nichž jsou nejběžnější deriváty odvozené od močoviny. Mezi cytokininy odvozené od močoviny patří například thidiazuron, který má podobnou biologickou aktivitu jako např. trans-Zeatin. V Laboratoři růstových regulátorů UP & UEB, AV ČR byla připravena řada derivátů cytokininů odvozených od thidiazuronu. Náplní této práce bylo zkoumání biologické aktivity těchto derivátů. K tomuto účelu byly použity 4 typy testů charakterizujících cytokininovou povahu těchto látek: senescenční test, CRE1/AHK4 receptorový test, kompetiční test na receptoru AHK3 a ARR5::GUS reportérový test. Jelikož thidiazuron, kromě cytokininové aktivity, je také inhibitorem enzymů CKX, všechny jeho deriváty byly testovány také na inhibici AtCKX2. Celkem bylo otestováno asi 30 látek.</p>
Klíčová slova	Cytokininy, deriváty cytokininů, thidiazuron, cytokininová aktivita
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Radek Lefnar
Title of thesis	The biological activity of cytokinin urea derivatives
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jaroslav Nisler, PhD.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Cytokinins are class of plant hormones, which play an important role in physiological processes of plants. There are two types of cytokinins: naturally occurring cytokinins, which include N⁶ substituted derivatives of adenine and synthetic cytokinins, from which the most common are derivatives of urea. Among urea-type of cytokinins belongs thidiazuron, which has similar biological activity as natural cytokinin <i>trans</i>-Zeatin. In Laboratory of Growth Regulators UP & UEB, AV CR number of thidiazuron derivatives were prepared. The goal of this thesis was to study their biological activity. For this purpose, there were used four types of assays: wheat senescence assay, CRE1/AHK4 receptor assay, AHK3 competitive assay and ARR5::GUS reporter gene assay. Further, thidiazuron is also inhibitor of CKX enzymes; therefore all its derivatives were also tested in AtCKX2 inhibition assay. Together, approximately 30 compounds were tested.</p>
Keywords	Cytokinins, cytokinin derivatives, thidiazurone, cytokinin activity
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Teoretická část	8
1. Úvod	9
1.1. Cytokininy	9
1.2. Rozdělení.....	9
1.3. Přirozeně se vyskytující cytokininy.....	9
1.4. Syntetická analoga cytokininů	10
1.5. Fyziologické funkce cytokininů v rostlinách	11
1.6. Senescence.....	12
1.7. Biosyntéza cytokininů	13
1.8. Cytokininová signální dráha	14
1.9. Metabolismus cytokininů	16
1.10. Degradace cytokininů	16
1.11. Inhibice CKX.....	17
1.12. Metody měření CK aktivity	18
1.12.1. Kalusový biotest	18
1.12.2. Amarantový biotest.....	18
1.12.3. Senescenční biotest	19
1.12.4. Bakteriální receptorový test.....	19
1.12.5. Bakteriální kompetiční test	19
1.12.6. ARR5::GUS reportérový test.....	19
1.13. Metody měření CKX inhibiční aktivity.....	20
Experimentální část	21
2. Použitý materiál a přístroje.....	22
2.1. Chemikálie	22
2.2. Biologický materiál.....	23
2.3. Pomůcky	23
2.4. Přístrojová technika	23
3. Metody.....	23
3.1. Elektroporace	23

3.2.	Receptorový test.....	24
3.3.	ARR5::GUS reportérový test.....	25
3.4.	Kompetiční test.....	27
3.5.	CKX test metodou PMS MTT	27
4.	Výsledky a diskuze.....	28
4.1.	Senescenční biotest.....	28
4.2.	AHK4 receptorový test.....	29
4.3.	AHK3 kompetiční test.....	30
4.4.	ARR5:GUS reportérový test	32
4.5.	Srovnání výsledků ze senescenčního biotestu s aktivitou v <i>ARR5::GUS reportérovém testu</i>	34
4.6.	Inhibice CKX	35
5.	Závěr	37
6.	Použitá literatura	38
7.	Seznam použitých zkratk	46

Cíle práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- vypracování literární rešerše na téma biologická aktivita derivátů cytokininů odvozených od močoviny
- testování biologické aktivity vybraných derivátů
- popsání vztahu mezi strukturou a aktivitou studovaných derivátů thidiazuronu

Teoretická část

1. Úvod

1.1. Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které spolu s dalšími rostlinnými hormony ovlivňují různé vývojové procesy v rostlinách, například: klíčení semen, růst a vývoj kořene a stonku, tvorbu a činnost meristémů, apikální dominanci, rozvod živin, interakci patogen-rostlina, reakci na stres a senescenci. Tyto fytohormony se také účastní různých světlem regulovaných procesů jako je de-etiolizace a diferenciacce chloroplastů (Lochmanová et al., 2008; Novák et al., 2013).

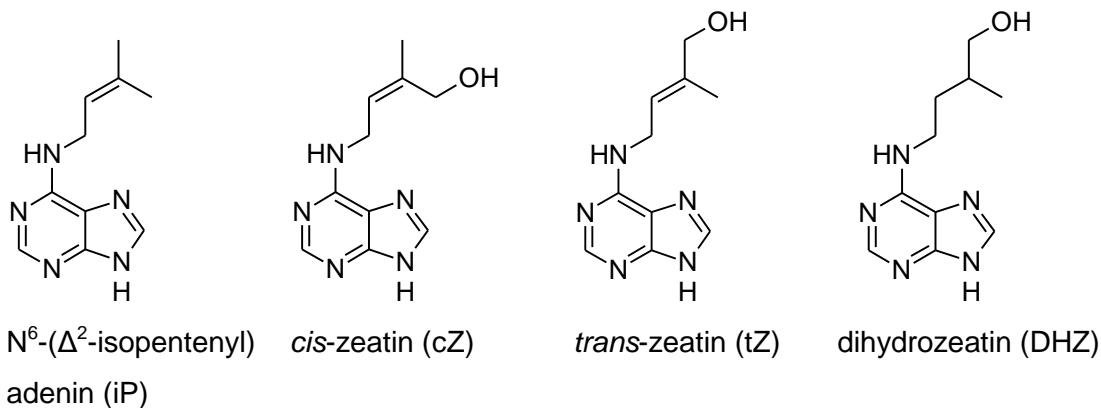
Prvním izolovaným a identifikovaným cytokininem se stal kinetin. Svůj název získal díky své schopnosti podporovat cytokinezi (Miller et al., 1995). Z kukuřice *Zea mays* byl poprvé izolován přirozeně se vyskytující cytokinin a to v roce 1961 C. Millerem (Miller, 1961). Tento objevený cytokinin byl pojmenován zeatin. Roku 1963 byly popsány jeho chemické vlastnosti (Letham, 1963).

1.2. Rozdělení

Cytokininy lze rozdělit do dvou základních skupin: přirozeně se vyskytující cytokininy a syntetická cytokininy.

1.3. Přirozeně se vyskytující cytokininy

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu a mohou být klasifikovány podle jejich N⁶ substituentu jako isoprenoidní nebo aromatické. Nejčastěji se vyskytující cytokininy jsou s nenasyceným isoprenoidním řetězcem a to zejména ty, které mají trans-hydroxylovaný N⁶-postranní žetězec (trans-zeatin, **tZ**, Letham, 1963). Mezi isoprenoidní cytokininy se dále řadí N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin (**iP**) a cis-zeatin (**cZ**). Kinetin (**K**) a benzyladenin (**BA**) patří mezi nejznámější cytokininy s aromatickým substituentem. Další aromatické cytokininy jako je *ortho*-topolin (**oT**), *meta*-topolin (**mT**) a jejich methoxy-deriváty byly objeveny pouze v několika druzích rostlin (Strnad, 1997). V dřívějších letech byly pouze isoprenoidní cytokininy považovány za endogenní sloučeniny, avšak v polovině 70 let byly BA a jeho deriváty identifikovány jako přirozeně se vyskytující cytokininy (Horgan et al., 1973; Horgan et al., 1975).



Obr. 1: Strukturní vzorce isoprenoidních CK a dihydrozeatinu s jejich triviálními názvy (v závorce je uvedena zkratka CK).

1.4. Syntetická analoga cytokininů

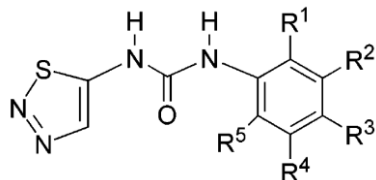
Mezi syntetické deriváty cytokininů můžeme zařadit nejrůznější substituované deriváty adeninu a bis-substituované deriváty močoviny, které vykazují cytokininovou aktivitu. Mezi deriváty fenyльмоčoviny patří například thidiazuron (N-fenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl močovina - **TDZ**), difenyльмоčovina (**DFU**) a N-fenyl-N'-2-chloro-4-pyridyl močovina (**CPPU**, Mok et al., 1982).

Thidiazuron vyvolává podobné reakce u rostlin jako je tomu u přírodních cytokininů. V poslední době, morfo-regulační potenciál TDZ vedl k jeho uplatnění v rostlinných tkáňových kulturách. TDZ byl poprvé syntetizován německou firmou German Schering Corporation za účelem defoliace bavlníku (*Gossypium hirsutum*, Arndt et al., 1976). Dále se TDZ využívá jako močovinný herbicid – váže se na quinon vázající protein ve fotosystému II a blokuje tak elektronový transport (Rumack et al., 2014).

Studie růst-podporujících hormonů začaly v 70. letech. Např. Hopping zjistil, že některé kombinace endogenních hormonů (auxiny, gibereliny a cytokininy) byly schopny účinně podporovat růst ovoce (Hopping et al., 1976). Známější testovanou sloučeninou je také CPPU (1-(2-chlor-4-pyridyl)-3-phenylurea;). V současné době se využívá nejen na kiwi, ale také pro další důležité plodiny, jako jsou melouny, hrozny a další ovoce (Arima et al., 1995). Také TDZ má velmi podobné účinky na růst kiwi jako CPPU (Famiani et al., 1999).

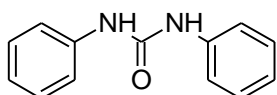
Téměř shodné výsledky získané s CPPU a TDZ při stimulaci růstu kiwi nebyly nijak překvapivé vzhledem k strukturální podobnosti mezi oběma sloučeninami, který naznačuje společný molekulární mechanismus účinku. Myslelo se, že zvětšení velikosti ovoce je důsledkem specifického buněčného dělení v raných fázích vývoje ovoce nebo samotnou aktivitou těchto fenyльмоčovin (Karanov et al., 1992) a to tak,

že inhibovali CKX (cytokinin oxidasa/dehydrogenasa) nebo, že podporovali produkci endogenních cytokininů (Jones a Schreiber, 1997). Jedny z derivátů TDZ byly získány nahrazováním vodíku na fenyly fluorem. Mnoho z těchto derivátů mělo silnější vliv na velikost ovoce kiwi než samotný TDZ (Welch et al., 1991).

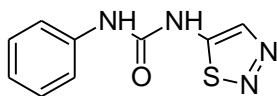


Obr. 2: Znárodnění derivátů TDZ, kde vodíkové atomy byly nahrazeny fluorem (R^1 - R^5). Převzato z Abad, 2004.

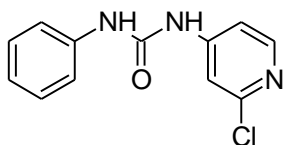
Předmětem této bakalářské práce jsou zejména deriváty thidiazuronu, které obsahují 1,2,3-thiadiazolový heterocyklus a zároveň substituovaný fenylový cyklus nebo deriváty kde je fenylový cyklus nahrazen např. heterocyklem nebo alifatickým substituovaným uhlovodíkovým řetězcem.



N,N'-difenylmočovnia (DPU)



N-fenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl močovina (TDZ)



N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)močovina (CPPU)

Obr. 3: Strukturní vzorce derivátů močoviny s jejich triviálními názvy (v závorce je uvedena zkratka CK).

1.5. Fyziologické funkce cytokininů v rostlinách

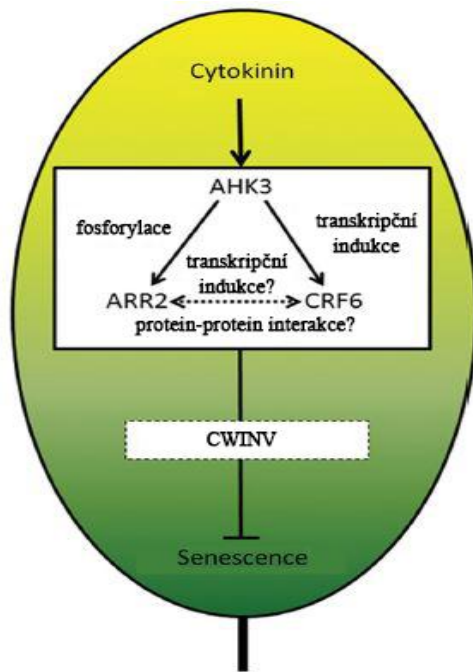
Cytokiny mohou stimulovat nebo inhibovat různé fyziologické, metabolické, biochemické a vývojové procesy, zejména u vyšších rostlin. V rostlině ovlivňují buněčnou proliferaci, vývoj cévních svazků, apikální dominanci, získávání živin, senescenci listů, inhibice rozpadu chlorofylu, stimulace fotosyntézy a další. Cytokiny se také účastní regulace vývoje bočních kořenů, kde fungují jako antagonisté fytohormonu auxinu (Li et al., 2006).

Vzhledem k tomu, že námi studované látky vykazovaly neobyčejně silné anti-senescenční vlastnosti, a že v praktické části této bakalářské práce jsem se zabýval především srovnáním cytokininové a anti-senescenční povahy jednotlivých látek, budu se v následující kapitole věnovat blíže vztahu cytokininů k senescenci.

1.6. Senescence

Zatímco rostlinné regulátory jako je kyselina abscisová (ABA) a ethylen podporují senescenci (Smart, 1994), bylo známo již z minulosti, že exogenní aplikace cytokininů inhibuje degradaci chlorofylu a fotosyntetických proteinů (Richmond a Lang, 1957; Badenoch-Jones et al., 1996). Mnoho dalších důkazů, podporující teorii, že cytokininy fungují jako endogenní negativní regulátory senescence, bylo získáno také díky studii, která zkoumala změny v obsahu cytokininů během senescence. U mnoha rostlinných druhů existuje silná korelace mezi sníženým obsahem cytokininů v listech, u kterých nastává senescence (Nooden LD, 1979; Singh et al., 1992). Také pomocí moderních technik bylo v nedávné době ukázáno, že cytokininy výrazně oddalují senescenci. Například, bylo prokázáno, že kontrolovaná exprese IPT, genu kódujícího isopentenyltransferasu (enzym zodpovědný za biosyntézu cytokininů), pod senescenční-specifickým promotorem, vedla k potlačení senescence listů a prodloužení, fotosynteticky aktivní životnosti listů (Gan a Amasino, 1995). Tuto studii ještě rozšířil Rivero, který použil promotor vázaný na stres suchem na řízení exprese genu IPT (Rivero et al., 2007). Výsledek byl vynikající: transgenní rostliny tabáku s kontinuální dodávkou cytokininů vzdorovaly dva týdny trvajícím suchu, udržely si vysoký obsah vody, a poté, co byly znovu zality, zezelenaly a byly fotosynteticky aktivní. Kontrolní rostliny zahynuly (Rivero et al., 2007).

Molekulární mechanismus a spojení mezi cytokininy a oddálením stárnutí byl nejasný až do roku 2004, kdy bylo prokázáno, že extracelulární enzym invertasa má klíčovou roli v regulaci source-sink a že invertasa je upregulována, mimo jiné, i cytokininy (Balibrea Lara et al., 2004). V roce 2006, bylo také zjištěno, že AHK3, jeden ze tří cytokininových receptorů v *Arabidopsis*, hraje důležitou roli při kontrole životnosti listů přes specifickou fosforylaci regulátoru odpovědi na cytokininy - ARR2 (Kim et al., 2006).

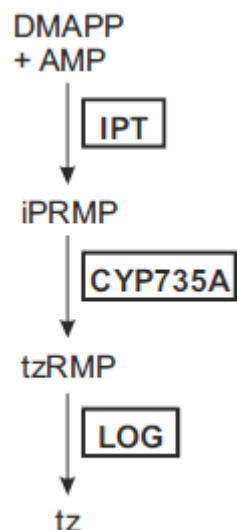


Obr. 4: Model vznikající dráhy regulace senescence cytokininy (převzato a upraveno z Zwack a Rashotte, 2013). Vysvětlení zkratk je uvedeno v textu.

1.7. Biosyntéza cytokininů

Biosyntéza cytokininů začíná přeměnou adenosin-5'-fosfátu a dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) na isopentenyladenosin-5-monofosfát (iPMP) za katalýzy isopentenyltransferasy (IPT). V *Arabidopsis* bylo identifikováno devět IPT genů *AtIPT1-AtIPT9* (Takei et al., 2001). Tyto geny kódují enzymy, které jsou nutné pro syntézu cytokininového prekursoru - isopentenyladeninu (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001). Dva cytochromy P450 monooxygenasy (*CYP735A1* a *CYP735A2*) pak katalyzují hydroxylaci CK isopentenyladeninového typu (Takei et al., 2004) za vzniku cytokininů zeatinového typu. Navíc skupina genů LONELY GUY (LOG) kóduje enzymy, které konvertují cytokinin z neaktivní na aktivní formu (Houba-Hérin et al., 1999; Schmulling et al., 2003; obr.5). Metabolické dráhy biosyntézy aromatických cytokininů nejsou dosud známy.

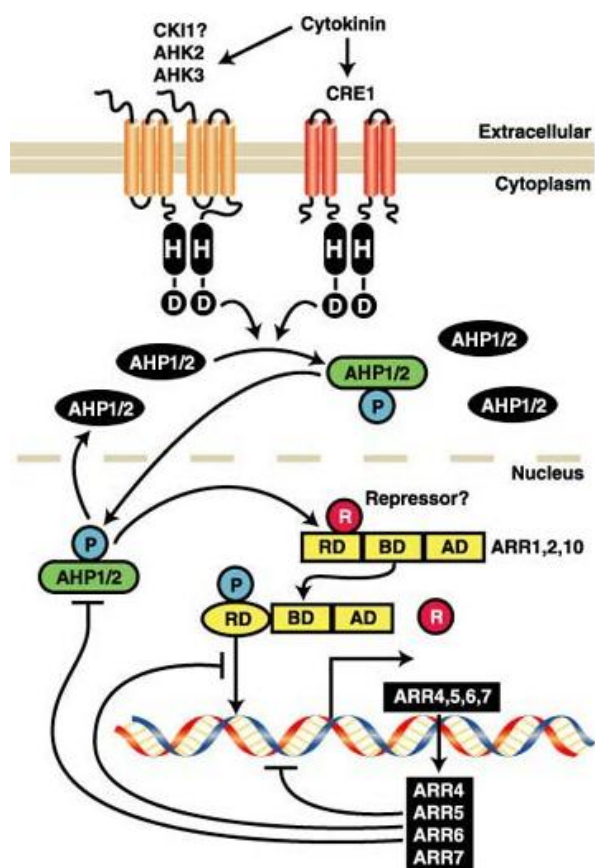
Cytokininu mohou být také syntetizovány nepřímou cestou, kdy degradací tRNA katalyzovanou tRNA-isopentenyltransferasou (EC 2.5.1.8) vzniká cytokinin a to zejména *cis*-zeatinového typu (Chen, 1997).



Obr. 5: Základní dráha biosyntézy cytokininu; *iP* ribosid 5'-monofosfát (*iPRMP*), *tz* ribosid 5'-monofosfát (*tzRMP*). Upraveno a převzato z Showk et al., 2013.

1.8. Cytokininová signální dráha

Cytokininová signální dráha je založena na dvou komponentním systému. Poté co jsou cytokininy v rostlině syntetizovány, musejí být přijaty jako signální molekula CK receptory. V *Arabidopsis* se vyskytují tři CK receptory AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 (Inoue et al., 2001). CK se naváže na extracelulární doménu AHK, kde dochází autofosforylaci na His zbytku v intracelulární doméně. Fosfátová skupina je poté transdukována na Asp zbytek domény AHK. Následně je fosfátová skupina přenesena z cytosolu do jádra pomocí proteinu Hpt, kde interaguje s regulátory odpovědi ARR (Kakimoto, 2001). Přenos fosfátu na ARR transkripční aktivátory B-typu (ARR1, ARR2 a ARR10) nesoucí MYB-like domény ovlivňuje jeho transkripční aktivitu vedoucí k expresi primární CK odpovědi spolu s expresí ARR A-typu, které negativně regulují CK signalling (Obr. 6; Hwang a Sakakibara, 2006). Percepcí cytokininu dochází k aktivaci ARR2 (*Arabidopsis* Response Regulators) a CRF6 (Cytokinin Response Factors). ARR2 a CRF6 proteiny mohou interagovat s downstream geny. Jedním takovým genem může být cell-wall invertasa (CWINV), enzym, který je důležitý pro inhibici senescence (Obr.3; Zwack a Rashotte, 2013).



Obr. 6: Model CK signální transdukční dráhy v *Arabidopsis* založena na dvoukomponentní dráze. CK signál je rozpoznán histidin proteinovou kinasou v plasmatické membráně. Histidinové kiny zahajují signální kaskádu prostřednictvím fosfátu až do výsledné oblasti jaderné translokace. Zde fosfát pomocí Hpt proteinu reaguje s regulátory odpovědi ARR. Převzato a upraveno z Sheen, 2002. H - histidin, D - aspartát, P - fosfát, AHP - *Arabidopsis* histidin phosphotransfer protein.

Skupina AHK proteinů u *Arabidopsis* se skládá z pěti hybridních histidinkinas AHK1, AHK2, AHK3, AHK4, AHK5 (Hwang et al., 2002). První identifikovanou histidinkinasou byla CRE1/AHK4 (Inoue et al., 2001). CRE1/AHK4 receptor se skládá z tzv. CHASE domény obsahující transmembránové domény následované přenašečovou doménou a dvěma přijímačovými doménami (Heyl a Schmülling, 2003). Tato doména byla nalezena také u AHK2 a AHK3, které jsou považovány za CK receptory (Heyl a Schmülling, 2003).

Analýzou trojnásobných AHK2/AHK3/AHK4 mutantů bylo zjištěno, že tyto receptory hrají pozitivní roli v přenosu CK signálu (Ferreira a Kieber, 2005). Pomocí studia receptorových mutantů bylo zjištěno, že receptor AHK3 hraje dominantní roli v senescenci a je klíčovým regulátorem dlouhověkosti listů v *Arabidopsis* (Kim et al., 2006).

1.9. Metabolismus cytokininů

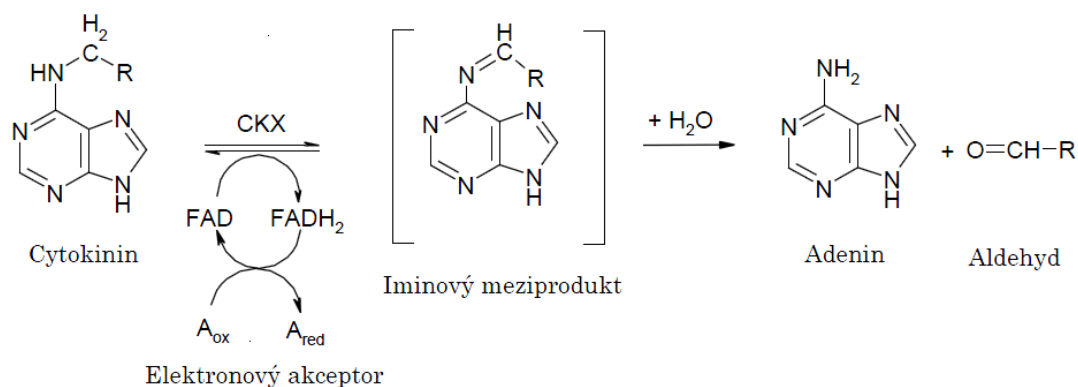
Rostliny obsahují řadu metabolitů cytokininů, především deriváty zeatinu. Díky přítomnosti adeninového kruhu v cytokininech fungují zde podobné metabolické přeměny, jak je tomu u adeninu. Řada enzymů podílejících se na konverzi mezi bází, nukleosidem a nukleotidem bylo izolováno z rostlin. Tyto enzymy jsou cytokinin-nespecifické. Obecně vykazují vyšší afinitu pro adenin, adenosin a AMP než pro odpovídající cytokininy (Chen, 1997).

Modifikací adeninového kruhu cytokininu může být například glykosylace. Glukosyltransferasa (EC 2.4.1.118) katalyzuje tvorbu N⁷ a N⁹ cytokinin glukosidů, které byly izolovány z ředkvičky (Entsch et al., 1979, 1983). Tato modifikace vede k inaktivaci CK (Hou et al., 2004).

1.10. Degradace cytokininů

Endogenní hladina CK je kontrolována zejména ireverzibilní inaktivací CK prostřednictvím jejich degradace enzymem cytokinin oxidasou (CKX; EC 1.5.99.12; Frébort, 2011; Werner, 2009; Hare, 1994). Tento enzym byl poprvé popsán v roce 1971 (Pačes et al., 1971). Cytokinin oxidasa katalyzuje degradaci CK a jejich ribonukleotidů na adenin a aldehyd postranního řetězce. Toto je klíčový mechanismus, který kontroluje množství CK v rostlinách (Hare a Staden, 1994; Galuszka et al., 2000; Veselov et al., 2004; Frébort et al., 2011). Pro fungování enzymu, musí obsahovat postranní řetězec CK dvojnou vazbu, proto isopentenyladenin, zeatin a jejich ribosilované deriváty jsou přírodními substráty CKX (Jones et al., 1997; Zhang et al., 2001). Tento enzym ale nedokáže oxidovat dihydrozeatin a jeho deriváty díky jejich nasyceným vazbám v postranním řetězci, O-glycosilované konjugáty s glykosylovanými nebo xylosylovanými zbytky v postranním řetězci, nebo CK s postranním řetězcem obsahující aromatický kruh (benzylaminopurin, kinetin; Kamínek et al., 1997; Galuszka et al., 2000; Schmulling et al., 2003; Galuszka et al., 2007).

Nicméně, CKX z *Arabidopsis* vykazovala schopnost štěpit postranní aromatický řetězec CK, ikdyž méně efektivně než u isoprenoidních CK s nenasycenou vazbou (Galuszka et al., 2007; Kowalska et al., 2010). Změny v činnosti CKX vedou ke změnám koncentrace CK v pletivech, proto tento enzym hraje klíčovou roli při regulaci obsahu CK a tím přispívá k regulaci různých morfologických procesů řízené CK.



Obr. 7 :Schéma reakce katalyzována CKX; převzato z Frébortová, 2008.

Genom *Arabidopsis* zahrnuje sedm genů CKX *AtCKX1-AtCKX7* (Gu et al., 2010; Schmulling et al., 2003). Jednotlivé *AtCKX* proteiny kódovány různými geny jsou detekovány v cytoplasmě, vakuole nebo apoplastu, které se takto mohou lišit svými biochemickými vlastnostmi (Werner et al., 2003). Kromě toho, geny kódující isoenzymy CKX se liší v úrovni exprese a tkáňové specifitě jejich transkripční aktivity. *AtCKX1* má maximální transkripční aktivitu v apikální části stonku, květech, *AtCKX2* v apikální části stonku, u *AtCKX3* byla maximální exprese v pletivech mladých rostlin. *AtCKX4* gen byl exprimován během vývoje trichomů, stomat, palistů a také v kořenové špičce. *AtCKX5* genová exprese byla patrná během vývoje stonku a kořene a v generativních orgánech (tyčinky a pyl), zatímco *AtCKX6* byl exprimován v různých stádiích vývoje gynocea (Frébort et al., 2011).

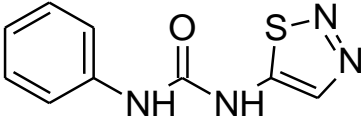
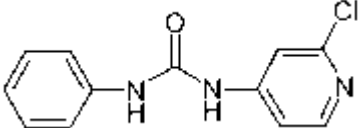
Důležitá rostlina kukuřice (*Zea mays*) zahrnuje ve svém genomu celkem 13 genů CKX *ZmCKX1- ZmCKX13*, z kterých dva *ZmCKX1* a *ZmCKX10* byly podrobně charakterizovány (Zalabák et al., 2014). Dále byly identifikovány CKX geny u *Dendrobium* a u obilovin *Hordeum* a *Triticum* (Galuszka et al., 2004).

1.11. Inhibice CKX

Jelikož Thidiazuron je známý také svou CKX inhibiční aktivitou (Chatfield and Armstrong, 1986; Hare and Staden, 1994), tak jsem v rámci mé bakalářské práce otestoval jednotlivé deriváty TDZ zda-li také nejsou inhibitory CKX.

Kromě TDZ, také N⁶-isopentenyl-N-methylaminopurin (methyl-iP) byl v roce 1995 popsán jako CKX inhibitor (Wang a Letham, 1995). Později, deriváty anilinpurinů byly taktéž popsány jako velice účinné CKX inhibitory. Tyto deriváty měly substituovaný fenylový řetězec na purinovém kruhu (Zatloukal et al., 2008).

Také syntetické cytokininy CPPU nebo TDZ a jejich deriváty jsou známé jako CKX kompetitivní inhibitory (Laloue et al., 1989; Hare et al., 1994).

Sloučenina	Struktura	IC ₅₀ [μM]
TDZ		50
CPPU		18

Obr. č. 8: Seznam vybraných fenylmočovinných derivátů cytokininů. Vedle struktury je uvedena jejich IC₅₀ v AtCKX2 testu, jako standard je zde uveden TDZ. Převzato a upraveno z Kopečný et al., 2010.

1.12. Metody měření CK aktivity

Jak, již bylo řečeno, cytokininy ovlivňují celou řadu fyziologických procesů v rostlině. Pomocí biotestů se hodnotí aktivita studovaných látek v konkrétním biologickém procesu.

1.12.1. Kalusový biotest

Kalusový biotest je založen na stimulaci buněčného dělení nediferenciovaného pletiva - kalusu. Po stimulaci cytokininem dochází k nárůstu buněčné hmoty, která se po 4 týdnech zvaží. Aktivita CK tedy přímo souvisí s nárůstem hmotnosti ovlivněného kalusu. Bez přidaného CK nedochází k nárůstu hmotnosti kalusu (Murashige, 1962).

1.12.2. Amarantový biotest

Amarantový biotest je založen na produkci červeného pigmentu betacyaninu, který vzniká v kotyledonu *Amaranthu* za přítomnosti cytokininu ve tmě. Na základě schopnosti tvořit červený pigment v nepřítomnosti světla je stanovena aktivita daného CK (Biddington, 1973). Koncentrace betacyaninu se měří spektrofotometricky.

1.12.3. Senescenční biotest

Pro senescenční biotest se používají listy pšenice *Triticum aestivum*. Listy se ustříhnou a poté vloží do roztoku látky o dané koncentraci. Tento biotest je založen na rozpadu listového barviva chlorofylu. Protože CK zpomalují rozpad chlorofylu, tak se aktivita daného CK určuje na základě zbylé koncentrace chlorofylu v listu. Tento biotest probíhá ve tmě, lze jej ale provádět i na světle.

1.12.4. Bakteriální receptorový test

Tato metoda se používá pro měření CK aktivity látek v *in vitro* testu, pomocí bakterie *Escherichia coli*, která nese funkční cytokininové receptory (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001). Tento test je založen na produkci β -galaktosidasy, která je přímo úměrná a vázaná na aktivaci CK receptoru. β -galaktosidasa je enzym štěpící např. glykosidickou vazbu substrátu MUG. Tímto štěpením vzniká bezbarvý galaktosid a fluorescenční produkt MU. Měří se tedy fluorescence MU, která je přímo úměrná množství vyprodukovaného enzymu, a tak i aktivaci CK receptoru.

1.12.5. Bakteriální kompetiční test

Při tomto testu se používají bakterie *Escherichia coli* obsahující funkční receptor AHK3 nebo CRE1/AHK4. K těmto bakteriím je přidána testovaná látka a tritiem značený *trans*-Zeatin. Testovaná látka a značený *trans*-Zeatin spolu kompetují o vazebné místo na receptoru AHK3. Po kompetici látek se detekuje zbytkový značený *trans*-zeatin, který zůstal navázán v receptoru. Čím je radioaktivita měřeného vzorku nižší, tím vyšší byla specifická vazba testované látky do receptoru.

1.12.6. ARR5::GUS reportérový test

Tato *in vivo* metoda je založená na měření CK aktivity v *Arabidopsis thaliana*. V transgenní rostlině je obsažen promotor genu ARR5 a funkční část genu GUS (Higuchi et al., 2004). K transgenním rostlinám jsou přidány testované látky a po kultivaci, sklizení, homogenizaci a extrakci proteinů se stanovuje specifická aktivita β -glukuronidasy. β -glukuronidasa štěpí glykosidickou vazbu substrátu MUG. Tímto štěpením vzniká bezbarvý glukuronid a fluorescenční produkt MU. Měří se tedy fluorescence MU, která je přímo úměrná množství vyprodukovaného enzymu, a tak i aktivaci genu ARR5. Výhodou tohoto testu je, že exprese genu ARR5 je aktivována všemi třemi CK receptory. Tento test tak poskytuje nejúplnější informaci o cytokininové povaze testované látky.

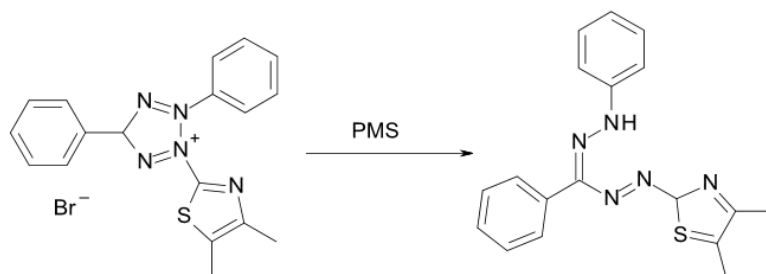
1.13. Metody měření CKX inhibiční aktivity.

V minulosti se obvykle používaly radioisotopické metody, které využívají chromatografickou separaci reakčních produktů odlišných substrátů (Laloue a Fox 1989; Motyka et al., 1994). Hlavním krokem vpřed byl kolorimetrický test založený na interakci reakčních produktů iP degradace, 3-methyl-2-butenalu, s 4-aminofenolem v kyselém prostředí vytvářející Schiffovu bázi absorbující při 352 nm (Libreros-Minotta, 1995). Tento test vedl k počátku purifikace homogenních enzymů (Morris et al., 1999; Galuszka et al., 2001) a klonování kukuřičného genu (Morris et al., 1999).

Zjištění, že CKX využívá jiných elektronových akceptorů, než kyslík umožňoval použití dehydrogenasového testu. Tento test je založen na odbarvování 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCPIP), který se používá pro počáteční měření CKX aktivity (Galuszka et al., 2001; Bilyeu et al., 2001; Morris et al., 1999).

CKX test metodou PMS MTT

Pro testování derivátů TDZ byl vybrán CKX test metodou PMS MTT. Tato metoda je založena na reakci fenazin methosulfátu (PMS) a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromidu (MTT). Pomocí této metody jsem byl schopen určit, které látky a jak silně inhibovaly aktivitu enzymu AtCKX2.



Obr. č. 9: Reakce MTT s PMS po přidání substrátu, v našem případě CK.

Experimentální část

2. Použitý materiál a přístroje

2.1. Chemikálie

- 96% ethanol, ethanol 70% (v/v) + triton x-100 0,01% (v/v), dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo)
- uhličitan sodný (Na_2CO_3 , Lach-Ner, Česká republika), glycin (Lach-Ner, Česká republika), sacharosa (Sigma-Aldrich, Německo)
- 5x M9 salts: 64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ + 15 g KH_2PO_4 + 5 g NH_4Cl + 2,5 g NaCl bylo rozpuštěno v 1 L redestilované vody. Roztok byl sterilizován autoklávováním
- M9 médium (Sambrook): 80 mL 5x M9 salts + 8 mL 20% glukosa + 0,4 mL 0,1M CaCl_2 + 0,8 mL 1M MgSO_4 + 2 mL casamino acids + 20 μL ampicilin (AHK4 médium) nebo 400 μL chloramfenikol bylo doplněno sterilní redestilovanou vodou na objem 0,4 L
- SOC (20g Bacto Trypton + 5 g kvasniční extrakt + 2 mL 5M NaCl + 2,5 mL 1M KCl + 10 mL 1M MgCl_2 + 10 mL 1M MgSO_4 + 20 mL 1M glukosa, doplněno redestilovanou vodou na objem 1L), LB médium (10g trypton + 5g kvasniční extrakt + 10 g NaCl + 950 mL redestilované vody, pH upraveno na 7)
- stop pufr: 1,99 g 133 mM glycin + 1,76 g mM Na_2CO_3 doplněno redestilovanou vodou na objem 0,2 L. pH upraveno na 10,7
- MS (Murashige & Skoog médium, MES, sacharosa, agar): 2,15 g Murashige & Skoog médium + 0,5 g MES + 1 g sacharosa rozpuštěna v 0,5L destilované vody. pH upraveno na 5,8 pomocí KOH.
- extrakční pufr I (EB I): 50 mM fosfátový pufr pH 7, 10 mM EDTA, 10 mM β -merkaptoethanol, deionizovaná voda
- extrakční pufr II (EB II): 50 mM fosfátový pufr pH 7, 10 mM EDTA, 10 mM β -merkaptoethanol, 0,2% triton x-100, 0,2% SDS, deionizovaná voda
- 4-methylumbelliferyl glukuronid (Sigma-Aldrich, Německo) 4-methylumbelliferyl galaktosid (Sigma-Aldrich, Německo)
- scintilační koktejl (Beckman, Ramsey, MN, USA)
- standardy (10 mM): tZ, ^3H -tZ (1,5 mM; ÚEB AV ČR Praha)
- testované látky (10 mM): deriváty TDZ (Laboratoř růstových regulátorů UP & ÚEB, AV ČR)
- reakční směs: 0,1 M KH_2PO_4 (pH 7,4), 1 mM PMS (fenazin methosulfát), 0,2 mM MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazolium bromidu)

2.2. Biologický materiál

- bakteriální kultura *Escherichia coli* KMI001-pINIII/AHK4
- bakteriální kultura *Escherichia coli* KMI001-pSTV28/AHK3
- *Arabidopsis thaliana* obsahující gen P_{ARR5}::GUS

2.3. Pomůcky

- automatické pipety pro objem 1-10 μ L, 10-100 μ L a 100-1000 μ L, automatická 8-kanálová pipeta, opakovací pipeta, špičky
- 6-jamková deska, 96-jamková deska, centrifugační kyvety, elektroporační kyvety, kyvety pro spektrofotometr
- mikrozkuhavky, stojánek na mikrozkuhavky, falkonky o objemu 50 mL, lžička, plastová vanička, Petriho misky
- odměrný válec, kádinky

2.4. Přístrojová technika

- inkubátor (Thermomixer comfort, Eppendorf Německo)
- spektrofotometr (Synergy H4 Hybrid Reader)
- kulový mlýnek (Retsch MM 301)
- centrifugy (Beckman Avanti™ 30 Centrifuge)
- scintilační analyzátor (Beckman LS 6500)
- analytické váhy

3. Metody

3.1. Elektroporace

Bylo připraveno LB médium s agarem 15 g/L. Elektroporační kyvety byly předem vychlazeny v ledu. Na ledu byly roztáty kompetentní buňky o objemu 45 μ L, které byly vytáhnuty z mrazícího boxu při -80°C. Do mikrozkuhovek s bakteriemi se připipetovala DNA a zamíchalo se špičkou. Takto připravená kultura se napipetovala do elektroporační kyvety. Elektroporátor byl nastaven na 1800 V. Po elektroporaci byl okamžitě do kyvety napipetován 1 mL SOC média a kultura přenesena do mikrozkuhovek. Takto připravené mikrozkuhovek s bakteriální kulturou byly kultivovány při 37°C na 1 h. Připravené LB médium bylo smícháno s antibiotikem: ampicilin (1 μ L/1 mL) pro AHK4 kulturu a chloramfenikol (3 μ L/1 mL) pro AHK3 kulturu. LB médium bylo nalito do Petriho misek. Na toto médium byly napipetovány buňky o objemu 20 nebo 100 μ L. Vybrané kolonie byly odebrány a umístěny do M9

média. Poté narostlá kultura byla umístěna do mikrozkuavek a umístěna do mrazícího boxu při -80°C.

3.2. Receptorový test

Příprava bakteriální kultury *Escherichia coli*

Zmražená kultura *E.coli* KMI001-pINIII/AHK4 byla inokulována sterilní špičkou do M9 média o objemu 3 mL v 6-jamkové destičce. Destička byla vložena do termomixéru a kultivována 24 hod při 25°C a 300 rpm. Takto byla připravena zásobní kultura *E. coli*.

Ředění kultury, přidání testované látky

Standard a roztoky testovaných látek byly vytáhnuty z ledničky. 45 µL zásobní kultury *E.coli* bylo zředěno s 28 mL M9 média v plastové vaničce. Takto zředěná kultura byla pipetována po 1 mL do jamek 24-jamkové desky. Do jamek se zředěnou kulturou bylo následně pipetováno 5 µL 10 mM standardu a testovaných látek. Takto připravené 50 µM roztoky byly přepipetovány do jamek řady A a E po 244 µL do 96-jamkové destičky. Každá testovaná látka byla ve třech opakováních. Z vaničky se zředěnou kulturou bylo odpipetováno po 178 µL do jamek řady B a F, resp. po 200 µL do jamek řady C, D, G a H. Provedla se koncentrační řada tak, že z každé jamky řady A bylo odebráno 44 µL a přepipetováno do jamek řady B. Poté bylo odebráno po 22 µL z jamek řady B a přepipetováno do řady C. Následně z řady C bylo odebráno po 22 µL a přepipetováno do řady D. Nakonec bylo odebráno 22 µL z jamek řady D a vyhozeno do odpadu. Obdobně jsem postupoval s řadami E, F, G a H. Takto byly vytvořené koncentrační řady pro jednotlivé testované látky a standard ve třech opakováních (vzniklé výsledné koncentrace viz tabulka).

řada	Výsledná koncentrace [µM]
A, E	50
B, F	10
C, G	1
D, H	0,1

Obr č.10: vytvoření koncentrační řady pro jednotlivé testované látky.

Na víčku destičky byly nadepsány zkratky standardu a testovaných látek, typ testu a start kultivace. Takto připravená destička byla umístěna do třepacího inkubátoru a kultivována 17 hod při 25°C a 450 rpm.

Stanovení aktivity β -galaktosidasy

25 mM MUGal byl vytáhnut z mrazničky a nechal se rozmrazit při pokojové teplotě.

Po 17 hodinové kultivaci byla destička odebrána z třepacího inkubátoru a umístěna do spektrofotometru. Spektrofotometr byl nastaven pro měření optické hustoty bakterií OD_{600} ($\lambda = 600$ nm). Změřené hodnoty OD_{600} byly exportovány a uloženy do souboru Microsoft Excel.

Rozmražený 25 mM MUGal byl napipetován po 2 μ L opakovací pipetou do nové 96-jamkové destičky. Do jamek s MUGal bylo připipetováno 50 μ L kultury z původní destičky. Takto připravená destička byla umístěna do třepacího inkubátoru a kultivována 30 minut při 37°C a 450 rpm. Po inkubaci se připipetovalo osmikanálovou pipetou 100 μ L stop pufrem. 96-jamková destička byla umístěna do spektrofotometru. Spektrofotometr byl nastaven pro měření fluorescence při $\lambda_{ex} = 355$ nm a $\lambda_{em} = 460$ nm. Takto změřená fluorescence byla exportována a uložena do souboru Microsoft Excel.

Fluorescence byla převedena na nmol MU pomocí kalibrační křivky. Výsledná aktivita β -galaktosidasy byla spočítána jako:

$$\text{výsledná aktivita} = \frac{\text{nmol MU}}{OD_{600}} [\text{nmol MU} \cdot OD_{600}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$$

Výsledná aktivita β -galaktosidasy je v této práci vyjádřena v % (RU).

3.3. ARR5::*GUS* reportérový test

Sterilizace semen *A. thaliana* ARR5::*GUS*

Půl mikrolžičky semen *A. thaliana* bylo vloženo do mikrozkuhavky a připipetováno 800 μ L 70% ethanolu s 0,01% tritonem. Mikrozkuhavka byla vortexována po dobu 10 minut. Poté byla mikrozkuhavka přenesena do předem zapnutého flow boxu. Roztok bez semínek byl odsát a semena byla promyta třikrát 1/2 MS médiem. Takto sterilizovaná semena byla připravena pro kultivaci.

Kultivace semen v 1/2 MS médiu

Kultivace semen probíhala celý proces ve flow boxu. Do každé jamky 6-jamkové destičky bylo napipetováno 1,5 mL sterilní redestilované vody + 1,5 mL MS média. Pomocí automatické pipety jsem do každé jamky přenesl asi 20 μ L suspenze semen. Zabalené 6-jamkové destičky v alobalu byly přeneseny do lednice na 4 dny při 4°C. Po 4 dnech byly destičky přemístěny do fytotronu na třepáčku na

další 4 dny při 21°C. Po vyklíčení dostatečného množství semen bylo k rostlinám připipetováno 3 µL nebo 1,5 µL testované látky o různé koncentraci. Jako standard sloužil BAP, jako negativní kontrola sloužil roztok DMSO. Semenáčky se takto kultivovaly 17 hodin při 21°C. Po kultivaci byly rostlinky odebrány z jamek, osušeny a zmrazeny v kapalném dusíku.

Homogenizace rostlin a následná extrakce β-glukuronidasy

Do předem popsaných mikrozkušavek se zmraženými semenáčky byla vložena kovová kulička a připipetováno 150 µL EB I. Poté se provedla samotná homogenizace v oscilačním vibračním mlýnku po dobu 3 minut při 25 Hz. Poté se připipetovalo 150 µL EB II a mikrozkušavky byly umístěny do lednice po dobu 30 minut při 4°C. Během této doby probíhala extrakce β-glukuronidasy.

Stanovení aktivity β-glukuronidasy

Nejdříve byl připraven čerstvý 25 mM MUGlu. Pomocí opakovací pipety bylo napipetováno 10 µL 25 mM MUGlu do všech jamek 96-jamkové desky. Mikrozkušavky s rostlinným materiálem a extraktem byly zcentrifugovány. Do připravené 96-jamkové destičky s MUGlu bylo přidáno 15 µL rostlinného supernatantu (extraktu). Destička byla přesunuta do třepacího inkubátoru po dobu 30 minut při 37°C. Poté se připipetovalo 125 µL stop pufru pomocí osmikanálové pipety. Spektrofotometr byl nastaven pro měření fluorescence při $\lambda_{ex}= 355$ nm a $\lambda_{em}= 460$ nm. Takto změřená fluorescence byla exportována a uložena do souboru Microsoft Excel.

Stanovení proteinů v rostlinném extraktu

Do nově připravené 96-jamkové desky bylo připipetováno 5 µL rostlinného extraktu ve dvou opakováních a následně přidáno 100 µL roztoku kyseliny bicinchoninové. Destička byla umístěna do třepacího inkubátoru po dobu 20 minut při 37°C. Poté byla změřena absorbance při $\lambda= 562$ nm. Aktivita β-glukuronidasy se vypočítala jako:

$$1 \text{ nmol MU} = 2000 \text{ RFU}$$
$$\text{aktivita} = \frac{\text{fluorescence [RFU]}}{\text{koncentrace} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \cdot 2000 \cdot t \text{ [h]}}$$

3.4. Kompetiční test

Příprava bakteriální kultury *Escherichia coli*

Zmraženou kulturou *E.coli* KMI001-pSTV28/AHK3 bylo inokulováno sterilní M9 médium v Erlenmayerově baňce. Baňka byla vložena do termo-inkubátoru a kultivována nejméně 24 hod při 25°C a 150 rpm. Kultivace byla zastavena když OD_{600} dosáhla 0,6. Takto byla připravena zásobní kultura *E. coli*.

Zahuštění kultury, přidání testované látky

Zásobní kultura byla rozdělena do dvou centrifugačních kyvet. Kyvety byly zváženy a popřípadě vyrovnány jejich hmotnosti a byly zcentrifugovány při 10 000 rpm při 4°C. Kultury byly zahuštěny na dvojnásobek původní hustoty.

Do předem označených mikrozkušavek bylo napipetováno 1 μ L standardu (tZ) a testované látky ve dvou opakováních. Dvě mikrozkušavky, do kterých se nepřidávala žádná látka, sloužila jako negativní kontrola. Poté do takto připravených mikrozkušavek bylo napipetováno 1 mL zahuštěné bakteriální kultury. Následně byly mikrozkušavky přemístěny do izotopové laboratoře. V izotopové laboratoři bylo do každé mikrozkušavky napipetováno po 2 μ L 1,5 nM ^3H -tZ. Mikrozkušavky obsahující bakteriální kulturu s testovanou látkou a ^3H -tZ byly přemístěny do lednice, kde se inkubovaly 40 min při 4°C. Po inkubaci následovala centrifugace vzorků při 12000 rpm na 5 minut. Následně v izotopové laboratoři byl z mikrozkušavek odpipetován supernatant a k peletu byl přidán scintilační koktejl o objemu 1 mL. Pelet se scintilačním koktejlem byl zhomogenizován v ultrazvuku. Po homogenizaci byly mikrozkušavky umístěny do lahvíček.

Stanovení scintilace

Lahvičky s mikrozkušavkami byly vloženy do scintilačního počítače. Na scintilačním počítači bylo změřeno DPM (Disintegrations per minute).

3.5. CKX test metodou PMS MTT

Do každé jamky 96-jamkové destičky bylo přidáno 100 μ L reakční směsi. K reakční směsi byla přidána testovaná látka v 10 μ M koncentraci a iP v 30 μ M koncentraci jako substrát. Poté byl přidán enzym AtCKX2 o objemu 30 μ L. Destičky byly inkubovány ve tmě při 37°C po dobu 30 minut. Poté byla reakce zastavena přidáním 25 μ L 35% kyseliny octové do každé jamky. Měřila se absorbance při 578 nm. Absorbance vzorků bez iP byla odečtena.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Senescenční biotest

V tabulce č. 1 jsou seřazeny deriváty TDZ, které mají alifatický postranní řetězec. Látky jsou seřazeny od nejméně aktivní po nejaktivnější. IC_{50} v tomto případě vyjadřuje koncentraci, ve které látka inhibuje degradaci chlorofylu z 50%. Tučně jsou označeny ty látky, které mají vyšší anti-senescenční aktivitu než standard TDZ. Látka s nejsilnější aktivitou je látka TDZ-3, která převyšuje aktivitu TDZ více než 10x. Látky TDZ-8 a TDZ-5 jsou silnější asi 4x, látky TDZ-13, TDZ-10, TDZ-2 a TDZ-4 mají aktivitu srovnatelnou s TDZ. Dále je zajímavé, že *trans*-zeatin má asi 2x nižší aktivitu než TDZ, a z testovaných látek jen TDZ-7, TDZ-11, TDZ-9 a TDZ-15 mají nižší aktivitu než tZ.

Deriváty s alifatickým substituentem:

Standard	Senescenční biotest (IC_{50} , μM)
tZ	28 (± 7.8)
TDZ	12,8 (± 4.3)
Sloučenina	Senescenční biotest (IC_{50} , μM)
TDZ-3	0,95 ($\pm 0,24$)
TDZ-8	2,9 ($\pm 1,3$)
TDZ-5	3,5 ($\pm 0,6$)
TDZ-13	7,1 ($\pm 1,2$)
TDZ-10	8,6 ($\pm 1,7$)
TDZ-2	9,1 ($\pm 2,1$)
TDZ-4	11,4 ($\pm 2,3$)
TDZ-B	12.6
TDZ-14	14 ($\pm 2,4$)
TDZ-12	22 ($\pm 3,6$)
TDZ-1	26 ($\pm 5,5$)
TDZ-6	25 ($\pm 3,5$)
TDZ-7	62 (± 8)
TDZ-11	83 (± 9)
TDZ-A	97
TDZ-9	151 (± 15)
TDZ-15	N.A.

Tabulka č. 1: přehled IC_{50} derivátů s alifatickým substituentem v pšeničném senescenčním testu.

V případě heterocyklických derivátů (tabulka č. 2) má nejvyšší anti-senescenční aktivitu TDZ-K1, tato látka je asi 8x silnější v oddálení senescence než TDZ. Za povšimnutí stojí látka TDZ-K4, která má srovnatelnou anti-senescenční aktivitu s TDZ, ale na rozdíl od TDZ nemá žádnou cytokininovou aktivitu v ARR5:GUS reportérovým testu. Thioanalog TDZ-K1, látka TDZ-K2 a metylovaný analog TDZ-K1, látka TDZ-K3 vykazovali nižší aktivitu než TDZ.

Deriváty s heterocyklickým substituentem

Standard	Senescenční biotest (IC_{50} , μM)
tZ	28 ($\pm 7,8$)
TDZ	12,8 ($\pm 4,3$)
Sloučenina	Senescenční biotest (IC_{50} , μM)
TDZ-K1	1,6 ($\pm 0,8$)
TDZ-K4	11,2 ($\pm 4,2$)
TDZ-K2	32 (± 8)
TDZ-K3	45 ($\pm 8,5$)

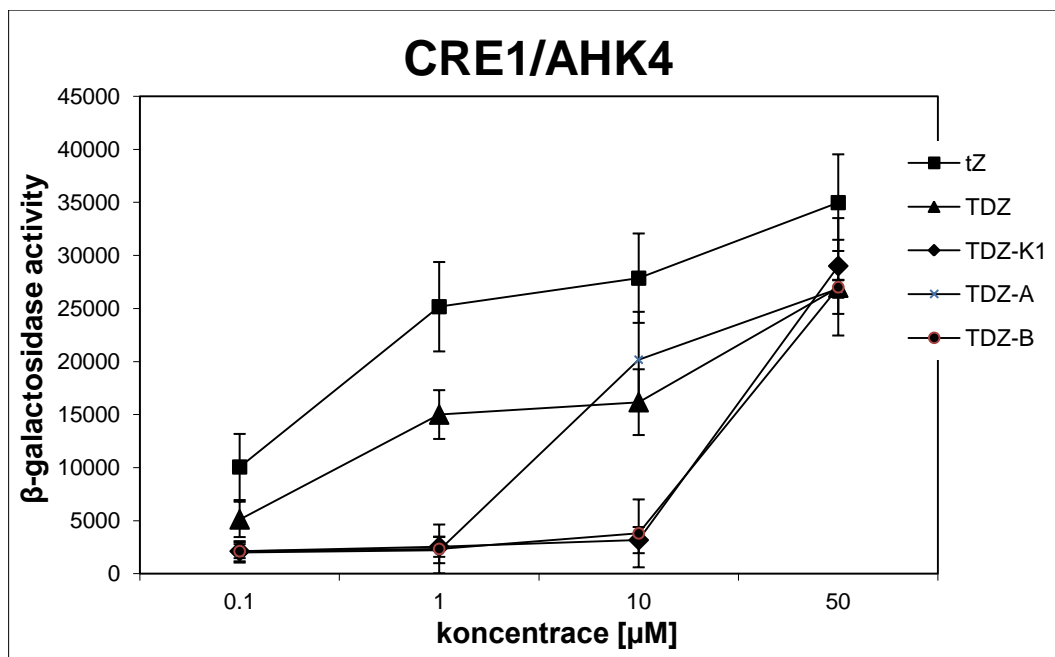
Tabulka č. 2: přehled IC_{50} derivátů s heterocyklickým substituentem v pšeničném senescenčním testu.

Vzhledem k tomu, že řada látek odvozených od TDZ je velice aktivní v pšeničném senescenčním testu, zajímalo nás jak tyto látky aktivují receptor CRE1/AHK4 a jak se váží na AHK3 cytokininové receptory.

4.2. AHK4 receptorový test

Tato *in vitro* metoda nám dává informaci o schopnosti jednotlivých látek aktivovat receptor CRE1/AHK4.

Mezi alifatickými deriváty TDZ byl aktivní pouze TDZ-A a TDZ-B, tj. deriváty, které jsou analogické k přirozeným cytokininům (Graf č. 1). Z heterocyklických derivátů byl aktivní pouze TDZ-K1 a TDZ-K2. Jejich schopnost aktivovat receptor CRE1/AHK4 klesala v tomto pořadí: tZ ($EC_{50} = 0,35 \mu M$) > TDZ ($EC_{50} = 2,6 \mu M$) > TDZ-A ($EC_{50} = 9,4 \mu M$) > TDZ-B ($EC_{50} = 32 \mu M$) > TDZ-K1 ($EC_{50} = 35 \mu M$). Ostatní deriváty vykazovali velmi malou nebo žádnou aktivitu. Přestože, receptor CRE1/AHK4 je znám svou vysokou selektivitou (Spíchal et al., 2004), je nízká aktivita látek a nízké množství aktivních látek překvapivé.



Graf č. 1: Aktivace cytokininového receptoru CRE1/AHK4 vybranými látkami v *E. coli* receptorovém testu. Aktivita derivátů je srovnávána se standardem tZ. Data byla zprůměrována \pm SD ve třech opakováních.

4.3. AHK3 kompetiční test

Nízká aktivita látek na receptoru CRE1/AHK4, byla sice překvapivým výsledkem, nicméně je známo, že senescence je regulována především prostřednictvím receptoru AHK3 a na něj vázaného regulátoru-odpovědi ARR2 (Kim et al., 2006).

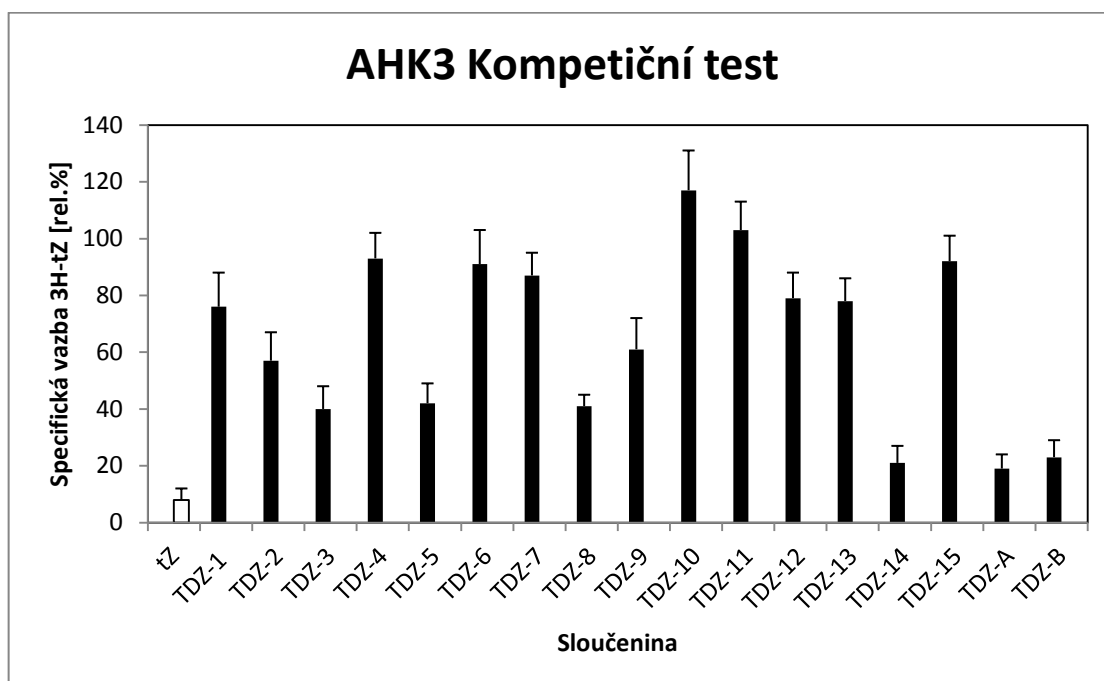
Ke zjištění afinity jednotlivých látek k receptoru AHK3 byl použit kompetiční test s bakteriální kulturou *E.coli*, která exprimuje funkční receptor AHK3. Tento test je založen na kompetici radioaktivně značeného tZ se studovanou látkou a ukazuje, v jaké míře se deriváty TDZ dokáží navázat na receptor AHK3. AHK3 je známý jako receptor s širší ligandovou specifitou než CRE1/AHK4 a je obecně citlivější než CRE1/AHK4 (Spíchal et al., 2004).

Podle grafu č. 2 můžeme říct, že některé deriváty TDZ s alifatickým řetězcem vykazují jistou afinitu k receptoru AHK3, nicméně je jejich afinita mnohonásobně nižší než je afinita přirozených cytokininů nebo afinita TDZ. Např. tZ se na AHK3 receptor váže již v 5-10 nM koncentraci a TDZ vytěsni 2 nM ^3HtZ z 50% již v 50 nM koncentraci. Studované látky byly testovány v koncentraci 20 µM a teprve v této koncentraci byly schopny vytěsnit značený tZ z receptoru AHK3. Nejlépe se vázaly deriváty v tomto pořadí (kolik % ^3HtZ zůstalo navázáno na receptoru po kompetici s danou látkou: TDZ-A (17,2 %) > TDZ-14 (21,2 %) > TDZ-3 (40 %) > TDZ-8 (40 %) > TDZ-5 (45 %) > TDZ-2 (57 %). Zde si lze všimnout, že látky TDZ-3, TDZ-8 a

TDZ-5 mají přibližně stejnou afinitu k receptoru AHK3. Tyto látky jsou také nejaktivnější v senescenčním testu. Naopak látky, které se nejlépe váží na tento receptor (TDZ-A a TDZ-14) nepatří v senescenčním testu mezi nejaktivnější.

Ostatní alifatické deriváty, které v koncentraci 20 μ M nedosahují ani 40% vytěsnění (tj. specifická vazba 3H-tZ je více než 60%) se dají považovat za sloučeniny, které vykazují velmi malou (TDZ-9 > TDZ-1 > TDZ-13) nebo žádnou afinitu (TDZ-12 > TDZ-7 > TDZ-15 > TDZ-6 > TDZ-4 > TDZ-11 > TDZ-10) k receptoru AHK3.

Deriváty s alifatickým substituentem



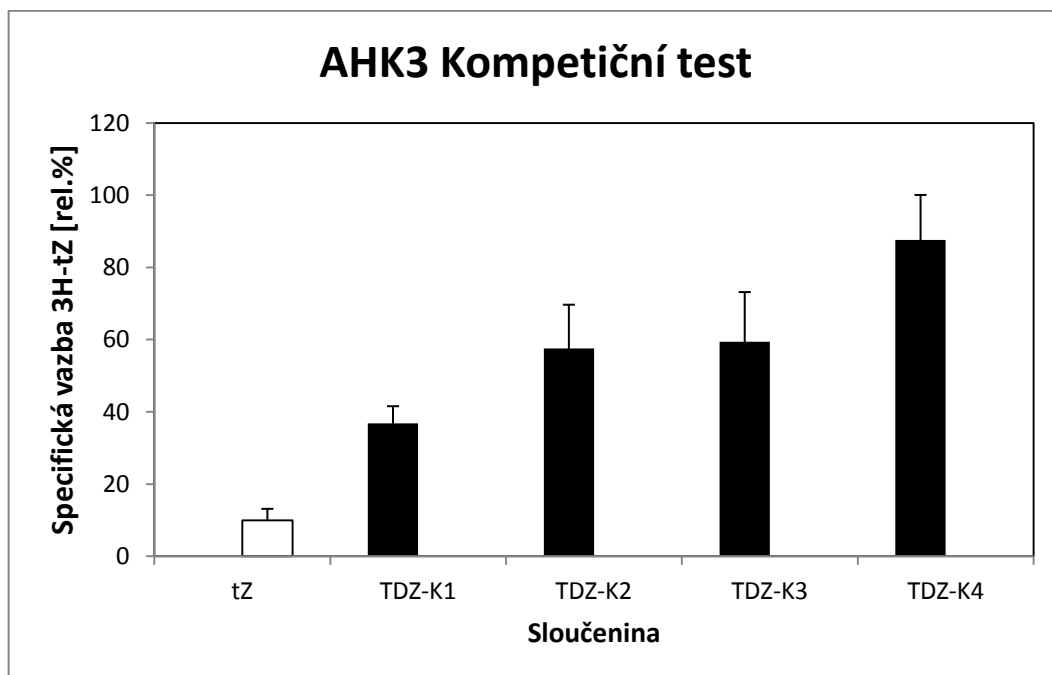
Graf č. 2: Kompetice vybraných alifatických derivátů (černé sloupce) s 2 nM 3 H-tZ. tZ v koncentraci 0,1 μ M sloužil jako pozitivní kontrola (bílý sloupec), a také především k odlišení specifické vazby. Testované látky byly testovány v 20 μ M koncentracích. Data byla zprůměrována \pm SD ve dvou opakováních.

Deriváty s heterocyklickým substituentem

Výsledky jsou prezentovány v grafu č. 3. Látka TDZ-K1, která je jedna z nejaktivnějších v senescenčním testu vytěsnila značený tZ ze 63% (na AHK3 receptoru zůstalo navázáno pouze 37% 3 HtZ). Další deriváty se vázali ještě z nižší afinitou: TDZ-K1 > TDZ-K2 > TDZ-K3 > TDZ-K4. Látka TDZ-K4 nevykazovala téměř žádnou afinitu k receptoru AHK3, pravděpodobně proto, že neobsahuje systém konjugovaných vazeb. Ty jsou s největší pravděpodobností nutné k vazbě látek do AHK3 receptoru. Látky s konjugovaným systémem vazeb jsou také planární, na rozdíl od TDZ-K4.

Je velice zajímavé, že některé deriváty, například TDZ-K4 a TDZ-10 mají vysokou anti-senescenční aktivitu, ale nevykazují žádnou nebo velice nízkou afinitu k jednotlivým CK receptorům.

Pokud porovnáme afinitu jednotlivých látek (20 μM) s afinitou TDZ a tZ, jejichž EC_{50} je řádově v nanomolech, lze říci, že všechny testované látky (s výjimkou TDZ-2 a TDZ-14) mají velice nízkou afinitu k AHK3 receptoru.



Graf č. 3: Kompetice vybraných heterocyklických derivátů TDZ s 2nM $^3\text{H-tZ}$. tZ v koncentraci $0,1 \mu\text{M}$ sloužil jako pozitivní kontrola (bílý sloupec), a také především k odlišení specifické vazby. Testované látky (černé sloupce) byly testovány v $20 \mu\text{M}$ koncentracích. Data byly zprůměrovány \pm SD ve dvou opakováních.

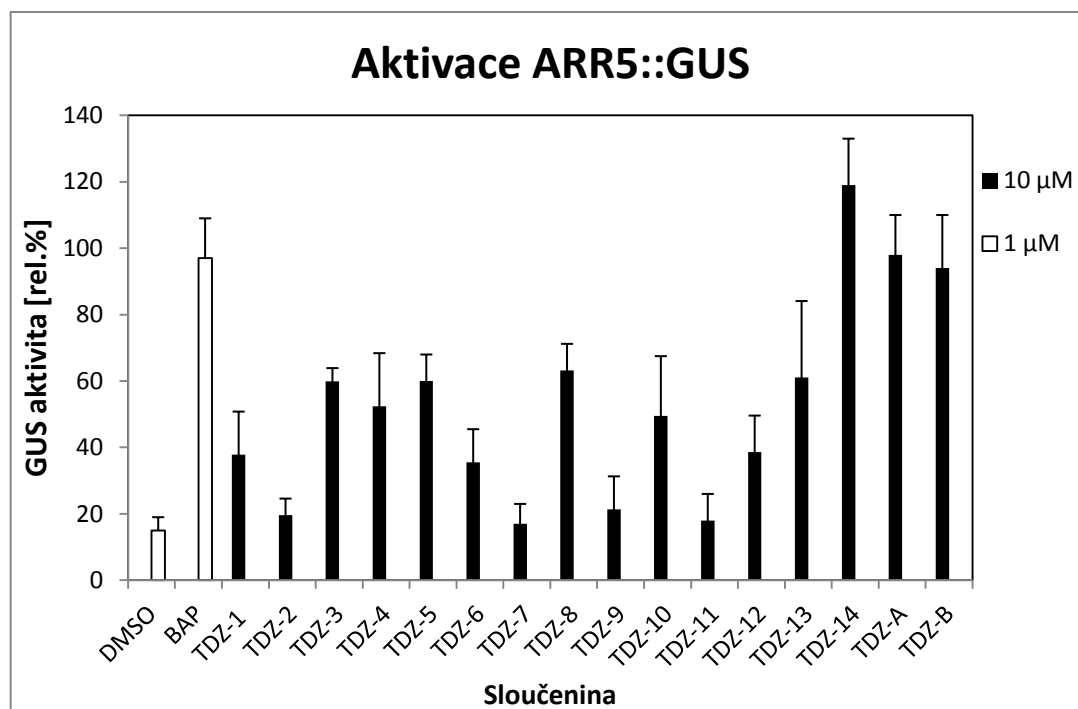
4.4. ARR5:GUS reportérový test

Abychom zjistili celkovou cytokininovou povahu látek, byly všechny deriváty TDZ testovány v tomto *in vivo* testu. Výhodou této *in vivo* metody je, že jsou zde použity semenáčky *A. thaliana*, které obsahují všechny tři cytokininové receptory (CRE1/AHK4, AHK3 a AHK2). V ARR5:GUS reportérovém testu byla testována aktivita derivátů v porovnání se standardem $1 \mu\text{M}$ BAPem, který v této koncentraci dosahuje svého maxima.

TDZ-14 byl neaktivnějším alifatickým derivátem, který v $10 \mu\text{M}$ koncentraci dosahoval aktivity BAPu v $1 \mu\text{M}$ koncentraci. Další deriváty, např TDZ-3, TDZ-5, TDZ-8 a TDZ-13 vykazovali ještě asi poloviční aktivitu v porovnání s aktivitou TDZ-14. Byly asi tak 50x slabšími cytokininy než BAP, ačkoliv jeho aktivitu v senescenčním testu převyšují přibližně 100x. Látky TDZ-9, TDZ-6, TDZ-2, TDZ-11 a

TDZ-7 nevykazovali aktivitu vůbec. Takto slabá cytokininová aktivita je také odrazem jejich slabé interakce s receptory CRE1/AHK4 a AHK3. V tomto testu je zajímavá látka TDZ-2, která neaktivuje expresi ARR2, přestože v senescenčním testu přesahuje aktivitu *tz* i TDZ. Obdobně je na tom látka TDZ-12.

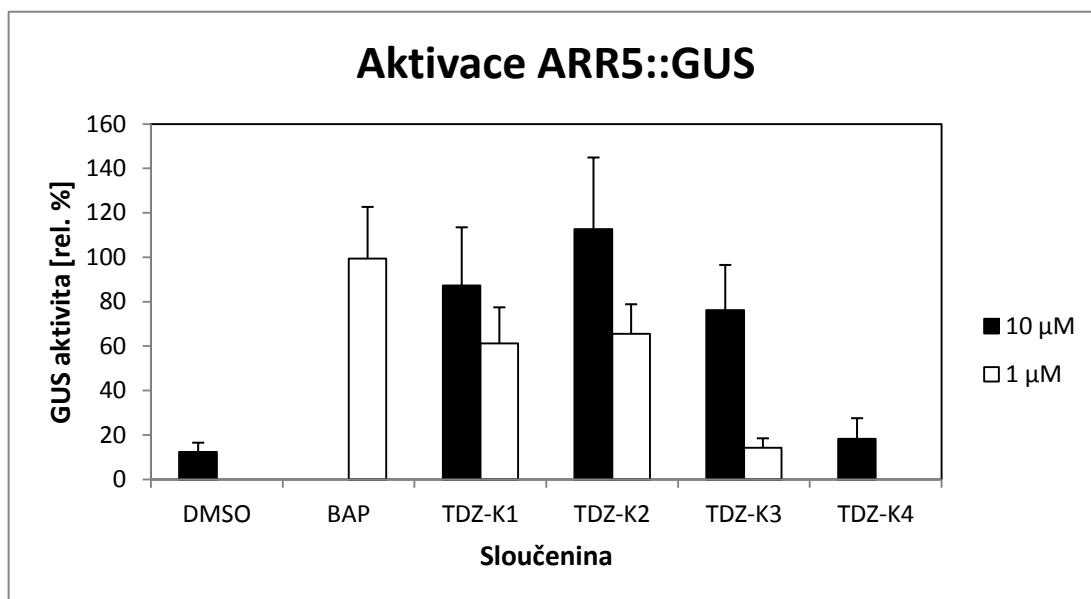
Deriváty s alifatickým substituentem



Graf č. 4: GUS aktivita v ARR5::GUS 3 denních transgenních rostlinách *A. thaliana*. Deriváty byly testovány v 10 µM koncentraci (černé sloupce). Aktivita GUS byla porovnávána s pozitivní kontrolou BAP v 1 µM koncentraci (bílý sloupec). Jako negativní kontrola sloužil DMSO. Data byly zprůměrovány ± SD ve dvou opakováních.

Z heterocyklických derivátů vykazovala nejvyšší CK aktivitu látka TDZ-K1 a TDZ-K2 (Graf č. 5). Tyto látky byly jen o málo méně aktivní než BAP. TDZ-K3 byla asi 10 x slabším cytokininem než TDZ-K1 a látka TDZ-K4 nevykazovala aktivitu žádnou. Látky TDZ-2 a TDZ-K4 mají v tomto ohledu unikátní biologické vlastnosti. Jsou vysoce účinné při oddalování senescence, ale zároveň postrádají cytokininový charakter. Přímou řečeno, tyto látky nejsou cytokininy, přesto, že silně inhibují stresem vyvolanou senescenci u pšenice.

Deriváty s heterocyklickým substituentem



Graf č. 5: GUS aktivita v ARR5::GUS 3 denních transgenních rostlin *A. thaliana*. Deriváty byly testovány v 10 μM koncentracích. Aktivita GUS byla porovnávána s pozitivní kontrolou BAP v 1 μM koncentraci. Jako negativní kontrola sloužil DMSO. Data byly zprůměrovány ± SD ve dvou opakováních.

4.5. Srovnání výsledků ze senescenčního biotestu s aktivitou v ARR5::GUS reportérovém testu

Některé alifatické deriváty TDZ byly oproti standardu TDZ aktivnější v senescenčním testu, a zároveň vykazovali několikanásobně nižší CK aktivitu v ARR5::GUS reportérovém testu (tabulka č. 3). Např. v senescenčním testu byl TDZ-3 až 10x aktivnější než TDZ, ale jeho schopnost aktivovat expresi ARR5 je 1000x nižší než pro TDZ. To samé platí pro látky TDZ-5 a TDZ-8. Ostatní deriváty měly více či méně srovnatelnou aktivitou jako TDZ v senescenčním testu. Dále je zajímavé, že TDZ-2 má srovnatelnou anti-senescenční aktivitu s TDZ v senescenčním biotestu, avšak jeho cytokininová aktivita v ARR5::GUS reportérovém testu je nulová.

Podle tabulky č. 3 byly všechny deriváty odvozené od TDZ-K aktivní v senescenčním biotestu. Např. TDZ-K1 je asi 10x silnější v inhibici rozpadu chlorofylu než TDZ, přesto, že je asi 100x slabším cytokininem v ARR5::GUS reportérovém testu. Stejně tak látka TDZ-K4 není aktivní v ARR5::GUS reportérovém testu, zato má srovnatelnou anti-senescenční aktivitu jako TDZ.

Sloučenina	Senescenční biotest [IC ₅₀ , μM]	GUS aktivita [EC ₅₀ , μM]
tZ	28	0,009
TDZ	12,8	0,004
TDZ-A	97	0,065
TDZ-3	0,95	10
TDZ-5	3,5	9
TDZ-2	9,1	>20
TDZ-8	2,9	10
TDZ-14	14	0,8
TDZ-K1	1,6	0,8
TDZ-K2	32	0,8
TDZ-K3	45	7
TDZ-K4	11,2	>50

Tabulka č.3: Srovnání výsledků ze senescenčního biotestu s aktivitou v *ARR5::GUS* reportérovém testu.

Závěrem lze říci, že některé látky odvozené od TDZ s alifatickým nebo heterocyklickým substituentem měly vyšší aktivitu než TDZ a přirozené cytokininy v senescenčním biotestu, ale v ostatních cytokininových testech nevykazovali tak vysokou cytokininovou aktivitu jako TDZ a přirozené cytokininy. Můžeme tedy říct, že cytokininová aktivita nijak nekoreluje s anti-senescenčními účinky jednotlivých látek. Na druhou stranu, látky, které vykazují alespoň slabou cytokininovou aktivitu jsou účinnější při zpomalení degradace chlorofylu než, ty které nejsou cytokininy vůbec. **Z těchto výsledků vyplívá, že i látky necytokininové povahy mohou inhibovat degradaci chlorofylu ve stárnoucích listech rostlin.**

4.6. Inhibice CKX

TDZ je znám nejen svou silnou cytokininovou aktivitou, ale také CKX inhibiční aktivitou. Proto také všechny deriváty TDZ byly otestovány v CKX inhibičním testu. V *AtCKX2* inhibičním testu byla vyhodnocena schopnost derivátů TDZ inhibovat tento enzym. Pro jednotlivé látky byly stanoveny hodnoty IC₅₀, které jsou v tabulce č. 4. Enzym *AtCKX2* byl vybrán proto, že je jedním z nejvíce aktivních CKX enzymů v *Arabidopsis* (Schmülling et al., 2003).

Všechny výše popsané deriváty, tj. deriváty s alifatickým a heterocyklickým substituentem byly otestovány na CKX inhibiční aktivitu. **Žádná z těchto látek neinhibovala činnost enzymu AtCKX2.**

Nicméně v Laboratoři Růstových Regulátorů byly připraveny i další deriváty TDZ, a to takové, které měly různě substituovaný fenylový cyklus a byly syntetizovány s cílem připravit inhibitory CKX.

Z tabulky č. 4 je patrné, že se podařilo připravit deriváty, které mají silnější AtCKX2 inhibiční aktivitu než TDZ. Látky nesoucí hydroxylovou skupinu UR-02 ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$) a UR-04 ($IC_{50} = 12,3 \mu\text{M}$) jsou nejaktivnější deriváty, přesahující aktivitu TDZ více jak 10x. Dále sloučenina UR-14 ($IC_{50} = 13,4 \mu\text{M}$), která nese dvě halogenové skupiny, je také velice aktivní. Silné aktivity dosahují také další látky - UR-10CH > UR-15 > UR-01 > UR-11. Látky UR-05 a UR-06 mají aktivitu srovnatelnou s TDZ.

Sloučenina	AtCKX2 IC_{50} [μM]
TDZ	215,5
UR-02	10
UR-04	12,3
UR-14	13,4
UR-10CH	25,3
UR-15	22,8
UR-01	34,7
UR-11	51,9
UR-03	141
UR-05	205
UR-06	206
UR-13	361

Tabulka č. 4: Srovnání IC_{50} testovaných látek s IC_{50} TDZ.

5. Závěr

Během vypracování této bakalářské práce jsem se zabýval biologickou aktivitou derivátů TDZ. Tyto deriváty jsem během testování rozdělil do dvou skupin: zaprvé jsou to deriváty, které mají heterocyklický nebo alifatický alkylový zbytek a zároveň mají anti-senescenční vlastnosti v pšeničném senescenčním testu a **neinhibují** *AtCKX2* a za druhé jsou to deriváty, které mají substituovaný fenylový zbytek a zároveň **jsou inhibitory** enzymu *AtCKX2*.

Látky zařazené v první skupině jsem dále otestoval v AHK4 receptorovém testu, kde jsem zjišťoval míru aktivace receptoru AHK4 jednotlivými látkami. Dále jsem zjišťoval afinitu jednotlivých látek k receptoru AHK3 v AHK3 kompetičním testu. Tento test je obdobou AHK4 receptorového testu a byl zvolen proto, že receptorový test s bakteriemi, které mají AHK3 receptor je špatně proveditelný a výsledky nebyly jednoznačné. Pomocí těchto testů s jednotlivými ck receptory jsem zjistil, že většina látek, ačkoliv má silné anti-senescenční účinky, neaktivuje receptor AHK4 ani se neváže nijak výrazně na receptor AHK3. Abych získal další informace o cytokininové povaze jednotlivých látek, otestoval jsem je v *ARR5::GUS* reportérovém testu. Toto je nejuniverzálnější cytokininový test, protože k aktivaci genu *ARR5* přispívají všechny 3 CK receptory (*AHK2*, *AHK3* a *AHK4*). Výsledky tohoto testu jasně ukazují, že testované látky jsou asi 10x a více slabšími cytokininy než BAP a 100x a více slabšími cytokininy než TDZ a tZ.

Tyto výsledky jsou zřejmou evidencí toho, že i látky, které nemají cytokininový charakter, mohou zpomalovat senescenci u rostlin. Nyní je třeba najít skutečný mechanismus účinku těchto látek. Je známo, že také další rostlinné hormony mohou oddalovat senescenci, např. gibereliny nebo brasinosteroidy. Nicméně toto jsou hormony s naprostou odlišnou strukturou od mnoha studovaných látek. I přesto, že mechanismus účinku těchto látek není znám, je jisté, že tyto látky mají unikátní biologické vlastnosti a v budoucnu by mohly být používány v zemědělství ke zmírnění stresem indukované senescence rostlin.

Látky, které patří do druhé skupiny a mají pouze substituovaný fenylový zbytek jsem otestoval pouze na inhibici *AtCKX2*. Mezi těmito látkami se našla řada těch, které mají vyšší inhibiční aktivitu než TDZ. Nutno dodat, že by bylo potřeba blíže se zabývat biologickou aktivitou těchto látek, např. zjistit zda-li inhibují také další CKX, např. CKX z kukuřice. Také tyto látky mají potenciál pro využití v praxi jako růstové regulátory.

6. Použitá literatura

Arndt F., R. Rusch, H. V. Stifried. 1976. A new cotton defoliant. *Plant Physiol.* **57**: 599.

Arima Y., Oshima K., Shudo K. 1995. Evolution of a novel ureatype cytokinin horticultural uses of forchlorphenuron. *Acta Hortic.* **394**: 75-84.

Badenoch-Jones J., Parker C.W., Letham D.S., Singh S. 1996. Transcriptional regulation of hydroxypyruvate reductase gene expression by cytokinin in etiolated pumpkin cotyledons. *Planta.* **198**: 1-5.

Balibrea Lara M.E., Gonzales Garcia M.C., Tahira F., Rainer E., Taek K. L., Reinhard P., Widmar T., Thomas R. 2004. Extracellular Invertase Is an essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. *The Plant Cell.* **16**: 1276-1287.

Biddington T.H. 1973. A modified Amaranthus betacyanin bioassay for the rapid determination of cytokinins in plant extracts, *Planta.* **111**: 183-186.

Bilyeu K. D., Cole J.L., Laskey J. L., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M.D., Morris R. O. 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**: 378-386.

Chatfield J.M., Armstrong D.J. 1986. Regulation of Cytokinin Oxidase Activity in Callus Tissues of Phaseolus vulgaris L. cv Great Northern. *Plant Physiol.* **80** (2): 493-499.

Chen Chong-maw. 2006. Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum* **101**: 665-673.

Entsch B., Letham D. S. 1979. Enzymic glycosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopruine. *Plant Sci Lett.* **14**: 205-212.

Entsch B., Letham D. S., Parker. 1983. An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**: 375-381.

- Famiani F., Batistelli A., Moscatello S., Boco M., Antognozzi E. 1999. Thidiazuron affects fruit growth, ripening and quality of *actinidia deliciosa*. *J. Horstic. Sci. Biotechnol.* **74**: 375-380.
- Ferreira F., Kieber J.J. 2005. Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol.* **8**: 518-25
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62 (8)**: 2431-2452.
- Frébortová J. 2008. Metabolické přeměny cytokininů. *Habilitační práce*.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Peč P. 2000. Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Reg.* **32**: 315-327.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela, M., Sauer, P., Jacobsen, S., Peč, P. 2001. Cytokinin oxidase or dehydrogenase?. *European Journal of Biochemistry.* **268(2)**: 450-461.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Frébort, I. 2007. Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation.* **26(3)**: 255-267.
- Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort, I. 2004. Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat. *European Journal of Biochemistry.* **271(20)**: 3990-4002.
- Gan S., Amasino R.M. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science.* **270**: 1986–1988.
- Gu R., Fu J., Guo S., Duan F., Wang Z., Mi G., Yuan L. 2010. Comparative expression and phylogenetic analysis of maize cytokinin dehydrogenase/oxidase (CKX) gene family. *Journal of Plant Growth Regulation.* **29**: 428-440.

- Hare P.D., van Staden J. (1994). Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*. **91**: 128-136.
- Heyl A., Schmölling T. 2003. Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**:480–488.
- Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kakimoto T. 2004. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101(23)**: 8821-8826.
- Hopping M.E. 1976. Effect of exogenous auxins, gibberellins and cytokinins on fruit development in Chinese gooseberry. *N. Z. J. Bot.* **14**: 69-75.
- Horgan R., Hewett E.W., Horgan J.M., Purse J., Wareing PF. 1975. A new cytokinin from *Populus ×robusta*. *Phytochemistry* **14**: 1005–1008 .
- Horgan R., Hewett EW., Purse J., Wareing .PF. 1973. A new cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Lett* **30**: 2827–2828.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. 2004. N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. **279**: 47822-47832.
- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. 1999. Cytokinin oxidase from *Zea mays* purification, cDNA cloning and expresion in moss protoplasts. *The Plant Journal*. **17**: 615-626.
- Hwang I., Chen H.C., Sheen J. 2002. Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **129(2)**: 500-515.
- Hwang I., Sakakibara H. 2006. *Physiol. Plant*. **126**: 528-538.
- Chen C.M. 1997. Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiol Plant*. **101**: 665-673.

Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. and Kakimoto T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*. **409**: 1060–1063.

John P.C.L., Zhang K. 2001. Cytokinin control of cell proliferation in plant development. In Francis, ed, *The Plant Cell Cycle and Its Interfaces*, CRC Press, Boca Raton: 190–211.

Jones R.J., Schreiber BMN. 1997. Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regul.* **23**: 123–134.

Kakimoto T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**: 677-685.

Kamínek M., Motyka V., Vaňková R. 1997. Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia Plantarum*. **101**: 689-700.

Karanov E. M., Iliev L. K., Alexieva V. S. 1992. Phenylurea cytokinins-chemistry physiology and application. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. 199-204.

Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 814–819.

Kopečný D. et al. 2010. Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: a structural study. *Biochimie*. **92(8)**: 1052-62.

Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*. **445**: 652-655.

- Kuroha T., Hiroki T., Mikiko K., Nanae U., Takashi I. 2009. Functional Analyses of *LONELY GUY* Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **21(10)**: 3152-3169.
- Laloue M., Fox J.E. 1989. Cytokinin oxidase from wheat. Partial purification and general properties. *Plant Physiol.* **90**: 899-906.
- Letham D. S. 1963. Zeatin a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sci.* **8**: 596.
- Li X., Mo X., Shou, H., Wu P. 2006. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1112–1123.
- Libreros-Minotta C.A., Tipton P.A. 1995. A colorimetric assay for cytokinin oxidase. *Analytical biochemistry.* **231(2)**: 339-341.
- Lochmanová G., Zdráhal Z., Konečná H., et al. 2008. Cytokinin-induced photomorphogenesis dark-grown Arabidopsis: a proteomic analysis. *Journal of Experimental Botany.* **59**: 3705-3719.
- Miller C.O. 1961. Cytokinins in *Zea mays*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **144**: 251-257.
- Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* **77**: 1392.
- Mok M.C., Mok D.W.S., Amstron D.J., Shudo K., Isogai Y., et al. 1982 Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry.* **21**: 1509-1511.
- Motyka V., Faiss M., Strand, M., Kamínek, M., Schmulling, T. 1996. Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic *tobacco calli* and plants. *Plant physiology.* **112(3)**: 1035-1043.

Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N. 1999. Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**: 328–333.

Nooden L.D., Kahanak G.M., Okatan Y. 1979. Prevention of monocarpic senescence in soybeans with auxin and cytokinin: an antidote for self-destruction. *Science.* **206**: 841–843.

Novák J., Pavlů J., Novák O., Nožková-Hlaváčková V., Špundová M., Hlavinka J., Koukalová Š., Skalák J., Černý M., Brzobohatý B.. 2013. High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany.* **112**: 41-55.

Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. 1971. Conversion of N6-(Δ^2 -isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology.* **48**: 775-778.

Richmond A.E., Lang A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. *Science.* **125**: 650-651.

Rivero R.M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler R., Gepstein S., Blumwas E. 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in flowering plant. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**: 19631-19636.

Rumack B.H., Hall A.H. (naposledy upraveno 2014) Information System Micromedex, Inc., Englewood, CCIS Volume **161**. Dostupný z: <http://toxnet.nlm.nih.gov>

Sheen J. 2002. Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science.* **296**: 1650-1652.

Schmülling T., Werner T., Riefler M., Kurpkova E., Bartrina y Manns I. 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research.* **166**: 241-252.

Singh S., Letham D.S., Palni L.M.S. 1992. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous

applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiol Plant*. **86**: 388–397.

Smart C.M. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytol*. **126**: 419–448.

Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W., Dyer T.A. 1991. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell*. **3**: 647–656.

Strnad M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant*. **101**: 674-688.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. 2004. Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*. **279**: 41866-41872.

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.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **15**: 471-497.

Kakimoto T. 2001. Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate:ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol*. **42(7)**: 677-685.

Veselov D., Langhans M., Hartung W., et al. 2003. Development of *agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoot are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene, and abscisic acid. *Planta*. **216**: 512-522.

Wang J., Letham D.S. 1995. Cytokinin oxidase-purification by affinity chromatography and activation by caffeic acid. *Plant Science*. **112**: 161-166.

Welch J. T. Eswarakrishnan. 1991. Fluorine in Bioorganic Chemistry. *Wiley*.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*. **15**: 1-20.

Werner T., Schmülling T. 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol*. **12(5)**: 527-538.

Zatloukal M., Gemrotová M., Doležal K., Havlíček L., Spíchal L., Strnad M. 2008. Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic & medicinal chemistry*. **16(20)**: 9268-9275.

Zalabák D., Galuszka P., Mrízová K., Podlešáková K., Gu R., Frébortová J. 2014. Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiol Biochem*. **74**: 283-93.

Zhang K., Ludger D., Peter C.L. John. 2005. The Cytokinin Requirement for Cell Division in Cultured *Nicotiana plumbaginifolia* Cells Can Be Satisfied by Yeast Cdc25 Protein Tyrosine Phosphatase. Implications for Mechanisms of Cytokinin Response and Plant Development. *Plant Physiol*. **137(1)**: 308-316.

Zwack P.J., Robinson B.R., Risley M.G., Rashotte A.M. 2013. Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses. *Plant Cell Physiol*. **54(6)**: 971-981.

7. Seznam použitých zkratk

AHK2/ AHK3	<i>Arabidopsis</i> histidin kinasa 2 a 3
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfotransportérový protein
ARR	<i>Arabidopsis</i> response regulátor
BAP	Benzylaminopurin
CHASE	cyclases/histidine kinase associated sensory extracellular
CK	cytokinin, cytokininová
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CPPU	N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)urea
CRE1/AHK4	cytokinin response 1/ <i>Arabidopsis</i> histidin kinasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -Zeatin
DHZ	dihydrozeatin
DMSO	dimethylsulfoxid
DPU	difenylmočovina
EB I a II	extrakční pufr I a II
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	polovina maximální efektivní koncentrace
GUS	β-glukuronidasa
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
iP	N ⁶ -(Δ ² -isopentenyl)adenin
IPT	isopentenyltransferasa
K	kinetin
MS	Murashige-Skoog
<i>mT</i>	<i>meta</i> -Topolin
MU	4-methylumbelliferon
MUGal	4-methylumbelliferyl galaktosid
MUGlu	4-methylumbelliferyl glukuronid
N.A.	Není aktivní
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -Topolin
OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
TDZ	thidiazuron
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -Zeatin