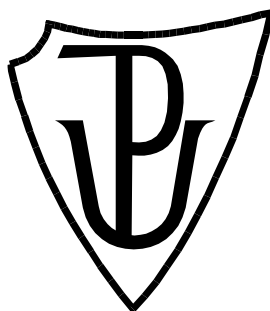


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Izolace 2-methylthio-cytokininů mikroextrakcí  
polymerním monolitem**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Jakub Kořistka</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.</b>
Rok:	2014

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

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli Petru Tarkowskému, za všechny jeho rady, připomínky, konzultace a za odborné vedení mé bakalářské práce. Děkuji také svým kolegům z laboratoře za ochotu pomoci a za příjemnou atmosféru na pracovišti.

V neposlední řadě děkuji rodině a přítelkyni za jejich trpělivost, lásku a hlavně podporu v každodenním životě.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Kořistka
Název práce	Izolace 2-methylthio-cytokininů mikroextrakcí polymerním monolitem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

### Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na analýzu 2-methylthio derivátů cytokininů izolovaných z kultivačního média bakterie *Rhodococcus fascians*. Cílem této práce bylo vyvinout rychlou purifikační metodu a zrychlit metodu koncové analýzy šesti 2-methylthio-derivátů cytokininů. Kromě použití klasické extrakce na pevné fázi (SPE) se v této práci podařilo vyvinout jednoduchou, rychlou a levnou jedнокrokovou purifikační metodu - mikroextrakci polymerním monolitem (PMME) s využitím kopolymeru 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny a ethylendimethakrylátu - poly(AMPS-co-EDMA). Tato purifikační metoda je až desetkrát rychlejší než klasická SPE.

Při vývoji UHPLC metody analýzy těchto šesti 2MeS derivátů cytokininů byl použit systém reverzních fází. Po nalezení vhodné stacionární fáze a chromatografických podmínek se podařilo celkovou dobu analýzy těchto šesti derivátů 2MeS cytokininů zkrátit na třetinu (17 minut), proti metodě původní. Závěrem byla kombinace mikroextrakce polymerním monolitem a ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí použita ke kvantitativní analýze dominantního derivátu (2MeS-*cis*-zeatin) izolovaného z kultivačního média *Rhodococcus fascians* D188.

Klíčová slova	cytokininy, 2-methylthio-deriváty cytokininů, extrakce, purifikace cytokininů, profilování cytokininů
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Kořistka
Title	Isolation of 2-methylthio-cytokinin by polymer monolith microextraction
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2014

### Abstract

This work focuses on the analysis of 2-methylthio derivatives of cytokinins isolated from the supernatant of bacteria *Rhodococcus fascians*. The main objectives of this work were to develop a rapid purification method and acceleration of UHPLC-MS/MS method for the final analysis of six 2-methylthio-derivatives cytokinins. Besides using the classic solid phase extraction (SPE) in this work, we developed a simple, fast and inexpensive one-step purification method – polymeric monolith microextraction (PMME) by using a copolymer of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid and ethylenedimethacrylate - poly(AMPS-co-EDMA). This purification method is up to ten times faster than classic SPE.

During developing UHPLC method of analysis of these six 2MeS derivatives cytokinins was used a system with the reversed-phase. After selecting a suitable stationary phase and chromatographic conditions, a total analysis time was reduced to one-third (17 minutes) in comparison with original method. Finally, the combination of a polymeric monolith microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry is used for quantitative analysis of dominant derivative (2MeS-cis-zeatin) isolated from the bacterial culture of *Rhodococcus fascians* D188.

Keywords	cytokinins, 2-methylthio derivates of cytokinins, extraction, purification of cytokinins, cytokinin profiling
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

## Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši obsahující klíčová slova: cytokininy, 2-methylthio-deriváty cytokininů, extrakce a purifikace cytokininů, profilování cytokininů.
2. Purifikace 2MeS cytokininů pomocí mikroextrakce (PMME).
3. Vývoj chromatografické metody pro koncovou analýzu šesti 2MeS derivátů cytokininů.
4. Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů v bakterii *Rhodococcus fascians* D188.

# OBSAH

<b>1 Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2 Současný stav řešené problematiky</b>	<b>2</b>
2.1 Rostlinné hormony	2
2.1.1 Auxiny	3
2.1.2 Cytokininy	4
2.1.3 Gibereliny	5
2.1.4 Ethylen	6
2.1.5 Kyselina abscisová	7
2.1.6 Brassinosteroidy	8
2.1.7 Strigolaktony	9
2.1.8 Jasmonáty	10
2.1.9 Polyaminy	11
2.2 Cytokininy	12
2.2.1 Biosyntéza cytokininů	14
2.2.2 Inaktivace a degradace cytokininů	17
2.2.3 Cytokininy jako signální molekuly	18
2.2.4 Interakce s dalšími fytohormony	19
2.3 2-Methyl-thio cytokininů	20
2.3.1 Biosyntéza 2MeS cytokininů	21
2.4 <i>Rhodococcus</i>	22
2.4.1 <i>Rhodococcus fascians</i>	23
2.4.2 Využití bakterie <i>Rhodococcus fascians</i>	25
2.5 Metody studia cytokininů	26
2.5.1 Extrakce	26
2.5.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)	27
2.5.3 PMME	28
2.5.4 Metody koncové analýzy	32
2.5.4.1 HPLC	32
2.5.4.2 UHPLC-MS	34
2.5.4.3 Hmotnostní spektrometrie	34
<b>5 Diskuze</b>	<b>36</b>
<b>6 Závěr</b>	<b>39</b>
<b>7 Literatura</b>	<b>40</b>
<b>8 Seznam použitých symbolů a zkratk</b>	<b>45</b>

# 1 Úvod

Cytokininy tvoří jednu ze skupin rostlinných hormonů. V rostlinném těle, spolu s dalšími skupinami fytohormonů, hrají důležitou roli regulátora rostlinných procesů, mezi které například patří regulace buněčného dělení, apikální dominance, oddálení senescence, řízení opadu listů a mnoho dalších (Mok *et al.*, 2000). Některé patogenní bakterie syntetizují vlastní deriváty cytokininů, které potlačují obranné funkce u napadeného hostitele, a tímto podporují šíření infekce. Po chemické stránce jsou cytokininy deriváty adeninu, substituované na pozici N<sup>6</sup> adeninového kruhu. Dle typu postranního řetězce rozlišujeme dvě základní skupiny cytokininů, a to isoprenoidní a aromatického typu. Cytokininy se mohou nacházet v několika formách. Biologicky aktivní formu představují volné báze, mezi méně biologicky aktivní formy patří jejich ribosidy, ribotidy, *O*-glykosidy pak slouží jako zásobní molekuly a *N*-glykosidy jsou označovány jako neaktivní formy (Mok *et al.*, 2000).

Díky tomu, že svou přítomností dokáží ovlivňovat a řídit růst a vývoj rostlin, si získaly velkou pozornost a jsou předmětem studia. Cytokininy, a obecně všechny fytohormony, se nacházejí v rostlinách nebo některých bakteriích ve velmi malých koncentracích. Z tohoto důvodu je nutné mít citlivé metody pro jejich kvalitativní a kvantitativní analýzu. Vývoj těchto analytických metod představuje stěžejní krok studia fytohormonů. V dnešní době se pro jejich studium využívá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s UV-VIS detektorem nebo hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS/MS; Tarkowski *et al.*, 2009).



## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Rostlinné hormony

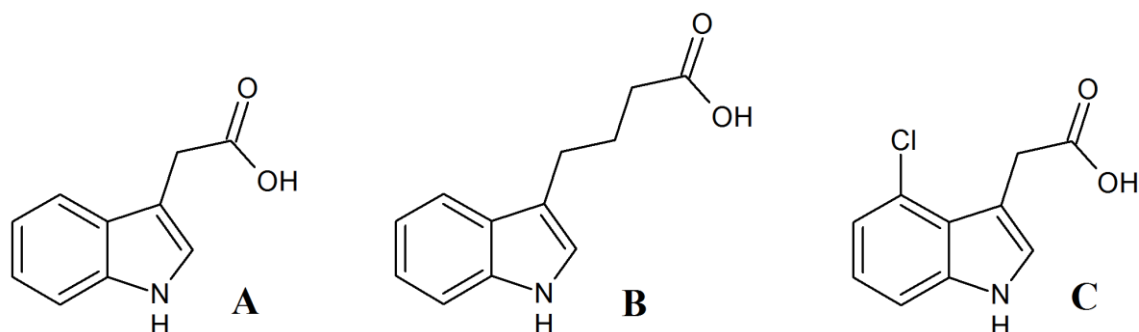
Vývoj rostlin je ovlivňován mnoha faktory, jak endogenními, tak i působením nejrůznějších podmínek vnějšího prostředí. Mezi endogenní faktory patří významná skupina organických nízkomolekulárních látek - rostlinných hormonů - nazývaná také jako fytohormony. Rostlinné hormony jsou přirozenou součástí rostlin, tyto látky si rostlina sama syntetizuje a jsou mezi rostlinami univerzální. Jednotlivé hormony jsou vytvářeny v různých částech rostliny různými buňkami a odtud jsou poté translokovány do ostatních částí rostlinného těla, kde ve velmi malé koncentraci, často v koncentracích  $10^{-6}$  až  $10^{-9}$  mol.l<sup>-1</sup>, způsobují fyziologickou odpověď. Tato odpověď je dána schopností buněk signál zachytit specifickými receptory a následně na něj reagovat. Celková odpověď je většinou závislá na kooperaci dvou či více fytohormonů, jejich množstvím, oblastí, kde v rostlině působí a na citlivosti na daný hormon. Tato úroveň citlivosti je regulována ontogeneticky. Konečná odpověď může mít povahu stimulace či inhibice. Podle funkce, účinků či chemické povahy jsou fytohormony děleny do skupin (Taiz a Zeiger, 2010; Nambara, 2013).

Některé chemické látky s podobnou stavbou, často deriváty, které nejsou v rostlinách syntetizovány, dokáží simulovat a ovlivnit signální odpověď. Výsledkem může být i změna metabolismu, biosyntézy či degradace fytohormonů nebo ovlivnění transportních drah z míst syntézy do míst účinku. Některé látky pozměňují citlivost receptoru na signál v jednotlivých pletivech, kde daný signál působí (Taiz a Zeiger, 2010).

Efekty působení těchto růstových regulátorů jsou pleiotropní, což znamená, že povětšinou mají několik různých projevů a jsou ovlivněny dalšími různými podmínkami, jako například jejich koncentrací, typem růstové látky, vývojovým stádiem rostliny nebo fyziologickým stavem buněk, pletiv či orgánů, které na daný specifický signál reagují. Tyto změny citlivosti jsou důležitým prvkem regulace procesů vývoje v rostlině. Zmíněné efekty jsou dále ovlivněny i vnějšími faktory, například intenzitou světelného záření, teplotou, vlhkostí atd. Základní studium těchto látek a jejich efektů může probíhat dvěma způsoby, a to buď sledováním úrovně určitého fytohormonu za určitých podmínek a stádia fyziologického vývoje, nebo sledováním účinků dodané růstové látky (Taiz a Zeiger, 2010; Nambara, 2013).

### 2.1.1 Auxiny

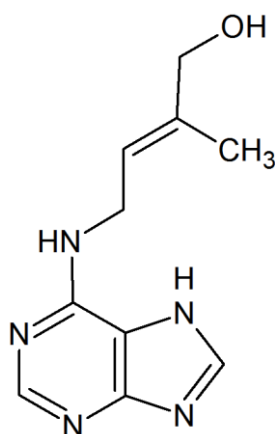
Auxiny jsou nejdéle známou skupinou fytohormonů. Název auxin pochází z řeckého slova *auxó*, což v překladu znamená „zvětšovat se“ (Tromas a Perrot-Rechenmann, 2010). Auxiny poprvé popsal v roce 1926 Nizozemský botanik F. Went. Produkce auxinů v rostlinách je klíčovým faktorem pro jejich růst, reakce na okolní prostředí a hlavně pro vývoj rostlinných orgánů (např. listů a květů; Taiz a Zeiger, 2010). Toto je dosaženo díky velmi složitému a dobře koordinovanému systému aktivního transportu molekul auxinu z buňky do buňky po celém těle rostliny podle tzv. polárního transportu auxinu. To znamená, že rostlina jako celek může reagovat na vnější podmínky a přizpůsobit se jim bez nutnosti mít nervový systém (Tromas a Perrot-Rechenmann, 2010). Auxiny obvykle jednají ve shodě nebo v opozici s ostatními fytohormony – například poměr auxinu a cytokininu v určitých rostlinných tkáních ovlivňuje zahájení růstu nových kořenů proti vzniku pupenů. Mezi nejdůležitější fyziologické funkce auxinu patří regulace gravitropismu (orientace růstu podzemních a nadzemních částí rostliny), fototropismu (ohyb rostlin za zdrojem světla), stimulace/inhibice tvorby postranních kořenů, regulace apikální dominance rostliny, podpora růstu a prodlužování stonku (Iino, 2001; Strohm *et al.*, 2013). Dále se také podílí na udržování polaritě pletiv, stimuluje vývoj plodu a ovlivňuje diferenciaci nových pletiv. Mezi nejdůležitější fytohormony patřící do této skupiny jsou kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA) a kyselina 4-chlor-indolyl-3-octová (4-Cl-IAA; Taiz a Zeiger, 2010; Tromas a Perrot-Rechenmann, 2010).



Obr. 1 Strukturální vzorce auxinů – IAA (A), IBA (B), 4-Cl-IAA (C).

## 2.1.2 Cytokininy

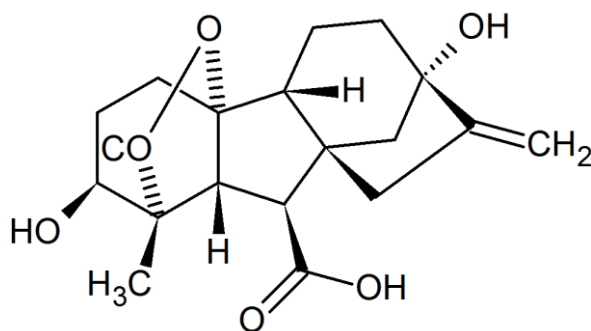
Cytokininy byly poprvé objeveny v 50. letech 20. století F. K. Skoogem na univerzitě ve Wisconsinu – Madison (USA) v kokosovém mléce. První cytokinin s názvem kinetin byl úspěšně izolován až v roce 1955. Po chemické stránce se jedná o 6-furfurylaminopurin (Miller *et al.*, 1955). Od té doby již bylo identifikováno více než 40 derivátů cytokininů. Většina přirozeně se vyskytujících cytokininů jsou N<sup>6</sup>-substituované deriváty adeninu s isoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem, lišící se přítomností dalších funkčních skupin, dvojných vazeb či jejich pozicí (Mok *et al.*, 2000). Svou roli hrají v široké škále biologických procesů v rostlinách, jako jsou například stimulace buněčného dělení, řízení opadávání listů, kontrola apikální dominance, diferenciacie chloroplastů, indukce exprese genů fotosyntézy či regulace tolerance ke stresu (sucho, vysoká teplota, vysoká salinita atd.; Taiz a Zeiger, 2010).



Obr. 2 Strukturální vzorec *t*-zeatinu (*tZ*).

### 2.1.3 Gibereliny

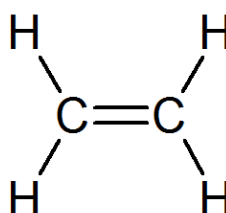
Gibereliny byly objeveny v průběhu 30. let 20. století v Japonsku skupinou vědců vedených E. Kurosawou při studiu choroby rýže, která byla způsobena houbou *Gibberella fujikuroi*. Tato houba vylučuje kyselinu giberelovou, která byla poprvé úspěšně izolována v 50. letech 20. století (Taiz a Zeiger, 2010). V dnešní době je známo více než 130 sloučenin patřících do této skupiny (Stirk *et al.*, 2013). Po chemické stránce jsou gibereliny diterpenoidy složené ze čtyř isoprenoidních jednotek, kdy každá obsahuje 5 uhlíkových atomů. Mezi hlavní účinky giberelinů patří stimulace kvetení, klíčení semene, prodlužování stonku a zvětšování listu (Harberd *et al.*, 1998).



Obr. 3 Strukturální vzorec giberelinu A1 (GA1).

### 2.1.4 Ethylen

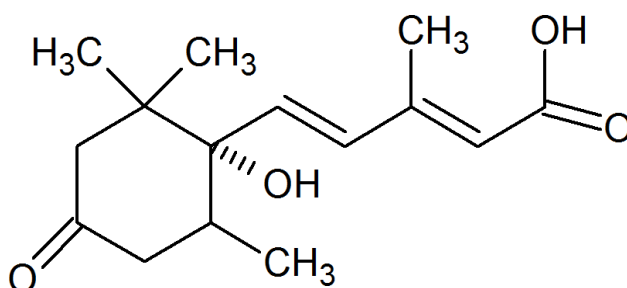
Ethylen je jediným plynným fytohormonem, který je produkován všemi rostlinnými částmi, ale pouze některé z nich ho produkují ve velkém množství. Ethylen je také tvořen jako odpověď na stresové podmínky rostliny při poranění či nákaze patogenem. Svými účinky podporuje zrání plodů, ovlivňuje opad listů, stimuluje tloušťnutí stonku a kořenů, inhibuje růst do délky nebo vyvolává tvorbu adventivních kořenů (Lin *et al.*, 2009; Taiz a Zeiger, 2010).



Obr. 4 Strukturální vzorec ethylenu.

### 2.1.5 Kyselina abscisová

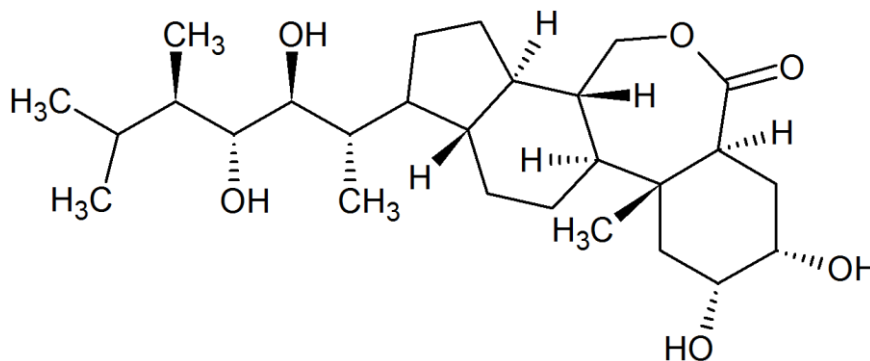
Kyselina abscisová je na rozdíl od ostatních fytohormonů samostatnou strukturou. Byla původně nazývána „abscisin II“, protože se zprvu předpokládalo, že hraje významnou roli při dormanci pupenů. Kyselina abscisová (ABA) byla poprvé identifikována v roce 1963 F. Addicottem a jeho spolupracovníky (Taiz a Zeiger, 2010). Jedná se o seskviterpen s 15 uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule, vyskytující se ve vícero izomerech, z kterých je ale pouze aktivní (S)-ABA. V rostlinách hraje důležitou roli, a to tím, že snižuje citlivost na nedostatek vody a reguluje otevírání a zavírání průduchů. V určitém období vývoje rostliny, například při zrání semene, je potřeba výrazně snížit obsah vody v buňkách. Její vysoká koncentrace také brání předčasnému vyklíčení semene, stimuluje růst laterálních kořenů a dormanci pupenů (Hetherington a Quatrano, 1991).



Obr. 5 Strukturální vzorec kyseliny abscisové.

### 2.1.6 Brassinosteroidy

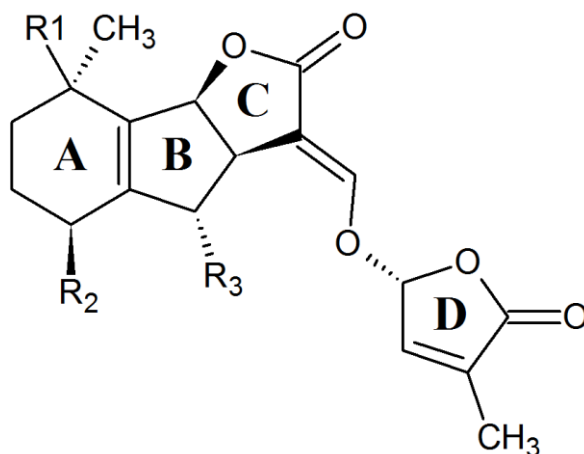
Brassinosteroidy jsou šestou objevenou skupinou fytohormonů. První byl v roce 1979 izolován fytohormon brassinolid z pylu řepky olejky (*Brassica napus*), a odtud tedy pochází název pro celou skupinu, která dnes obsahuje přes 70 druhů brassinosteroidů (Bajguz a Hayat, 2009; Taiz a Zeiger, 2010). Tyto fytohormony se steroidní strukturou působí synergicky s některými ostatními hormony, jako například s auxiny nebo gibereliny. Brassinosteroidy stimulují dělení a objemový růst buněk, indukují kvetení, podporují klíčení semene. Jejich další funkcí je ochrana rostliny před stresovými faktory z vnějšího prostředí (Bajguz a Tretyn, 2003).



Obr. 6 Strukturální vzorec brassinolidu.

## 2.1.7 Strigolaktony

Skupina fytohormonů byla poprvé popsána v 60. letech 20. století (Taiz a Zeiger, 2010). Svou strukturou to jsou terpenoidní látky odvozené od karotenoidů. Dodnes bylo popsáno 15 zástupců této skupiny (Xie a Yoneyama, 2010). Strigolaktony jsou syntetizovány v kořenech rostlin a odkud se rozvádějí do zbytku těla. Stimulují růst parazitických rostlin, jejich signál aktivuje větvení a prorůstání mykorrhizních hub, což má za následek vznik symbiózy mezi houbou a rostlinou. Tento symbiotický vztah mezi rostlinami a houbami se nazývá mykorrhiza a přináší své výhody pro obě strany. Mykorrhizní houba výměnou za své minerální látky přijímá fixovaný uhlík z hostitele. Na rozdíl od ostatních fytohormonů je role strigolaktonů velmi specifická (Ruyter-Spica *et al.*, 2013).

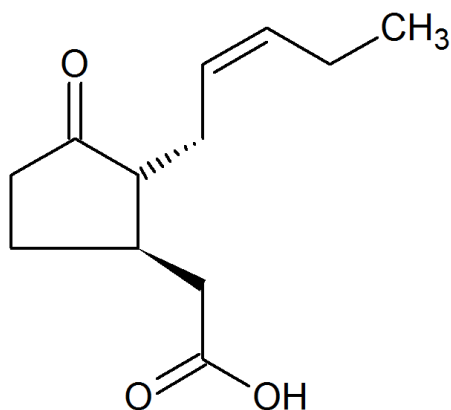


Obr. 7 Obecný strukturální vzorec strigolaktonu.



### 2.1.8 Jasmonáty

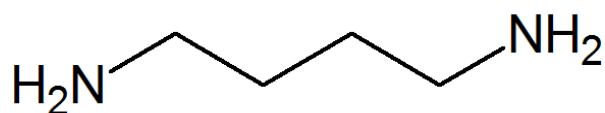
Jasmonáty jsou malou skupinou fytohormonů odvozených od kyseliny linolové. První identifikovaný fytohormon pocházel z oleje připraveného z jasmínu obecného. Kyselina jasmonová a její deriváty jsou obecně nazývány jasmonáty a jsou produkovány v některých částech rostlinného těla. Odtud jsou poté transportovány floémem do ostatních částí, kde aktivují genovou expresi tím, že se připojí k promotorům. Dále ovlivňují dozrávání plodů (spolu s ethylenem), inhibují růst kořenů, řídí vývoj a otevírání květů a stimulují v nich sekreci nektaru. V neposlední řadě také podporují vznik obranných látek proti patogenům, a to tím, že aktivují expresi genů, které kódují různé obranné mechanismy proti tomuto poškození (Devoto *et al.*, 2005; Taiz a Zeiger, 2010).



Obr. 8 Strukturální vzorec kyseliny jasmonové.

### 2.1.9 Polyaminy

Polyaminy jsou skupina alifatických aminů s nerozvětveným řetězcem, které vznikají biosyntézou z aminokyselin. Tato skupina látek nepatří mezi fytohormony, ale představují skupinu látek s regulační aktivitou. Jejich hlavní funkcí je regulace růstu, oddálení senescence a jsou součástí procesů, které chrání rostliny před stresem. Polyaminy mají antioxidační účinky, schopnost neutralizovat kyselé sloučeniny a stabilizují buněčné membrány. Patří zde například spermidin, spermin, putrescin a kavaderin (Zhao a Yang, 2008).



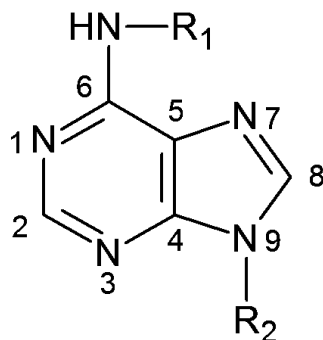
Obr. 9 Strukturní vzorec putrescinu.

## 2.2 Cytokininy

Cytokininy patří do skupiny rostlinných hormonů, které jsou nezbytné pro mnoho vývojových pochodů. Cytokininy ovlivňují buněčné dělení, apikální dominanci, senescenci nebo zvyšují toleranci ke stresovým podmínkám (Mok *et al.*, 2000).

Přírozně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem napojeným na pozici N<sup>6</sup> aromatického kruhu. Dle povahy postranního řetězce cytokininy rozlišujeme na isoprenoidní a aromatické. Jednotlivé deriváty se liší přítomností různých funkčních skupin nejen na postranním řetězci, ale i na purinovém jádře (Mok *et al.*, 2000). Cytokininy s aromatickým postranním řetězcem nejsou v přírodě příliš běžné, vyskytují se pouze v několika rostlinných druzích (Strnad, 1997). Isoprenoidní cytokininy se dělí na dvě podskupiny, a to cytokininy odvozené od isopentenyladeninu (iP) a cytokininy zeatinového typu, které obsahují hydroxylovaný isopentenyl. Cytokininy zeatinového typu se dále dělí na *trans* a *cis* v závislosti na tom, která ze dvou metylových skupin je na postranním řetězci hydroxylovaná. Aktivita *trans*-zeatinu je daleko větší než aktivita *cis*-zeatinu. Cytokininy se v aktivní formě vyskytují ve formě bází, v méně aktivní jako ribosidy či ribotidy (Kakimoto, 2003).

Tab. 1 Základní skelet molekuly cytokininu, strukturní vzorce a zkratky vybraných cytokininů (převzato z Tarkowski, 2011).



$R_1$	$R_2$	Název cytokininu	Zkratka
	H	Isopentenyladenin	iP
	H	<i>trans</i> -zeatin	<i>tZ</i>
	H	<i>cis</i> -zeatin	<i>cZ</i>
	H	Dihydrozeatin	DHZ
	H	Benzyladenin	BA
	H	<i>ortho</i> -topolin	<i>oT</i>
	H	<i>meta</i> -topolin	<i>mT</i>

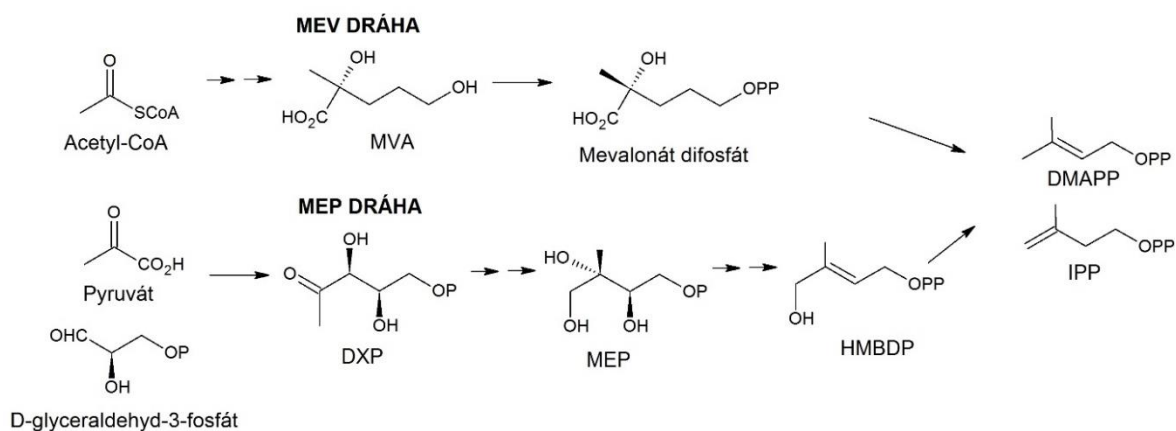
### 2.2.1 Biosyntéza cytokininů

Zvýšené hladiny cytokininů nalezneme převážně v mladých dělicích pletivech, například ve vrcholech stonků, mladých listech nebo v kořenových špičkách (Emery *et al.*, 2000). Hladina cytokininů v daném místě (pletivu, či buňce) je regulována biosyntézou, konjugací, interkonverzí, degradací a transportem.

Biosyntéza cytokininů odvozených od isopentenyladeninu začíná přenosem isoprenoidní části na adenin pomocí enzymu isopentenyltransferasy (IPT, EC 2.5.1.27; Takei *et al.*, 2001). Donorem isoprenoidního postranního řetězce jsou dimethylallyl difosfát (DMAPP) a 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát (HMBDP; Krall *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2005). V případě připojení preferovanější DMAPP a formaci cytokininu odvozených od isopentenyladeninu může být postranní řetězec dále hydroxylován pomocí cytochromu P450 monooxygenasy (Takei *et al.*, 2004). Cytokininové nukleotidy jsou poté hydrolyzovány za vzniku volných bází.

Biosyntéza cytokininů zeatinového typu je možná pomocí dvou různých metabolických drah, a to buď isopentenyladenin-dependentní dráhou, kde je prvně produkován isopentenyladenin nukleotid a poté je hydroxylován za účasti cytochromu P450 monooxygenasy (Åstot, *et al.*, 2000). Druhou možností je isopentenyladenin-independentní dráha, kde jsou cytokininy *trans*-zeatinového typu produkovány přímo přenosem hydroxylovaného postranního řetězce z prekursoru HMBDP na adeninový kruh (Sakakibara *et al.*, 2005). V rostlinách jsou přítomny dvě dráhy pro produkci isoprenoidních řetězců, které jsou součástí prekursorů obou drah. První je mevalonátová dráha, lokalizovaná v cytosolu a mitochondriích, která produkuje prekurzory pro biosyntézu sterolů, některých seskviterpenů a postranního řetězce ubiquinonu. Druhou je methyletrytritol fosfátová dráha, lokalizovaná v plastidech, která je zodpovědná za produkci monoterpenů, některých seskviterpenů, diterpenů, karotenoidů a postranních řetězců pro chlorofyl a plastochinon (Lange *et al.*, 2000; Laule *et al.*; 2003). Mevalonátová dráha začíná kondenzací tří molekul acetyl-CoA a postupnou redukcí na mevalonát, který je poté dvakrát fosforylován za vzniku mevalonát-5-difosfátu. Poté následuje další fosforylace, dekarboxylace a nakonec izomerace na DMAPP. Methyletrytritol fosfátová dráha začíná kondenzací pyruvátu a glycerinaldehydu-3-fosfátu za vzniku sloučeniny 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátu, ze které následně vzniká methyletrytritol fosfát. V dalším kroku dochází ke spojení s cytidylfosfátem, následuje fosforylace a cyklizace. Vzniklý HMBDP může být dále

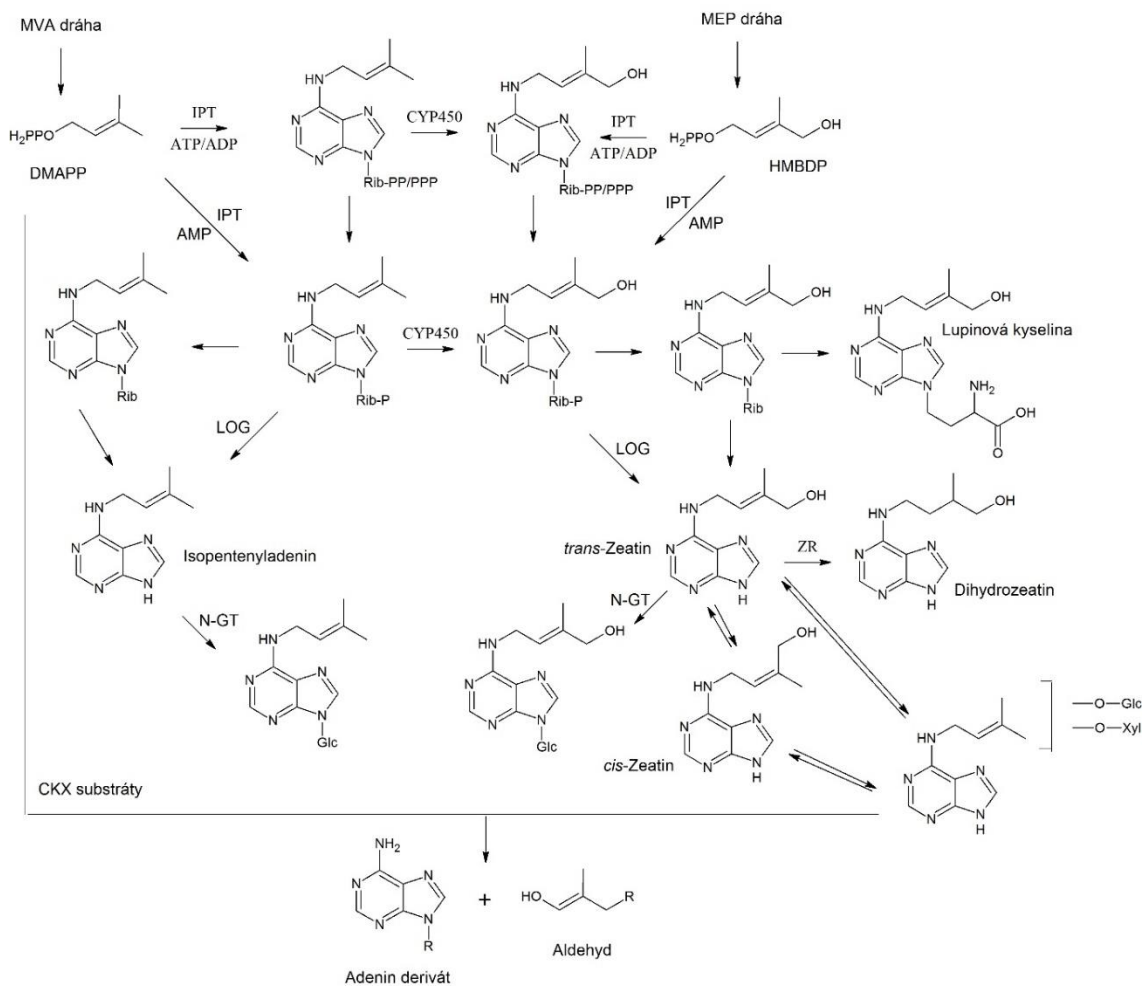
redukován na isopentenyl difosfát a DMAPP (Lange *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2005).



Obr. 11 Schéma mevalonátové a methyletrytriol fosfátové dráhy pro biosyntézu isoprenoidního řetězce (převzato z Kakimoto, 2003).

DMAPP – dimethylallyl difosfát; DXP – 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát; HMBDP – 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát; MEP – methyletrythritol fosfát; MVA – mevalonátová kyselina; IPP – isopentenyl difosfát

Cytokininy jsou *de novo* syntetizovány jako látky neaktivní a jsou skladovány ve formě nukleotidu, mono-, di- nebo trifosfátů. Aktivace a poslední krok biosyntézy cytokininů je tedy hydrolytické štěpení *in vivo* pomocí enzymu fosforibohydrolasy, také nazývaného jako „LOG“, který byl nalezen v rýži a v genomu *Arabidopsis* (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009). LOG enzym je zodpovědný za štěpení ribosa-5'-monofosfátu z nukleotidu cytokininu, což má za následek vytvoření biologicky aktivní cytokininové báze v jednom kroku. Substráty pro LOG enzym jsou také di- nebo trifosfáty a všechny typy isoprenoidních adenosin-5'-monofosfátů (Kurakawa *et al.*, 2007).

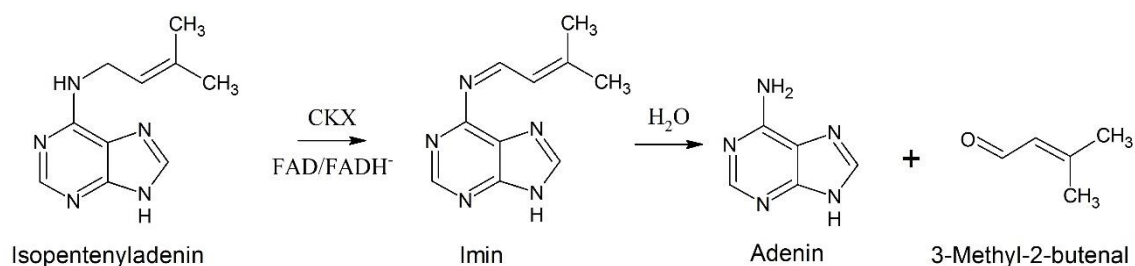


Obr. 12 Schéma metabolismu cytokininů (převzato z Frébort *et al.*, 2011).

IPT – isopentenyltransferasa; CYP450 – cytochrom P450 monoxygenasa; LOG – cytokinin fosforibohydrolasa („Lonely guy“); N-GT – cytokinin N-glukosyltransferasa; βGLU – β-glukosidasa; CKX – cytokinindehydrogenasa; ZOGT – zeatin-O-glukosyltransferasa; ZI – zeatinisomerasa; ZR – zeatinreduktasa; LAS – synthasa kyseliny lupinové

## 2.2.2 Inaktivace a degradace cytokininů

Molekula cytokininu může být inaktivována konjugací s cukerným zbytkem v reakci katalyzované enzymem UDP-glykosyltransferasou (UGT, EC 2.4.1.X). V tomto procesu je uridin difosfát (UDP) donorem molekuly cukru pro konjugaci s molekulou cytokininu. Konjugace může proběhnout na *O*- nebo *N*- pozici cytokininu. *N*-glykosidy jsou ireverzibilní formou, ale *O*-glykosidy mohou být reverzibilně deglykosidovány zpět na aktivní molekulu cytokininu pomocí enzymu  $\beta$ -glukosidasy (EC 3.2.1.21; Brzobohatý *et al.*, 1993; Hou *et al.*, 2004). Glukosidované cytokininy jsou zásobními formami, které jsou rezistentní vůči působení degradačního enzymu cytokinindehydrogenasy (CKX). Glykosilace umožňuje rostlině udržovat ideální obsah cytokininů v jednotlivých orgánech a fázích svého vývoje (Mok *et al.*, 2005). Další možností, jak kontrolovat hladinu cytokininů v rostlinných tkáních, je jejich ireverzibilní degradace. Tato degradace je katalyzována enzymem cytokinin dehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.12), náležící do skupiny oxidoreduktas, obsahující molekulu FAD. Při této reakci dochází k oxidativnímu štěpení na N<sup>6</sup> postranním řetězci za vzniku adeninu, nebo jeho derivátu, a aldehydu z postranního řetězce (Frébort *et al.*, 2011).

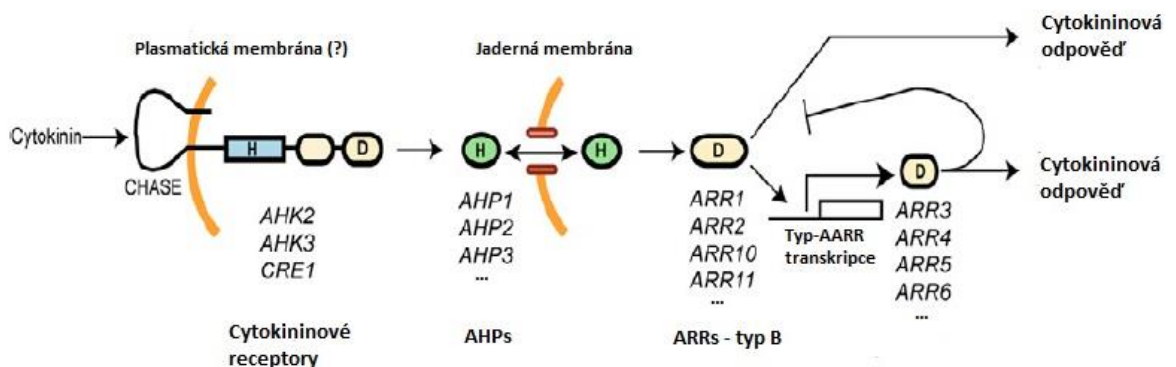


Obr. 13 Schéma degradace isopentenyldeninu katalyzovanou za přítomnosti enzymu cytokininidehydrogenasy (CKX).



### 2.2.3 Cytokininy jako signální molekuly

Cytokininový signál je přenášen do jádra dvoukrokovým signálním systémem označovaným jako histidyl-aspartyl (His-Asp) signální kaskáda. První krok v signální kaskádě je percepcie molekuly cytokininu pomocí senzoru histidinkinasového receptoru (HK). Histidinkinasový receptor se skládá z CHASE domény, jedné vysílací a dvou přijímacích domén. Připojení cytokininové molekuly na CHASE doménu má za následek konformační změny doprovázené autofosforylací vysílací a přijímací domény. Dalším krokem je přenos signálu z receptoru na regulátory odezvy (RR) typu B, který je zprostředkován histidinfosfotransferovými proteiny (HPS). Existují dva typy regulátorů odezvy, typ-A a typ-B, které se liší svou strukturou a funkcí. Přenos fosfátu na RR typ B vede k aktivaci exprese genů primární cytokininové odpovědi. Zároveň dochází k expresi RR typ A, které negativně regulují cytokininovou signální dráhu. Dochází ke genové expresi a odezvě na cytokininový signál (Imamura *et al.*, 1999, Hwang a Sakakibara, 2006).



Obr. 14 Model cytokininové signální dráhy v huseníčku (převzato z Kieber a Schaller, 2010).

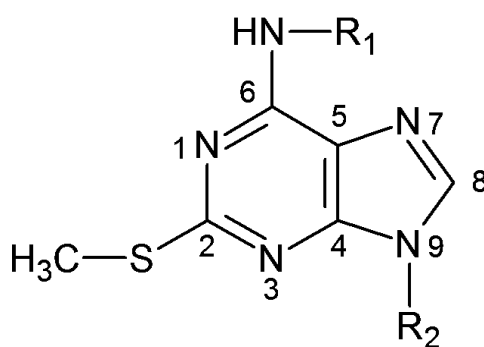
#### **2.2.4 Interakce s dalšími fytohormony**

Vývojové procesy jsou regulovány i dalšími fytohormony než jen cytokininy, a to hlavně ethylenem (Růžička *et al.*, 2007, 2009) a auxinem (Galuszka *et al.*, 2008; Pernisová *et al.*, 2009, 2011). K interakci může docházet na několika úrovních – úroveň metabolismu, přenosu signálu, transportu, genové exprese nebo také na úrovni stability proteinů. (Pernisová *et al.*, 2011). Cytokininy jsou pozitivními regulátory biosyntézy auxinu, ale auxiny jsou negativními regulátory biosyntézy cytokininů, což bylo prokázáno u měření koncentrace u huseníčku (Jones *et al.*, 2010).

### 2.3 2-Methyl-thio cytokininy

2-Methyl-thio cytokininy (2MeS CK) tvoří skupinu derivátů substituovaných na uhlíku v poloze 2 adeninového kruhu. Tyto deriváty byly objeveny u některých bakterií a rostlin (Tarkowski, 2011). Některé z nich se nacházejí v tRNA. Jsou tedy pravděpodobně důležité v průběhu translace pro stabilizaci interakcí mezi mRNA a tRNA. Po chemické stránce jsou tyto deriváty hydrofobnější a v rostlinách se vyskytují v nižších koncentracích než klasické cytokininy (Tarkowski *et al.*, 2010).

Tab. 2 Základní skelet molekuly 2MeS cytokininu, strukturální vzorce a zkratky vybraných 2MeS cytokininů (převzato z Tarkowski *et al.*, 2010)



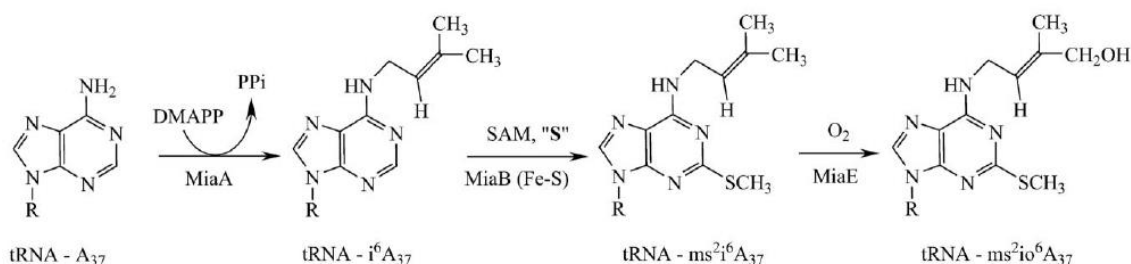
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Název cytokininu	Zkratka
	H	2-methylthio-isopentenyladenin	2MeSiP
	R	2-methylthio-isopentenyladenin ribosid	2MeSiPR
	H	2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin	2MeStZ
	R	2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin ribosid	2MeStZR
	H	2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin	2MeScZ
	R	2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin ribosid	2MeScZR

R: β-D-ribosa

### 2.3.1 Biosyntéza 2MeS cytokininů

V současné době je známý proces biosyntézy 2MeS CK pouze u některých bakterií (například *Salmonella typhimurium*; Mathevon *et al.*, 2007). U rostlin jsou znalosti biosyntézy těchto derivátů zatím velmi omezené.

Prvním krokem v biosyntéze těchto derivátů v tRNA je vytvoření  $i^6A_{37}$ , který je katalyzován enzymem tRNA( $i^6A_{37}$ ) synthasou. Isopentenyllová skupina, pocházející z metabolismu mevalonátové kyseliny (DMAPP), je poté přenesena isopentenyl transferasou z iP na pozici 37 adeninu ( $A_{37}$ ) v tRNA, kde v dalším kroku probíhá připojení thio skupiny pocházející z cysteinu a methylové skupiny pocházející z adenosilmethioninu. Tento krok je katalyzován za přítomnosti enzymu MiaB a je závislý na přítomnosti železa, cysteinu a S-adenosylmethioninu (SAM; Gefter, 1969). Poté může v posledním kroku nastat hydroxylační reakce katalyzovaná enzymem MiaE, která je závislá na přítomnosti kyslíku (Buck a Ames, 1984).



Obr. 15 Biosyntetická dráha pro 2MeSiP v tRNA (*Salmonella typhimurium*; Mathevon *et al.*, 2007).

DMAPP – dimethylallyl difosfát; PP<sub>i</sub> - difosfát; SAM – S-adenosylmethionin

## 2.4 *Rhodococcus*

*Rhodococcus* je rod aerobních, nepohyblivých, grampozitivních bakterií žijících v různých podmínkách, nejčastěji v půdě a vodě nebo jako patogeny v eukaryotických buňkách (McLeod *et al.*, 2006). Převážná většina bakterií z rodu *Rhodococcus* je neškodných nebo prospěšných, ale patří zde i druhy, které jsou patogenní. Kultury mají různé zbarvení, běžně se vyskytují v podobě koků, z kterých mohou přecházet pomocí morfologických změn na tyčinky a poté na filamenta, která se větví, dochází k jejich rozpadu a opakování celého životního cyklu. V roce 2006 došlo k úspěšné sekvenaci genomu *Rhodococcus sp.* RHA1, kde bylo zjištěno, že obsahuje jeden z největších genomů u domény bakterií. Tento genom obsahuje 9 702 737 párů bazí uspořádaných do čtyř lineárních replikonů – jednoho chromozomu a tří plasmidů pRHL1, pRHL2 a pRHL3. Obsah G-C je 67 % (McLeod *et al.*, 2006).

Tab. 3 Zařazení rodu *Rhodococcus* do systému (ncbi.nlm.nih.gov – Taxonomy browser).

<b>Doména</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Kmen</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Třída</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Podtřída</b>	<i>Actinobacteridae</i>
<b>Řád</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>Podřád</b>	<i>Corynebacterineae</i>
<b>Čeleď</b>	<i>Nocardiaceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Rhodococcus</i>

Rod *Rhodococcus* je zajímavý a důležitý hlavně kvůli svému metabolismu. Bakterie totiž obsahují rozsáhlý enzymatický aparát a v plazmatické membráně kyselinu mykolovou, což má za následek schopnost přijímat hydrofobní látky, katabolizovat širokou škálu organických sloučenin a produkovat z nich užitečné produkty. Příkladem může být schopnost metabolizovat škodlivé chemické sloučeniny přítomné v životním prostředí, jako jsou naftalen, toluen a PCB, na látky pro životní prostředí neškodné. Díky svému metabolismu jsou důležité i v průmyslovém využití, a to z důvodu produkce kyseliny akrylové, akrylamidu, bioaktivních steroidů nebo desulfurizace fosilních paliv (McLeod *et al.*, 2006). Zajímavé je také využití metabolitu indenu, který je používán k výrobě léku indinaviru, který slouží jako proteasový inhibitor při léčbě HIV (Treadway *et al.*, 1999).

### 2.4.1 *Rhodococcus fascians*

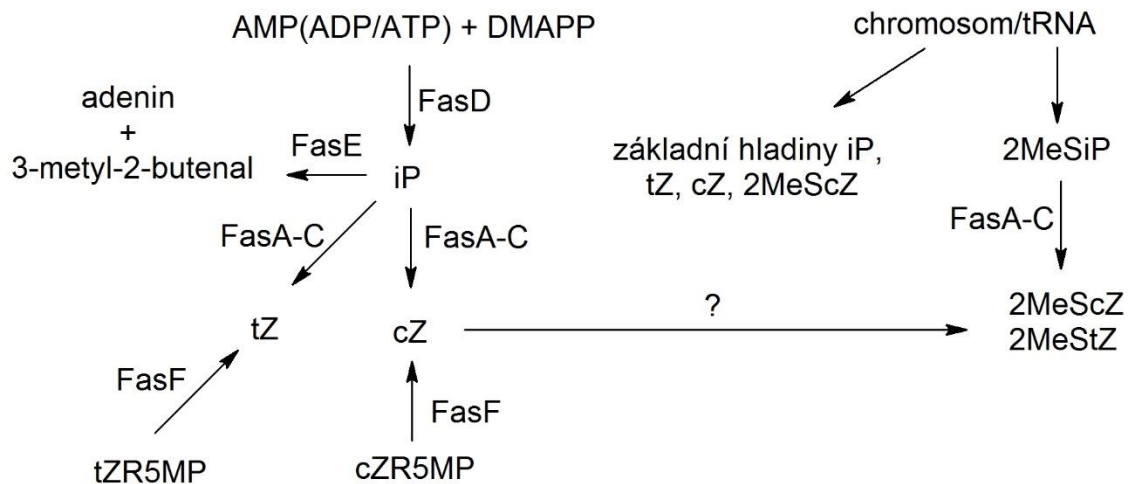
*Rhodococcus fascians* je zástupce rodu *Rhodococcus*, který je patogenní pro jednoděložné i dvouděložné rostliny. Bakterie tvoří nepohyblivé oranžově zbarvené kolonie různé délky a zakřivení. Napadení rostliny se vyznačuje tvorbou nádoru na listech („leafy galls“) a růstu výhonků v místě infekce, což je způsobeno zásahem do apikální dominance. Dalšími příznaky napadení je inhibice růstu kořene, zpomalení růstu nadzemní části rostliny, opad a deformace listů (Crespi *et al.*, 1992). U jednoděložných rostlin dochází k růstu nádorů podobajících se květu kvěťáku (Miller *et al.*, 1980).



Obr. 16 Nádor způsobený *Rhodococcus fascians* na listu krásnoočka (*Coreopsis*; Putnam a Miller, 2007).

*Rhodococcus fascians* napadá velké množství různých hostitelů, mezi které patří kromě okrasných rostlin i některé hospodářsky významné rostliny, například rostliny tabáku, a proto je zodpovědný za velké hospodářské škody, které každoročně způsobí (Depuydt *et al.*, 2008). Podobně jako *Agrobacterium* nezabíjí *Rhodococcus* svého hostitele, ale indukuje u něj proliferaci tkání. Bakterie může být usmrcena při léčbě pomocí antibiotik (Vereecke *et al.*, 2000).

Patogenita spočívá v přítomnosti lineárního plasmidu u kmene D188 (Francis *et al.*, 2012). První krok interakce je zatím neznámý, jelikož *Rhodococcus* patří mezi nepohyblivé půdní bakterie a není tedy známo, jak se dostane na hostitele. Jakmile se ale na něj dostane, tak není potřeba k infekci poranění rostliny. *Rhodococcus fascians* je dobře adaptovaný epifyt a vytváří na pokožce rostliny biofilm, aniž by se zahájila infekce (Cornelis *et al.*, 2001). Odpověď rostliny na tvoření biofilmu má za následek modifikaci jejího primárního metabolismu, což je signálem pro bakterii *Rhodococcus fascians* k zahájení patogenického životního cyklu. (Depuydt *et al.*, 2009a). Pod epifytními koloniemi dochází k penetraci bakterie do rostlinných tkání (Cornelis *et al.*, 2001). K posunu od epifytní fáze k endofytní je potřeba funkčního *att* operonu, který kóduje produkci autoregulačních signálů, které kontrolují expresi penetrace a dalších virulentních genů (Maes *et al.*, 2001; Stes *et al.*, 2013). Poté následuje exprese *fas* operonu a syntéza směsi 6 cytokininů (2-iP, *cis*Zeatin, *trans*Zeatin a jejich 2-methyl-thio-derivátů), které ovlivňují další vývoj rostliny (Pertry *et al.*, 2009, 2010). Sekrece cytokininů do rostlinných tkání vede k aktivaci signální kaskády, což má za následek aktivaci dormantních meristémů a znovuzahájení dělení buněk v cortexu. Poté dochází k růstu dělivých meristémů (Depuydt *et al.*, 2008, 2009a,b). Prostřednictvím svých cytokininů *Rhodococcus fascians* využívá napadenou rostlinu k syntéze auxinů a putrescinu, a to má za následek zesílení a podporu vývoje infekčních příznaků (Stes *et al.*, 2011, 2012).



Obr. 17 Model produkce směsi cytokininů prostřednictvím *Fas* operonu (převzato z Pertry *et al.*, 2010).

## 2.4.2 Využití bakterie *Rhodococcus fascians*

I když je *Rhodococcus fascians* brán jako patogenní bakterie, tak některé jeho geneticky upravené kmeny mohou sloužit pro komerční využití. Příkladem je použití nepatogenního kmene pro pěstování rostlin, kdy dojde k inokulování semínek, což má za následek, že rostlina pro svůj růst spotřebuje poloviční množství sloučenin dusíku z půdy při zachování stejného výnosu. Dále zvýšená produkce cytokininu vede ke zvětšení listů, zvýšení aktivity u fotosyntetických aparátů, oddálení senescence a nárůst v produkci biomasy (Carrillo *et al.*, 2010). Své využití má i v dalších odvětvích průmyslu. Další možné použití *Rhodococcus fascians*, o kterém se uvažuje, je regenerace a podpora růstu kořenů či listů u napadené rostliny nebo použití pro vylepšení transferového procesu u *Agrobacterium tumefaciens* (Tarkowski a Vereecke, 2014).



## 2.5 Metody studia cytokininů

Cytokininy a obecně fytohormony hrají důležitou roli ve vývoji a růstu rostliny a některé i při interakcích patogenních bakterií s rostlinami. Pro porozumění jejich funkcí, biosyntézy či regulačních drah na vnitřní nebo vnější signály je nutné mít metody kvalitativní a kvantitativní analýzy (Liu *et al.*, 2010).

Rostlinná pletiva, bakteriální buňky nebo kolonie tvoří komplikovanou směs nejrůznějších nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek. Fytohormony se vyskytují v této směsi ve velmi nízkých koncentracích, často v řádech pikomolů nebo femtomolů na jeden gram čerstvé hmoty (Novák *et al.*, 2003). Kromě těchto látek se ale ve směsi vyskytují i sloučeniny, které mají podobné chemicko-fyzikální vlastnosti nebo strukturu, což znesnadňuje celkovou analýzu (Tarkowski, 2011).

Cytokininy mají různorodou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti. Právě těchto vlastností můžeme využít při jejich studiu a vývoji analytických metod. Cytokininy se vyskytují v různých formách, ať už jako nukleotidy, nukleosidy, volné báze či jako glukosilované molekuly. Nukleotidy jsou polární sloučeniny, nukleosidy a volné báze jsou hydrofobní molekuly. Deriváty 2MeS-derivátů představují velmi hydrofobní skupinu látek. Díky dvojné vazbě na postranním řetězci adeninového kruhu se cytokininy nacházejí i ve formě *trans* a *cis* izomerů. Tyto izomery je nutné při analýze od sebe oddělit, protože každý z nich má odlišnou biologickou aktivitu (Galuszka *et al.*, 2008). Příprava vzorku je klíčovým krokem při analýze fytohormonů. Postupy používané při extrakci a purifikaci cytokininů patří mezi kritické části celého analytického procesu (Tarkowski *et al.*, 2009).

### 2.5.1 Extrakce

Biologický materiál by měl být ihned po odebrání vhodně zpracován a hluboce zamražen, aby nedocházelo k jeho degradaci a snížení obsahu analytů. K homogenizaci materiálu se nejčastěji využívá rozdrčení v třecí misce za použití tekutého dusíku (Tarkowski *et al.*, 2009). Po homogenizaci následuje převedení analytu z biologické matrice do roztoku pomocí extrakčního činidla. Jako nejběžnější extrakční činidla se používají methanol, ethanol či Bielského extrakční roztok a jeho modifikace, která neobsahuje chloroform (Bielski, 1964; Hoyerová *et al.*, 2006). Při extrakci je také nutné

zabránit degradaci analytu, kterou mohou způsobit přítomné enzymy a nevhodné světelné nebo teplotní podmínky (Tarkowski, 2004).

### **2.5.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)**

Extrakce na pevné vrstvě neboli solid-phase extraction (SPE) je jedna z dostupných technik, která je široce využívána pro purifikaci, extrakci a izolaci mnoha sloučenin. Hlavní výhodou této metody je vysoká návratnost při použití vhodného sorbentu a operačního protokolu i v případech, kde jiné tradiční extrakční techniky selžou (Tarkowski *et al.*, 2009). Pro prekoncentraci cytokininů se obvykle používá nepolární sorbent C18. Efektivnější, ale časově náročnější postup, je přečištění vzorku pomocí DEAE-celulosity nebo DEAE-Sephacel kolon a následném použití C18 kolony (Tucker a Roberts, 2000).

Rychlé a účinné separace cytokininů bylo také dosaženo pomocí SPE kolony obsahující směsný sorbent s vlastnostmi reverzní fáze a iontoměniče (Dobrev a Kamínek, 2002). Po použití C18 kolony jako prekoncentračního nástroje může následovat přečištění vzorku pomocí SPE se sorbentem s vlastnostmi katexu (MCX). Při této aplikaci MCX sorbentu se podařilo odstranit v porovnání s DEAE-Sephadex nebo C18 SPE kontaminanty absorbujícími při UV světle, což ve výsledku vede k větší návratnosti metody (Hoyerová *et al.*, 2006)

Pro další separaci cytokininových nukleotidů od bází a cukerných konjugátů se využívá sorbentů s vlastnostmi anexu jako dalšího kroku při SPE (Takei *et al.*, 2003). Mezi další možnosti prekoncentrace a purifikace nukleotidů je použití dvoukrokové metody s využitím Oasis HLB a MAX kolon (Ge *et al.*, 2006).

### 2.5.3 PMME

Polymerní mikroextrakce monolitem (PMME = polymer monolite microextraction) je druh mikroextrakce na pevné fázi (SPME = solid phase microextraction). SPME je prakticky miniaturizovaná SPE poskytující vysokou citlivost, jednoduchost a možnost snadné automatizace při použití malého objemu rozpouštědel a vzorku (Xu *et al.*, 2010). V poslední době si získaly velkou pozornost sorbenty založené na bázi polymeru. Díky různému složení těchto polymerních sorbentů a jejich fyzikálně-chemických vlastností se nabízí široký okruh využití (Švec, 2010).

Materiály, které se používají pro výrobu sorbentů, lze rozdělit do dvou skupin – sorbenty založené na bázi organických polymerů (organic polymer based) nebo na bázi oxidu křemičitého (silica based; Xu *et al.*, 2010). Výhodou organických sorbentů je jejich polymerace v jednom kroku, přizpůsobitelnost k prostoru a možnost připojení vlastních funkčních skupin pro specifické potřeby (Buchmeiser, 2007). Organické polymerní monolity jsou obecně vysoce biokompatibilní a stabilní při různém pH, což dovoluje jejich použití pro biologické vzorky. Nicméně při použití, kdy dochází ke kontaktu s některými organickými rozpouštědly, může docházet k deformacím struktury monolitu nebo jeho rozpouštění, což vede ke snížení mechanické stability (Xu *et al.*, 2010).

Tab. 4 Přehled monolitických polymerních materiálů využívaných pro mikroextrakci na pevné fázi (převzato z Xu *et al.*, 2010).

MAA – kyselina methakrylová, EDMA – etylen-dimethakrylát, GMA – glycidylmethakrylát, AA – akrylamid, 4-VP – 4-vinilpyridin, Bis – N,N'-methylen-bis-akrylamid, LMA – laurylmethakrylát, VDA – 2-vinil-4,4-dimethyl-lakton, HEMA – 2-hydroxyethylmethakrylát, NIPAAm – N-isopropylakrylamid, MAOE – oktylmethakrylát, MASE – stearylester kyseliny methakrylové, BMA – butylmethakrylát

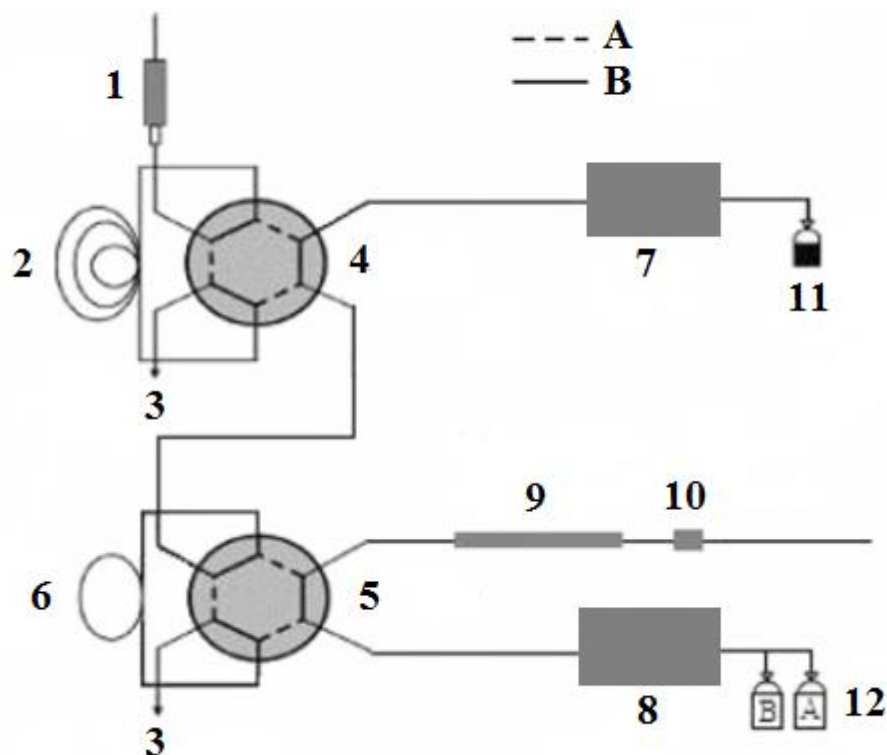
<b>Polymer</b>	<b>Funkční monomer</b>	<b>Crosslinker</b>
Poly(MAA-EDMA)	MAA	EDMA
Poly(GMA-EDMA)	GMA	EDMA
Poly(AA-VP-Bis)	AA/4-VP	Bis
Poly(LMA-EDMA)	LMA	EDMA
Poly(VDA-HEMA-EDMA)	VDA/HEMA	EDMA
Poly(HEMA-EDMA)	HEMA	EDMA
Poly(NIPAAm-EDMA)	NIPAAm	EDMA
Poly(MAOE-EDMA)	MAOE	EDMA
Poly(MASE-EDMA)	MASE	EDMA
Poly(BMA-EDMA)	BMA	EDMA
Poly(GMA-EDMA-BMA)	GMA/BMA	EDMA

Pro extrakci v bazickém prostředí se nejčastěji používá poly(methakrylová kyselina-ethylen dimethakrylát) zkráceně poly(MAA-EDMA), která obsahuje polární karboxylové skupiny a hydrofobní kostru. Dalším materiálem, který se často využívá, je poly(glycidyl methakrylát-ethylen dimethakrylát) označovaný jako poly(GMA-EDMA). Výhodou tohoto materiálu je přítomnost epoxidových skupin, které se dají snadno derivatizovat. Monolity založené na bázi oxidu křemičitého se používají méně. Jejich hlavní výhodou je snadná derivatizace a odolnost proti strukturním změnám při kontaktu s organickými rozpouštědly nebo při vystavení vysoké teplotě (Xu *et al.*, 2010).

Monolity se vyrábějí v mnoha formátech. Mezi nejpoužívanější patří tzv. „in-tube“ uspořádání v trubičce, které elegantně odstraňuje problémy s lámáním monolitů a řeší problém kapacity kapilár. Další uspořádání je „tip based“, které je využíváno hlavně při práci s proteiny a peptidy. Monolitický materiál je umístěn v pipetovací špičce, kde pomocí nasávání a vypouštění roztoku dochází k extrakci. Toto uspořádání je oproti tradiční SPME rychlé a levné. Mezi další uspořádání patří MEPS (microextraction in a packed syringe), kde je injekční stříkačka naplněna monolitem. Výhodou tohoto uspořádání je možnost regenerace sorbentů, opakované použití a možnost spojení s HPLC nebo GC. Pro metody genového inženýrství se využívá uspořádání „lab on chip“ (Xu *et al.*, 2010).

SPME se dá snadno propojit s plynovou chromatografií nebo kapalinovou chromatografií v online či offline režimu (Xu *et al.*, 2010). Při použití v offline režimu se používá injekční stříkačka s kapilárou, která je napojena na stříkačku pomocí plastové spojky. Toto uspořádání se označuje PMME (polymer monolith microextraction = polymerní monolitická mikroextrakce). Díky průtoku různých druhů rozpouštědel přes kapiláru dochází k sorpci a desorpci analytu. Průtok rozpouštědel přes kapiláru zajišťuje automatické pumpe, na které se dá nastavit rychlost průtoku rozpouštědla. Možnost paralelní extrakce několika vzorků současně, použití malého množství rozpouštědel i vzorku a automatizací postupu dochází k výraznému zrychlení a zjednodušení celého procesu (Zhang *et al.*, 2007).

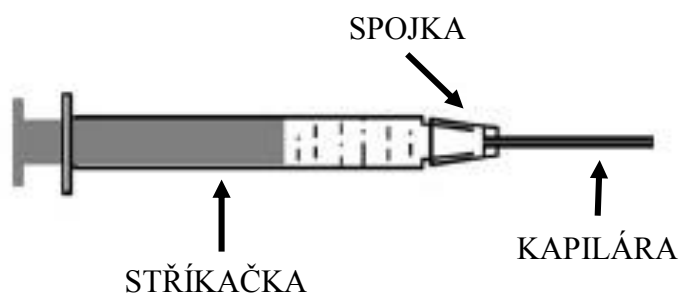
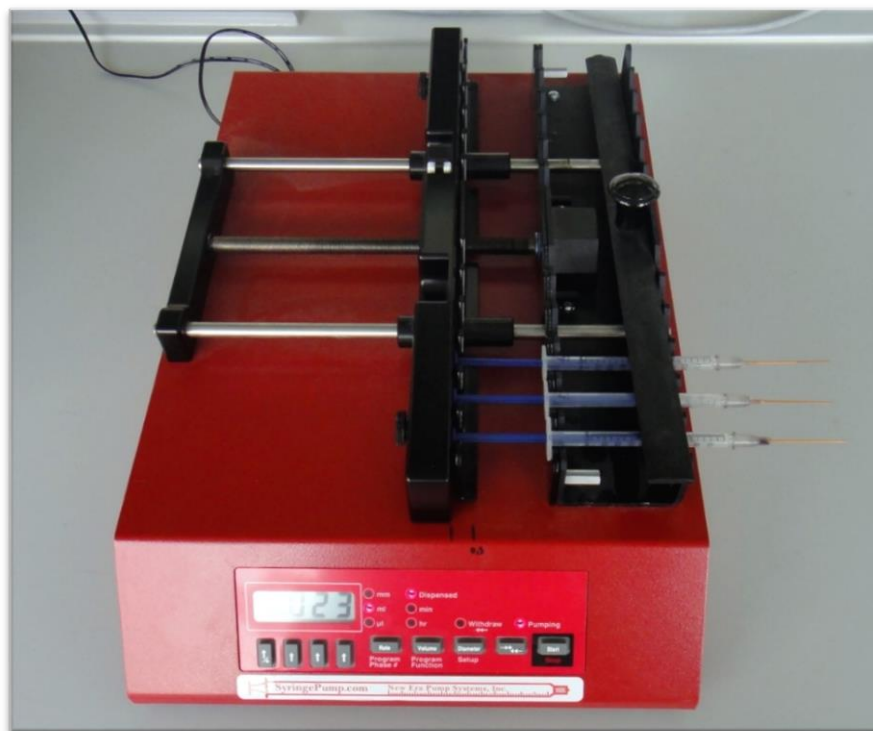
Online „in-tube“ propojení mikroextrakce s HPLC lze jednoduše docílit použitím dvou šesticestných ventilů a pump. Kolona obsahující monolit je zapojena jako smyčka pro nanesení vzorku na pumpu B (viz Obr. 18). Vysoké přesnosti metody bylo dosaženo přesným načasováním přepnutí pro kondicionaci extrakční kolony, nanesením vzorku, promytím kolony, elucí analytu a finální analýzou (Xu *et al.*, 2010).



Obr. 18 Online spojení PMME s HPLC (převzato z Xu *et al.*, 2010).

A – Nanesení (Injection); B – Plnění (Load); 1 – Syringe pumpa; 2 – Smyčka; 3 – Odpad;  
 4 – Ventil A; 5 – Ventil B; 6 – Kolona s monolitem; 7 – Pumpa A; 8 – Pumpa B; 9 – Separáčn $\acute{y}$  kolona; 10 – Detektor; 11 – Nosn $\acute{y}$  roztok; 12 – Mobiln $\acute{i}$  f $\acute{a}$ ze

Mikroextrakce „in-tube“ byla také úspěšně spojena online s pCES (pressure-assisted capillary electrochromatography) při použití kapiláry obsahující poly(MAA-EDMA) monolit, která byla zapojena na šestiportový ventil v CES systému. Další možností je spojení mikroextrakce „in-tube“ s kapilární elektroforézou. V tomto spojení nezáleží, zda je při extrakci použit proud nebo ne. Nanesení vzorku a promytí je docíleno pomocí tlaku nebo napětí, případně za použití obou současně. Bohužel v tomto in-line zapojení extrakce nedochází k dobrému rozdělení analytů kvůli problémům spojených s vhodností použití roztoků, které by byly vhodné pro extrakci a zároveň pro kapilární elektroforézu (Xu *et al.*, 2010).



Obr. 19 PMME pumpa a stříkačka s kapilárou.

Pro analýzu cytokininů „in-tube“ se používá kapilára obsahující kopolymer aminopropansulfonové kyseliny a ethylendimethaakrylátu - zkráceně označován jako poly(AMPS-co-EDMA). Tento monolit obsahuje kladně nabitě sulfonové skupiny a hydrofobní kostru, čímž dochází k extrakci cytokininů na bázi iontové výměny i hydrofobních interakcích (Liu *et al.*, 2010).

## 2.5.4 Metody koncové analýzy

Existuje mnoho metod pro koncovou analýzu cytokininů. Mezi tradiční techniky se řadí imunotesty a biotesty. Biotesty pro svou časovou náročnost a nízkou přesnost byly již před časem nahrazeny metodami imunochemickými nebo spojenými technikami. Mezi nejpoužívanější imunotesty, které se využívají pro stanovení cytokininů, patří RIA (radioimunoassay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nebo SPA (scintillation proximity assay; Tarkowski *et al.*, 2009). Hlavním principem těchto metod je použití vysoce specifických protilátek, které se váží na molekuly cytokininů. Mezi další techniky patří například kapilární elektroforéza s hmotnostní detekcí (CE-MS) nebo plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Plynová chromatografie poskytuje přesné výsledky s nízkým limitem detekce. Nevýhodou GC-MS je nutný derivatizační krok pro převedení cytokininů na těkavé deriváty, což s sebou přináší hydrolyzu derivátů a komplikaci celé analýzy (Tarkowski *et al.*, 2009). V dnešní době se nejčastěji využívá pro koncovou analýzu cytokininů vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS; Liu *et al.*, 2010).

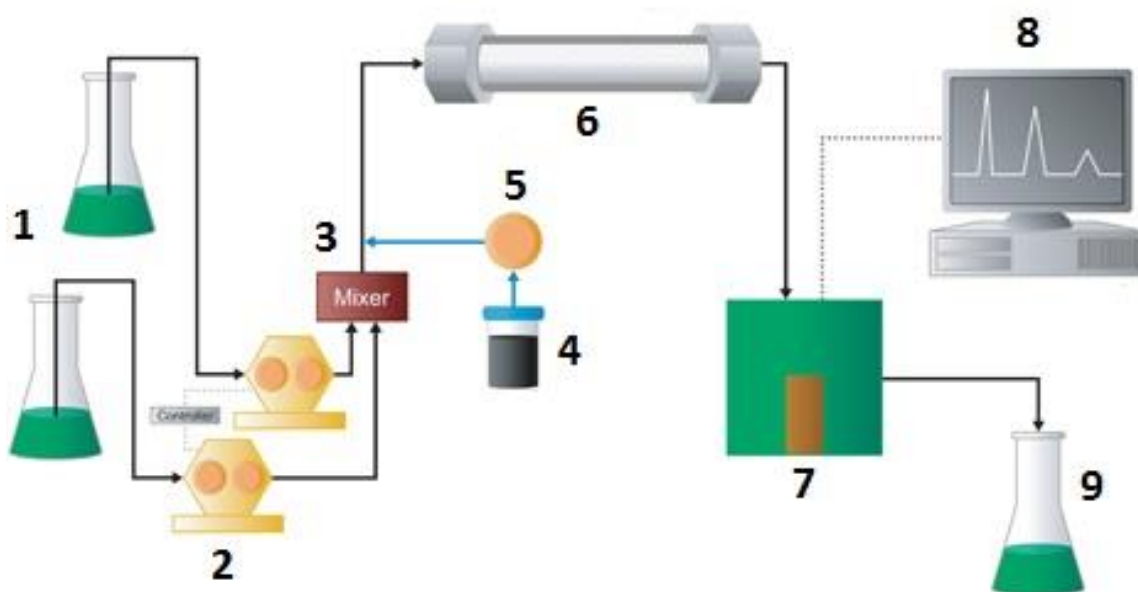
### 2.5.4.1 HPLC

HPLC (high performance liquid chromatography) patří mezi chromatografické techniky vhodné pro analýzu cytokininů. Mezi hlavní výhody patří rychlost analýzy, vysoké rozlišení a možnost spojení s různými typy detektorů, podle aktuální potřeby experimentátora (UV-VIS, MS, scintilační počítač apod.). LC-MS představuje spolehlivou metodu pro identifikaci cytokininů, metoda plně nahradila GC-MS, která dominovala kvalitativní analýze do konce 90. let minulého století (Tarkowski *et al.*, 2009).

Cytokinininy ve formě volných bází a jejich cukerné konjugáty jsou hydrofobní sloučeniny, které se chovají jako slabé zásady (Barták *et al.*, 2000). Této vlastnosti se využívá při jejich analýze na koloně s reverzní fází při kyselých podmínkách. Nicméně polárnější nukleotidy cytokininů nejsou dobře rozděleny na klasických RP-LC kolonách. Kvůli tomuto se převádí nukleotidy na ribosidy pomocí alkalické fosfatasy před samotnou RP-HPLC analýzou nebo jsou aplikována extrémní pH v kombinaci se speciálními RP-kolonami (Béres *et al.*, 2010).

Tradičně používanými kolonami pro HPLC analýzu klasických cytokininů jsou kolony typu RP-C18 nebo C8; popřípadě C4 pro deriváty 2MeS cytokininů. Kvůli tomu, že jsou cytokininy slabé báze, tak se využívají jako mobilní fáze slabě okyselené roztoky a organická rozpouštědla (Tarkowski *et al.*, 2009).

Cytokininy vykazují absorpenci při vlnových délkách 220 nm až 300 nm, proto se nejběžněji používá UV-VIS detektor. Daleko přesnější a citlivější detekce je možná při spojení s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). Hlavní výhodou použití LC-MS oproti GC-MS je přeskočení derivatizačního kroku, který může způsobit potíže - omezená stabilita či vytvoření vícenásobných produktů (Tarkowski *et al.*, 2009).



Obr. 20 Schéma HPLC systému (převzato z Waters.com – Identifying and Quantitating Compounds).

1 – Zásobníky s mobilní fází; 2 – Pumpy; 3 – Směšovač mobilní fáze; 4 – Vzorek, 5 – Dávkovací zařízení; 6 – HPLC kolona se stacionární fází; 7 – Detektor; 8 – Vyhodnocovací zařízení; 9 – Zásobník pro odpad



#### 2.5.4.2 UHPLC-MS

Chromatografická metoda UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography) je také označována jako UPLC (ultra performance liquid chromatography). Na rozdíl od HPLC se pracuje s částicemi stacionární fáze o velikosti 2  $\mu\text{m}$  a menšími. Z tohoto důvodu se razantně zvyšuje účinnost, rychlost separace, roste tudíž i citlivost metody. Zároveň je dosahováno daleko vyšších tlaků při separaci (až do 1000 bar), což vyžaduje speciální instrumentaci (odolné pumpy a dávkovací systém). Na straně detekce jsou v případě UHPLC-MS kladeny vyšší požadavky na skenovací rychlost hmotnostního detektoru kvůli vysoké rychlosti analýzy (šířka chromatografických píků v základně se pohybuje v řádu sekund). Spojení UHPLC s hmotnostním detektorem (UHPLC-MS) poskytuje účinný nástroj pro studium cytokininů (Tarkowski *et al.*, 2009; Tarkowski, 2011).

#### 2.5.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se nejčastěji při analýze cytokininů používá ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS), některých speciálních případech i kombinaci s kapilární elektroforézou (Ge *et al.* 2008; Béres *et al.*, 2012). Při LC-MS je nutné převedení analytu z mobilní fáze na ionty v plynném stavu. V dnešní době existuje mnoho technik ionizace, ale pro studium cytokininů se nejčastěji používá technika ionizace elektrosprejem (ESI), kdy dochází k zavedení mobilní fáze z chromatografické kolony do kapiláry v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. V iontovém zdroji dochází za pomoci inertního plynu (nejčastěji dusíku) ke sprejování mobilní fáze za zvýšené teploty. Na hrot kapiláry se vkládá vysoké napětí (v řádech kV). Díky zvýšené teplotě dochází k odpaření rozpouštědla z mobilní fáze a ionizovaný analyt poté postupuje do hmotnostního analyzátoru (Cole, 2010). Pro kvantitativní analýzu cytokininů se nejčastěji používá trojitý kvadrupólový analyzátor, a to z důvodu své vysoké citlivosti a selektivity. Tento analyzátor může pracovat při identifikaci analytu jak v režimu MS, tak i v režimu MS/MS. Při kvantifikaci cytokininů se nejčastěji využívá mod MRM (multiple reaction monitoring), kdy dochází ke sledování produktu rozpadu iontů. Tento režim poskytuje vysokou selektivitu detekce právě z důvodu sledování charakteristického produktového fragmentu pocházejícího z vybraného prekurzoru zkoumaného analytu. Právě kvůli nutnosti ionizovat analyt je potřeba

správně vybrat vhodné složení použité mobilní fáze. Mobilní fáze by se měla skládat pouze z těkavých složek, aby nedocházelo ke kontaminaci iontového zdroje. Pro separaci cytokininů se nejčastěji kvůli jejich hydrofobnosti používají slabě okyselená organická rozpouštědla (Tarkowski *et al.*, 2009; Tarkowski, 2011).

## 5 Diskuze

Pro analýzu šesti derivátů 2MeS cytokininů existuje pouze jediná metoda (Tarkowski *et al.*, 2010), která je bohužel časově náročná (56 minut pro rozdělení všech šesti látek) a nedovoluje analýzu více vzorků v krátkém časovém úseku. Separace je realizována za použití kolony Jupiter C4 (Phenomenex). Naším cílem bylo vyvinout novou metodu separace, která by byla daleko rychlejší. Dokonalá separace všech analytů je potřebná proto, aby byly přesně kvantifikovány jednotlivé hormony (v našem případě 4 izomery), které se výrazně liší svojí biologickou aktivitou (Novák *et al.*, 2003). Vývoj metody probíhal v systému reverzních fází za použití HPLC a UHPLC. Pro HPLC analýzu byla testována kolona Aeris C4 (Phenomenex), jejíž sorbent představuje novou generaci původního materiálu Jupiter C4. Na této koloně se podařilo od sebe odseparovat druhý a třetí pár obsahující 2MeScZR, 2MeStZR, 2MeSiP a 2MeSiPR. Bohužel oddělení prvního kritického páru obsahujícího volné báze 2MeScZ a 2MeStZ není uspokojivé (viz Tab. 23). Proto jsem přistoupil k vývoji UHPLC separace. V předešlé práci (Bartošková, 2012) byly testovány chromatografické kolony BEH 300 C4, CSH C18 (Waters) a Zorbax Bonus RP (Agilent). Žádná z nich neposkytovala uspokojivou separaci 2MeS-CK v kombinaci s mobilními fázemi kompatibilními s ionizací elektrosprejem. V této bakalářské práci byly testovány další tři chromatografické (UHPLC) kolony. Jak je patrné z výsledků shrnutých v Tab. 23, kolona Zorbax 300SB-C3 není vhodná kvůli koeluci cytokininových ribosidů. Kolona Hypesil Gold C4 se jeví jako vhodnější, i když separace volných bazí není úplná (rozlišení 0,985). Nejlepší separace bylo dosaženo na koloně PhenylHexyl CSH. Celkovou dobu analýzy šesti 2MeS derivátů cytokininů se zde podařilo zkrátit z 56 minut na 17 minut, což je téměř trojnásobné zlepšení oproti původní publikované HPLC metodě. Tato separace poskytuje uspokojivé rozlišení a je použitelná pro profilování těchto šesti 2MeS CK. Hodnota rozlišení pro první kritický pár je 1,267, pro druhý kritický pár je rozlišení 1,300 a pro poslední pár obsahující 2MeSiP a 2MeSiPR je hodnota rozlišení 1,733. V ideálním případě by mělo být dosaženo hodnoty rozlišení u každého páru minimálně 1,500 (Majer *et al.*, 1989). Získaná rozlišení by mohla být ještě vyšší v případě zapojení kapiláry z kolony přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. V našem případě mobilní fáze s analyty tekla ještě přes celou detektoru diodového pole, kde došlo k rozmytí analytů.

Tab. 23 Shrnutí výsledků testovaných chromatografických kolon.

Kolona	2MeS	Rt [min]	Rozlišení
Aeris Widepore 3,6u C4 150 x 2,10 mm; 3,6 µm	cZ	12,42	0,607
	tZ	12,80	
	cZR	14,86	1,034
	tZR	15,57	
	iPR	18,29	0,973
	iP	18,52	
Zorbax 300 SB-C3 100 x 2,10 mm; 1,8 µm	cZ	14,72	1,047
	tZ	15,49	
	cZR	25,04	0
	tZR	25,04	
Hypersil Gold C4 150 x 2,10 mm; 1,9 µm	cZ	11,05	0,985
	tZ	11,48	
	cZR	15,24	2,641
	tZR	15,35	
PhenylHexyl CSH 50 x 2,10 mm; 1,7 µm	cZ	9,28	1,267
	tZ	9,85	
	cZR	12,95	1,300
	tZR	13,60	
	iPR	14,49	1,733
	iP	14,62	

Pro SPE purifikaci 2MeS cytokininů z média *Rhodococcus fascians* D188 byly použity komerčně dostupné kolony Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA, USA) obsahující polymerní sorbent, který poskytuje silnou retenci pro analyt na základě vlastnosti sorbentu vázat analyt pomocí mechanismu vodíkových vazeb, hydrofobních interakcí a interakcemi mezi dvojnými vazbami.

Jako alternativa k extrakci na pevné fázi byla pro purifikaci 2MeS derivátů CK z média *Rhodococcus fascians* D188 použita metoda mikroextrakce (PMME – Polymer monolith microextraction) za použití kopolymerního monolitu 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny a ethylendimethakrylátu (AMPS-co-EDMA). Při této purifikaci se vycházelo z již publikovaných výsledků (Liu *et al.*, 2010). Extrakční kapiláry s AMPS-co-EDMA byly použity při PMME klasických cytokininů z rostlinného materiálu. Použitý polymer obsahuje hydrofobní kostru, na které jsou navázány sulfonové skupiny, což má za následek, že dochází k extrakci cytokininů jak mechanismem iontové výměny (katex), tak mechanismem nepolární interakce. Při optimalizaci PMME metody byla použita analýza HPLC-UV. Návratnosti pro všech šest analytů se pohybovaly od 82,5% do 89,1% (viz Tab. 21). Pro validaci PMME metody byla následně stanovena návratnost purifikace 2MeScZ z kultivačního média *Rhodococcus fascians* D188, která je v tomto případě 47,69 % (viz

Tab. 22). Získané výsledky ukazují, že návratnost při použití reálného vzorku z biologického materiálu je téměř o polovinu nižší. Tento jev je způsoben přítomností biologické matrice, především pak přítomností látek, které kompetují s analytem o vazbu k sorbentu extrakční kapiláry. Získané hodnoty korespondují s dříve publikovanými výsledky. Liu (2010) uvádí návratnost standardů 94,6-100 %; v reálném vzorku pak 59,1-77,1 %.

Optimalizací podmínek použitých pro PMME mikroextrakci 2MeS derivátů CK se podařilo získat téměř srovnatelné návratnosti pro analyt 2MeScZ (47,69 %) jako při použití klasické SPE purifikace (53,97 %). Tento rozdíl v návratnosti není statisticky významný. Navíc použití PMME metody s sebou přináší spoustu výhod, mezi které patří jednoduchost, použití malých objemů rozpouštědel, snadná automatizace, možnost opakovaného použití sorbentu a hlavně rychlost. V našem případě došlo k téměř desetinásobnému zrychlení celého purifikačního protokolu. Odpadá nutnost koncentrování vzorku ve vakuu (před vlastní finální analýzou).

Dalším krokem validace purifikační metody bylo stanovení množství 2MeScZ v médiu *Rhodococcus fascians* D188 za pomoci UHPLC-MS/MS analýzy. Pertry (2009) uvádí, že koncentrace tohoto derivátu je 4,25 nmol v jednom litru kultivačního média. V našem experimentu byl obsah 2MeScZ stanoven na 2,14 nmol.l<sup>-1</sup> (PMME) a 2,38 nmol.l<sup>-1</sup> (SPE). Tento rozdíl pravděpodobně odpovídá skutečnosti, že k našim experimentům byla použita nová kultura bakterie. Cílů práce bylo dosaženo. Nová purifikační metoda PMME je výrazně rychlejší než dříve publikovaná metoda SPE; kratší je rovněž chromatografická separace finální analýzy.

## 6 Závěr

Tato bakalářská práce je věnovaná purifikaci 2MeS cytokininů z bakterie *Rhodococcus fascians* D188 a vývojem rychlé LC-MS metody pro jejich koncovou analýzu.

Kromě klasické SPE purifikace byla pro extrakci 2MeS cytokininů z média *Rhodococcus fascians* D188 využita purifikační metoda PMME (polymer monolith microextraction). Sorbentem použitým při mikroextrakci byl kopolymerní monolit 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny a ethylendimethakrylátu (AMPS-co-EDMA). Původní metoda mikroextrakce klasických cytokininů (Liu *et al.*, 2010) byla modifikována pro purifikaci 2MeS cytokininů. Tato metoda poskytuje srovnatelnou návratnost jako klasická SPE a navíc přináší jednoduchost, rychlost a možnost automatizace.

Podářilo se vyvinout rychlou chromatografickou metodu UHPLC analýzy. Tato separace je trojnásobně rychlejší než původní publikovaná HPLC metoda (Tarkowski *et al.*, 2010).

Nakonec byla stanovena koncentrace 2MeScZ u kultivované bakterie *Rhodococcus fascians* D188. Výsledky korespondují s dříve publikovanými daty (Pertry *et al.*, 2009).

## 7 Literatura

- Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H., Sandberg G. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14778-14783.
- Bajguz A., Tretyn A. (2003): The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**, 1027-1046.
- Bajguz A., Hayat S. (2009): Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 1-8.
- Barták P., Pěchová D., Tarkowski P., Bednář P., Kotouček M., Stránský Z., Vespalec R. (2000): Determination of the first dissociation constant of 6-benzylaminopurine A comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* **421**, 221-229.
- Bartošková J. (2012): *Optimalizace metody analýzy bakteriálních cytokininů*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Béres T., Zatloukal M., Voller J., Niemann P., Gahsche M. C., Tarkowski P., Novák O., Hanuš J., Strnad M., Doležal K. (2010): Tandem mass spectrometry identification and LC-MS quantification of intact cytokinin nucleotides in K-562 human leukemia cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398**, 2071-2080.
- Béres T., Gemrotová M., Tarkowski P., Ganzera M., Maier V., Friedecký D., Dessoy M. A., Wessjohann L. A., Spíchal L., Strnad M., Doležal K. (2012): Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme in vitro reaction. *Analytica Chimica Acta* **751**, 176-181.
- Bielski R. L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues, *Analytical Biochemistry* **9**, 431-442.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Buchmeiser M. R. (2007): Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications. *Polymer* **48**, 2187-2198.
- Buck M., Ames B. N. (1984): A modified nucleotide in tRNA as a possible regulator of aembiosis: synthesis of cis-2-methyl-thioribosylzeatin in the tRNA of *Salmonella*. *Cell* **36**, 523-531.
- Carrillo R. R., Esqueda C. M. H., Báez G. A. D., Reyes L. G., Royo M. M. H., Ibane G. J. L. (2010): Inoculation and nitrogen fertilization for forage production in annual ryegrass, oats and wheat. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias* **1**, 131-143.
- Cole R. B. (2010): *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications*, Second edition. WILEY – John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, Kanada, 846 stran.
- Cornelis K., Ritsema T., Nijse J., Holsters M., Goethals K., Jaziri M. (2001): The plant pathogen *Rhodococcus fascians* colonizes the exterior and interior of the aerial parts of plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 599-608.
- Crespi M., Messens E., Caplan A. B., Van Montagu M., Desomer J. (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *European Molecular Biology Organization Journal* **11**, 795-804.
- Depuydt S., Doležal K., Van Lijsebettens M., Moritz T., Holsters M., Vereecke D. (2008): Modulation of the hormone setting by *Rhodococcus fascians* results in ectopic KNOX activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 1267-1281.
- Depuydt S., Trenkamp S., Fernie A. R., Elftieh S., Renou J-P, Vuylsteke M., Holsters M., Vereecke D. (2009a) An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians*. *Plant Physiology* **149**, 1366-1386.
- Depuydt S., De Veylder L., Holsters M., Vereecke D. (2009b) Eternal youth, the fate of developing *Arabidopsis* leaves upon *Rhodococcus fascians* infection. *Plant Physiology* **149**, 1387-1398.

- Devoto A., Ellis C., Magusin A., Chang H. S., Chilcott C., Zhu T., Turner J. G. (2005): Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**, 497-513.
- Dobrev P. I., Kamínek M. (2002): Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**, 21-29.
- Emery R. J. N., Ma Q. F., Atkins C. A. (2000): The Forms and Sources of cytokinins in Developing White Lupine Seeds and Fruits. *Plant Physiology* **123**, 1593-1604.
- Francis I., De Keyser A., De Backer P., Simón-Mateo C., Kalkus J., Pertry I., Ardiles-Diaz W., De Rycke R., Vandeputte O. M., Holsters M. M., El Jaziri M., Vereecke D. (2012): pFiD188, the linear virulence plasmid of *Rhodococcus fascians* strain D188. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 637-647.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- 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. *Studies in Natural Products Chemistry*, **34**, 203-264., Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko.
- Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S. (2006): Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **1133**, 322-331.
- Ge L., Tan S. N., Yong J. W. H., Hua L., Ong E. S. (2008): Separation of cytokinin isomers with a partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry approach. *Electrophoresis* **29**, 2024-2032.
- Gefter M. L. (1969): The in vitro synthesis of 2'-omethylguanosine and 2-methylthio 6N ( $\gamma,\gamma$ , dimethylallyl) adenosine intranuclear transfer RNA of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **36**, 435-441.
- Harberd N. P., King K. E., Carol P., Cowling R. J., Peng J., Richards D. E. (1998): Gibberellin: Inhibitor of an inhibitor of ...? *BioEssays* **20**, 1001-1008.
- Hetherington A. M., Quatrano R. S. (1991): Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist* **119**, 9-32.
- Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004): N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **46**, 47822-47832.
- 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.
- Hwang I., Sakakibara H. (2006): Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiologia Plantarum* **126**, 528-538.
- Iino M. (2001): Chapter 23 *Phototropism in higher plants*. In: Photomovement, volume 1 (Häder Donat-P., Breure A. M. eds.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemí, 659-811.
- 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 and Cell Physiology* **40**, 733-742.
- Jones B., Andersson Gunneras S., Petersson S. V., Tarkowski P., Graham N., May S., Doležal K., Sandberg G., Ljung K. (2010): Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *The Plant Cell* **22**, 2956-2969.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**: 233-239.
- Kieber J. J., Schaller G. E. (2010): The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant Physiology* **154**, 487-492.



- Krall L., Raschke M., Zenk M. H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters* **517**, 315-318.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Suqimoto K., Sakakibara H. (2009): Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Lange B. M., Rujan T., Martin W., Croteau R. (2000): Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13172-13177.
- Laule O., Furlholz A., Chang H. S., Zhu T., Wang X., Heifetz P. B., Gruißem W., Lange M. (2003): Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6866-6871.
- Lin Z., Zhong S., Grierson D. (2009): Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3311-3336.
- Liu Z., Wei F., Feng Y.-Q. (2010): Determination of cytokinins in plant samples by polymer monolith microextraction coupled with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **2**, 1676-1685.
- Maes T., Vereecke D., Ritsema T., Cornelis K., Thu H. N., Van Montagu M., Holsters M., Goethals K. (2001): The *att* locus of *Rhodococcus fascians* strain D188 is essential for full virulence on tobacco through the production of an autoregulatory compound. *Molecular Microbiology* **42**, 13-28.
- Majer J., Jokl V., Schiller P., Svobodová D., Karlíček R., Kettman V., Pavelčík F., Kotrlý S., Týfa J. (1989): *Analytická chemia – učebnice pro farmaceutické fakulty*. Osveta, Martin, Slovensko, 365 stran.
- Mathevon C., Pierrel F., Oddou J. L., Garcia-Serres R., Blondin G., Latour J. M., Ménage S., Gambarelli S., Fontecave M., Atta M. (2007): tRNA-modifying MiaE protein from *Salmonella typhimurium* is a nonheme diiron monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13295-13300.
- McLeod, M. P., Warren R. L., Hsiao W. W., Araki N., Myhre M., Fernandes C., Miyazawa D., Wong W., Lillquist A. L., Wang D., Dosanjh M., Hara H., Petrescu A., Morin R. D., Yang G., Stott J. M., Schein J. E., Shin H., Smailus D., Siddiqui A. S., Marra M. A., Jones S. J., Holt R., Brinkman F. S., Miyauchi K., Fukuda M., Davies J. E., Mohn W. W., Eltis L. D. (2006): The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15582-15587.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392.
- Miller H. J., Janse J. D., Kamerman W., Miller P. J. (1980): Recent observations on leafy gall in Liliaceae and some other families. *Netherland Journal of Plant Pathology* **86**, 55-68.
- Mok M. C., Martin R. C., Mok D. W. S. (2000): Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **36**, 102-107.
- Mok M. C., Martin R. C., Dobrev P. I., Vaňková R., Ho P. S., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D. W. S. (2005): Topolins and hydroxylated are substrates of cytokinin thidiazuron derivatives O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Journal of Plant Physiology* **137**, 1057-1066.
- Nambara E. (2013): Plant hormones In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition (Brenner S., Miller J. H., eds.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 346-348.

- Ncbi.nlm.nih.gov – Taxonomy browser:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=2&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (24. 3. 2014)
- Novák O., Tarkowski P., Tarkovská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480**, 207-218.
- Pernisová M., Klíma P., Horák J., Válková M., Malbeck J., Souček P., Reichmann P., Hoyerová K., Dubová J., Friml J., Zažímalová E., Hejátko J. (2009): Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis via regulation in plants of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3609-3614.
- Pernisová M., Kunderová A., Hejátko J. (2011): Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development: Metabolism, Signalling, Transport and Gene Expression. *Current Protein and Peptide Sciences* **12**, 137-147.
- Pertry I., Václavíková K., Depuydt S., Galuszka P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmölling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C. E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009): Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 929-934.
- Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuszka P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmölling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vereecke D. (2010): *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic Fas-mediated production of a cytokinin mix. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1164-1174.
- Putnam M. L., Miller M. L. (2007): *Rhodococcus fascians* in Herbaceous Perennials. *Plant Disease* **91**, 1064-1076.
- Ruyter-Spira C., Al-Babili S., Van der Krol S., Bouwmeester H. (2013): The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science* **18**, 72-83.
- Růžička K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T., Friml J., Benková E. (2007): Ethylen regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* **19**, 2197-2212.
- Růžička K., Simasková M., Duclercq J., Petrášek J., Zažímalová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M. C. E., Benková E. (2009): Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4284-4289.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9972-9977.
- Stes E., Biondi S., Holsters M., Vereecke D. (2011): Bacterial and plant signal integration via D3-type cyclins enhances symptom development in the *Arabidopsis*–*Rhodococcus fascians* interaction. *Plant Physiology* **156**, 712-725.
- Stes E., Prinsen E., Holsters M., Vereecke D. (2012): Plant-derived auxin plays an accessory role in symptom development upon *Rhodococcus fascians* infection. *The Plant Journal* **70**, 513-527.
- Stes E., Francis I., Pertry I., Dolzblasz A., Depuydt S., Vereecke D. (2013): The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*. *FEMS Microbiology Letters* **342**, 187-194.
- Stírk W. A., Bálint P., Tarkovská D., Novák O., Strnad M., Ördöga V., Van Staden J. (2013): Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 348-353.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Strohm A., Baldwin K., Masson P. H. (2013): Gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition (Brenner S., Miller J. H., eds.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 358-361.

- Švec F. (2010): Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *Journal of Chromatography A* **1217**, 902-924.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*, 5th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 782 stran.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2003): A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *Journal of Plant Research* **116**, 265-269.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytical methods in cytokinin research. *Chemické Listy* **98**, 834-841.
- Tarkowski P., Ge L. Y., Young J. W. H., Tan S. N. (2009): Analytical methods for cytokinins. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 323-335.
- Tarkowski P., Václavíková K., Novák O., Pertry I., Hanuš J., Whenham R., Vereecke D., Šebela M., Strnad M. (2010): Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **680**, 86-91.
- Tarkowski P. (2011): *Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace*. Habilitační práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Tarkowski P., Vereecke D. (2014): Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* **32**, 215-229.
- Treadway, S. L., Yanagimachi K. S., Lanckenau E., Lessard P. A., Stephanopoulos G., Sinskey A. J. (1999): Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24". *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 786-793.
- Tromas A., Perrot-Rechenmann C. (2010): Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 297-306.
- Tucker G. A., Roberts J. A. (2000): *Plant hormone protocols*, Humana Press Inc., USA.
- Vereecke D., Burssens S., Simón-Mateo C., Inzé D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M. (2000): The *Rhodococcus fascians* - plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* **210**, 241-51.
- Waters.com – Identifying and Quantitating Compounds: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064](http://www.waters.com/waters/en_US/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064) (21. 3. 2014)
- Xie X., Yoneyama K. (2010): The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 93-117.
- Xu L., Shi Z.-G., Feng Y.-Q. (2010): Porous monoliths: sorbents for miniaturized extraction in biological analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 3345-3357.
- Zhang H.-J., Huang J.-F., Lin B., Feng Y.-Q. (2007): Polymer monolith microextraction with in situ derivatization and its application to high-performance liquid chromatography determination of hexanal and heptanal in plasma. *Journal of Chromatography A* **1160**, 114-119.
- Zhao H., Yang H. (2008): Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Horticulturae* **116**, 442-447.

## 8 Seznam použitých symbolů a zkratek

**2MeS CK** 2-methylthio cytokininy  
**2MeScZ** 2-methylthio-*cis*-zeatin  
**2MeScZR** 2-methylthio-*cis*-zeatin ribosid  
**2MeStZ** 2-methylthio-*trans*-zeatin  
**2MeStZR** 2-methylthio-*trans*-zeatin ribosid  
**2MeSiP** 2-methylthio-isopentenyladenin  
**2MeSiPR** 2-methylthio-isopentenyladenin ribosid  
**4-Cl-IAA** 4-chlor-indolyl-3-octová kyselina  
**4VP** 4-vinilpyridin  
**A37** adenosin na pozici 37 v tRNA  
**AA** akrylamid  
**ABA** kyselina abscisová  
**ADP** adenosindifosfát  
**AMPS-co-EDMA** kopolymer 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny  
**AMP** adenosinmonofosfát  
**ATP** adenosintrifosfát  
***att*** lokus na pFiD188  
**BA** benzyladenin  
 **$\beta$ -GLU**  $\beta$ -glukosidasa  
**Bis** N,N'-metylen-bis-akryamid  
**BMA** butylmethakrylát  
**C3** reverzní stacionární fáze  
**C4** reverzní stacionární fáze  
**C18** reverzní stacionární fáze  
**CE** kapilární elektroforéza  
**CK** cytokinin  
**CKX** cytokinindehydrogenasa  
**CYP 450** cytochrom P450 monoxygenasa  
***cZ*** *cis*-zeatin  
***cZR*** *cis*-zeatin ribosid  
**DHZ** dihydrozeatin  
**DMAPP** dimethylallyl difosfát  
**DXP** 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát  
**EDMA** ethylen-dimethakrylát  
**ESI** ionizace elektrospřejem  
**ELISA** imunotesty založené na enzymech  
***Fas*** lokus na pFiD188  
**GA1** giberelin A1  
**GC** plynová chromatografie  
**GMA** glycidylmethakrylát  
**HEMA** 2-hydroxyethylmethakrylát  
**HMBPP** 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyldifosfát  
**HPLC-UV** vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí v UV oblasti  
**HPLC-MS** vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí  
**IAA** indolyl-3-octová kyselina  
**IBA** indolyl-3-máselná kyselina  
**iP** isopentenyladenin  
**IPP** isopentenylfosfát

**IPT** isopentenyltransferasa  
**LAS** synthasa kyseliny lupinové  
**LC** kapalinová chromatografie  
**LMA** laurylmethakrylát  
**LOG** cytokinin fosforibohydrolasa  
**MAA** kyselina methakrylová  
**MAOE** oktylmethakrylát  
**MASE** stearylester kyseliny methakrylové  
**mRNA** mediátorová nukleová kyselina  
**MS** hmotnostní spektrometrie  
**mT** *meta*-topolin  
**N-GT** cytokinin glukosyltransferasa  
**NIPAAm** N-isopropylakrylamid  
**oT** *ortho*-topolin  
**PCB** polychlorované bifenyly  
**PMME** mikroextrakce na pevné fázi s využitím monolitických polymerních sorbentů  
**PPi** difosfát  
**RIA** radioimunoanalýza  
**RP** reverzní fáze  
**SAM** S-adenosylmethionin  
**SPE** extrakce na pevné fázi  
**SPME** mikroextrakce na pevné fázi  
**tRNA** transferová ribonukleová kyselina  
**tZ** *trans*-zeatin  
**tZR** *trans*-zeatin ribosid  
**VDA** 2-vinil-4,4-dimethyl-lakton  
**Z** zeatin  
**ZI** zeatinisomerasa  
**ZOGT** zeatin-O-glukosidasa  
**ZR** zeatinreduktasa