

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium metabolismu cytokininů u sinic**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Helena Dobiášová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2011

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

V Olomouci dne .....

„Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti při tvorbě této práce.“

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Helena Dobiášová
Název práce	Studium metabolismu cytokininů u sinic
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	Cytokininy, plnící v rostlinách funkci hormonů, jsou syntetizovány také u cyanobakterií, které jsou považovány za pravděpodobné předchůdce chloroplastů. U <i>Nostoc</i> PCC 7120 byly objeveny geny kódující proteiny metabolismu cytokininů. U proteinu cytokinindehydrogenasy, jež degraduje cytokininy na adenin nebo N <sup>9</sup> -substituovaný adenin a aldehyd odvozený od postranního řetězce, nebyla dosud prokázána enzymová aktivita. Proto byla provedena studie, jejímž cílem bylo zjistit, zda a jak <i>Nostoc</i> metabolizuje cytokininy. Třemi značené cytokininy isopentenyladenin, isopentenyladenin ribosid a benzyladenin, které vstoupily z média do buněk, byly zcela metabolizovány. Vzniklé sloučeniny byly po přečištění extrakcí na pevné fázi separovány HPLC/UV metodou a radioaktivita v jednotlivých frakcích byla měřena scintilačním detektorem. Největší část radioaktivity byla nalezena ve směsi dvou metabolitů, z nichž jeden byl pravděpodobně adenin. Druhý detekovaný metabolit nebyl identifikován. V navazující studii budou cytokininy separovány na vhodnější koloně a neznámé metabolity identifikovány hmotnostním spektrometrem.
Klíčová slova	Cytokininy, metabolismus cytokininů, <i>Nostoc</i> PCC 7120
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Helena Dobiášová
Title	The study of cytokinin metabolism in cyanobacteria
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators, Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	Cytokinins, functioning as plant hormones, are also synthesized in cyanobacteria, which are considered to be likely precursors of chloroplasts. The genes coding proteins of cytokinin metabolism were discovered in cyanobacteria <i>Nostoc</i> PCC 7120. Enzyme activity of a putative cytokinin dehydrogenase, the protein that degrades cytokinins to adenine or N <sup>9</sup> -substituted adenine and aldehyde derived from side chain, has still not been demonstrated. Therefore, a study aimed to determine, whether and how cytokinins are metabolized by <i>Nostoc</i> , was performed. Tritium-labeled cytokinins isopentenyladenine, isopentenyladenine riboside and benzyladenine, which were taken by cells from the media, were completely metabolized. The resulting compounds were, after purification by solid phase extraction, separated by HPLC/UV method and the radioactivity in resulting fractions was measured by scintillation detector. The largest portion of radioactivity was found in a mixture of two metabolites, one of which was probably adenine. The second detected metabolite was not identified. In the follow-up study cytokinins will be separated on an appropriate column and unknown metabolites will be identified by mass spectrometry.
Keywords	Cytokinins, cytokinin metabolism, <i>Nostoc</i> PCC 7120
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

Cíle práce .....	- 7 -
Teoretická část.....	- 8 -
1 Cyanobakterie.....	- 9 -
1.1 Obecné vlastnosti.....	- 9 -
2 Metabolismus fytohormonů u cyanobakterií .....	- 10 -
2.1 Cytokininy.....	- 11 -
2.1.1 Biosyntéza cytokininů .....	- 12 -
2.1.2 Degradace a deaktivace cytokininů .....	- 12 -
2.1.3 Analýza cytokininů u sinic.....	- 13 -
2.2 Auxiny .....	- 15 -
2.2.1 Biosyntéza a degradace auxinů.....	- 15 -
2.2.2 Analýza auxinů u sinic .....	- 16 -
2.3 Ostatní hormony.....	- 16 -
3 Endosymbiotický původ chloroplastů.....	- 17 -
3.1 Fotosyntetický aparát u sinic a vyšších rostlin .....	- 17 -
3.2 Endosymbiotický vznik plastidů .....	- 18 -
3.2.1 Transport genů do jádra a potenciální symbiont .....	- 20 -
3.2.2 Mechanismus importu proteinů do chloroplastu.....	- 21 -
3.3 Endosymbióza z pohledu současné symbiózy.....	- 23 -
Praktická část.....	- 25 -
4 Metody a materiál.....	- 26 -
4.1 Příprava biologického materiálu.....	- 26 -
4.2 Kultivace cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120.....	- 27 -
4.3 Úprava biologického materiálu.....	- 27 -
4.4 Přečištění vzorků extrakcí na pevné fázi (SPE) .....	- 27 -
4.5 Analýza metabolitů pomocí HPLC .....	- 28 -
5 Výsledky a diskuze.....	- 29 -

5.1	HPLC/UV analýza obsahu cytokininů v médiu před a po kultivaci.....	- 29 -
5.2	Radioaktivita u vzorků média a extraktů z buněk .....	- 30 -
5.3	HPLC/UV analýza metabolismu cytokininů v kultivačním médiu .....	- 33 -
5.4	HPLC/UV analýza metabolismu cytokininů v buňkách <i>Nostoc</i> .....	- 42 -
6	Závěr.....	- 47 -
7	Seznam použitých zkratk .....	- 48 -
8	Literatura:.....	- 49 -

## Cíle práce

### Teoretická část:

- Shrnout dosavadní poznatky o výskytu a metabolismu fytohormonů u cyanobakterií.
- Vypracovat přehled známých poznatků o cyanobakteriích jako pravděpodobných předcích chloroplastů rostlin.

### Praktická část:

- Přečištění cytokininových metabolitů z kultivačního média a buněk cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 extrakcí na pevné fázi.
- Separace metabolitů metodou HPLC/UV a analýza frakcí pomocí scintilačního detektoru.
- Určit zda a jakým způsobem *Nostoc* PCC 7120 metabolizuje cytokininy.

# **Teoretická část**



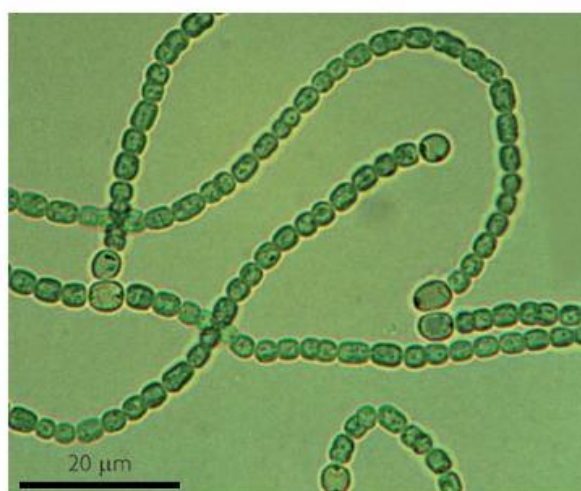
# 1 Cyanobakterie

## 1.1 Obecné vlastnosti

Kmen Cyanobakterie se tradičně dělí podle morfologického hlediska do pěti řádů: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* a *Stigonematales*. Z tohoto hlediska se uvažuje: způsob dělení, přítomnost heterocyt a tvar buňky a vláken (Knoll, 2008).

Jedná se o skupinu, která je morfologicky i ekologicky velmi rozmanitá, neboť se cyanobakterie nacházejí jak na poušti, tak i v polárních oblastech. Nejenže snášejí extrémní teploty a hodnoty pH, ale také vysoké koncentrace chloridu sodného (Kalina & Váňa, 2005).

Cyanobakterie (též sinice) se řadí mezi gramnegativní prokaryotické buňky měřící obvykle v průměru 0,5–1  $\mu\text{m}$ . Patří mezi oxidativně fotoautotrofní organismy schopné fixovat vzdušný dusík. Díky schopnosti fotosyntézy je jejich vývoj spojen se vznikem atmosféry obsahující kyslík. K fixaci dusíku je zapotřebí anaerobní prostředí, ve kterém je aktivní enzym nitrogenasa. Anaerobní prostředí zajišťují specializované buňky heterocyty. Vytvořené dusíkaté látky poskytují cyanobakterie v symbióze svému hostiteli. Právě symbióza, do níž většina sinic ochotně vstupuje, hrála ve vývoji fotoautotrofních organismů zásadní roli, neboť touto interakcí pravděpodobně vznikly chloroplasty (více v kapitole: Endosymbiotický původ chloroplastu) (Kalina & Váňa, 2005; Madigan et al., 2009).



Obrázek 1: *Nostoc* PCC 7120 (převzato z Flores & Herrero, 2010)

Cyanobakterie produkují biologicky aktivní sekundární metabolity – cyanotoxiny, které mohou způsobovat i smrtelné otravy. Toxické účinky se již mohou projevit při kontaktu s vodou obsahující cyanobakterie, případně jejím požitím. Při jejich přemnožení ve vodách bohatých na fosforečné a dusíkaté látky vzniká tzv. vodní květ. Tyto bakterie jsou schopné se udržet na povrchu hladiny, neboť obsahují aerotopy tvořené plynovými měchýřky nacházejícími se v cytoplasmě (Kalina & Váňa, 2005).

Cyanobakterie jsou využívány v biotechnologických procesech pro svůj vysoký obsah proteinů v sušině. Lyofilizovaná sušina se používá jako dietetický potravní doplněk, dále modrý fykocyanin může nahrazovat radionuklidy při sledování metabolických procesů (Kalina & Váňa, 2005).

Cyanobakterie, mimo schopnosti fixovat vzdušný dusík (Hussain & Hasnain, 2011), produkují rostlinné hormony a další biologicky aktivní látky jako jsou vitamíny, aminokyseliny, polypeptidy, polymery, antibakteriální a antifungální látky a exopolysacharidy, které mají kladný účinek na pěstování rýže, pšenice, kukuřice a bavlny. Někteří zástupci rodů *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* a *Anabaena* naopak produkují toxické mikrocystiny, kterými škodí rostlinám (Osman et al., 2010). Kromě jiného právě fytohormony podporují růst rostlin zvýšením koncentrace rostlinných endogenních cytokininů a auxinů, neboť cyanobakterie mimo jejich biosyntézy mají schopnost je uvolňovat v rhizosféře, odkud je rostlina absorbuje (Hussain & Hasnain, 2011). Biofertilizace cyanobakteriemi spolu s chemickými hnojivy zvyšuje klíčivost semen, růst kořenů i nadzemní části, metabolické procesy a snižuje vliv rizikových faktorů životního prostředí (Osman et al., 2010).

## 2 Metabolismus fytohormonů u cyanobakterií

Fytohormony se dělí do pěti základních skupin: cytokininy, auxiny, gibberelliny, kyselina abscisová a ethylen. Mimo ně můžeme dále uvést polyaminy, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselinu salicylovou a v poslední době objevené strigolaktony (Frébort et al., 2011). Fytohormony jsou důležité látky regulující fyziologické procesy v rostlinách, např. klíčení, růst, větvení, dormanci, senescenci, kvetení, zrání plodu, dále ovlivňují expresi genů, syntézu různých metabolitů a v neposlední řadě zvyšují odolnost vůči klimatickým činitelům, jak je shrnuto v recentní publikaci Tsavkelova et al. (2006).

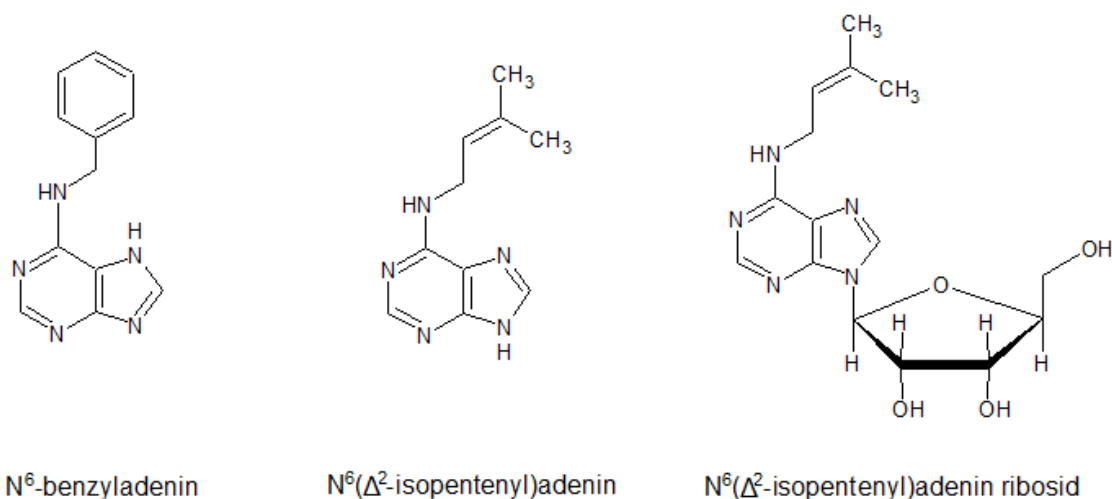
Na typu interakce mezi bakterií (pravděpodobně i cyanobakterií) a rostlinou závisí dostupnost cytokininů a dalších hormonů pro rostlinu. Bakterie lze rozdělit na

volně se vyskytující v oblasti kořene a žijící s rostlinou v symbiotickém vztahu (Stirk & van Staden, 2010). Látky produkované volně žijícími organismy ovlivňují rostlinu v menší míře, neboť uvolněné fytohormony mohou být na cestě ke kořenům metabolizovány jiným mikroorganismem (Bashan & Holguin, 1997).

## 2.1 Cytokininy

Cytokininy patří mezi sloučeniny odvozené od adeninu. Adenin je v poloze N<sup>6</sup> substituován isoprenoidním řetězcem nebo aromatickým jádrem (Obr. 2). Do skupiny isoprenoidních cytokininů lze zařadit N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) a dihydrozeatin (DHZ) (Sakakibara, 2006). K aromatickým cytokininům patří benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*) (Strnad, 1997), *ortho*-methoxytopolin (MeoT) nebo *meta*-methoxytopolin (MemT) (Tarkowská et al., 2003).

V organismech se cytokininy vyskytují v biologicky aktivní a neaktivní formě. Neaktivní formu reprezentují cytokininy modifikované na adeninu nebo postranním řetězci vazbou s molekulami sacharidů. Modifikace jsou nezbytné pro jemnou regulaci koncentrace aktivních cytokininů (Auer, 1997).



Obrázek 2: Struktura vybraných cytokininů

Cyanobakterie pravděpodobně obsahují minimální genetický aparát potřebný v metabolismu cytokininů a rostliny tyto geny patrně získaly laterálním přenosem při endosymbióze (Schmülling et al., 2003; Frébort et al., 2011). Do současné doby nebyla metabolismu cytokininů u cyanobakterií věnována přílišná pozornost.

### 2.1.1 Biosyntéza cytokininů

Biosyntéza cytokininů u bakterií probíhá jako v rostlinách *de novo* syntézou a degradací tRNA, přesto však existuje několik rozdíků.

Prvním krokem *de novo* syntézy u rostliny *Arabidopsis thaliana* je navázání dimethylallyldifosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP) do polohy N<sup>6</sup> na adenosin 5'-fosfát (AMP, ADP nebo ATP), který je katalyzován adenylátdimethylallyltransferasou (IPT, EC 2.5.1.27) (Sakakibara, 2006). U cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120<sup>1</sup> a *Anabaena variabilis* ATCC 29413 se nachází IPT, vysoce homologní k rostlinné IPT (Frébort et al., 2011). Měřením afinity IPT *A. thaliana* a *Agrobacterium tumefaciens* k akceptoru ATP/ADP a AMP se zjistilo, že rostlinná IPT upřednostňuje ATP/ADP, ovšem bakteriální má pro změnu vysokou afinitu k AMP. Ukázalo se, že geny příbuzné s geny kódující IPT u *A. tumefaciens* se nacházejí také v *Nostoc* (Kakimoto, 2003). U *A. thaliana* byly nalezeny dva geny CYP735A1 a CYP735A2 kódující cytochrom P450 monooxygenasu (EC 1.14.14.2), která katalyzuje hydroxylaci iP nukleotidů na tZ nukleotidy, jenž jsou dalšími kroky přeměněny na tZ (Takei et al., 2004).

Cytokiny také vznikají degradací tRNA. Byly zjištěny v hydrolyzátech tRNA nesoucí antikodón, který je komplementární ke kodónu začínající uracilem. V antikodónu se nachází prenylovaný adenosin (Sakakibara, 2006). Tímto způsobem se získává v rostlinách maximálně 40 % cytokininů (Kakimoto, 2003). Podstatně větší roli hraje degradace tRNA pravděpodobně u cyanobakterií a bakterií obecně. U *Acaryochloris marina* MBIC 11017, *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420, *Nodularia spumigena* CCY 9414 se předpokládá, že syntézu cytokininů katalyzuje pouze tRNA-dimethylallyltransferasa (tRNA-IPT, EC 2.5.1.75). Rovněž *Nostoc* PCC 7120 a *Anabaena variabilis* ATCC 29413 mají geny pro tRNA-IPT (Frébort et al., 2011). Miyawaki et al. (2006) experimentálně potvrdili u *A. thaliana*, že tRNA-IPT je významným zdrojem cZ. Mimo cZ se hydrolyzou tRNA nejspíš získává malé množství iP, který je poté převeden na tZ.

### 2.1.2 Degradace a deaktivace cytokininů

V rostlinách jsou cytokiny nevratně oxidačně degradovány reakcí katalyzovanou cytokinindehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.12) na adenin nebo N<sup>9</sup>-substituovaný adenin a aldehyd odvozený od postranního řetězce. U různých druhů vyšších rostlin je CKX kódována rodinou genů. Geny homologní k rostlinným genům byly rovněž nalezeny v cyanobakteriích *Nostoc* PCC 7120, *Anabaena variabilis*

<sup>1</sup> Někteří autoři používají také označení *Anabaena* PCC 7120.

ATCC 29413, *Acaryochloris marina* MBIC11017, *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420 a *Nodularia spumigena* CCY 9414 (Frébort et al., 2011). Porovnáním sekvencí hypotetických CKX proteinů výše uvedených cyanobakterií se ZmCKX1 (cytokinindehydrogenasa kukuřice) a AtCKX7 (cytokinindehydrogenasa *A. thaliana*) vyplývá, že jejich homologie k ZmCKX1 a AtCKX7 se pohybuje jen kolem 20 % (Smékalová, 2008). Ve struktuře proteinu CKX poblíž N-konce se nachází u většiny rostlin konzervovaná sekvence tří aminokyselin GHS. His105 (číslování vztaženo k sekvenci aminokyselin u proteinu ZmCKX1) je kovalentně vázán kofaktor FAD (flavinadenindinukleotid) přes 8-methylovou skupinu alloxazinového kruhu (Malito et al., 2004). U *Nostoc* PCC 7120 byl na stejném místě objeven motiv GYT a FAD pravděpodobně vytváří vazbu s tyrosinem. Dále u *Nostoc* v místě vázání substrátu není přítomná aminokyselina Asp169 (Frébort et al. 2011), jež se nachází ve vazebném místě substrátu a která vytváří vodíkovou vazbu s N<sup>6</sup> substrátem (cytokininem) a spolu s Glu288 vytváří pár, který usnadňuje oxidaci (Malito et al., 2004). Po sérii pokusů k prokázání enzymové aktivity hypotetické CKX u *Nostoc* PCC 7120 se jí ovšem nepodařilo zaznamenat. Není tedy jisté, zda protein kódovaný genem s homologií k rostlinné CKX nemá v mikroorganismu jinou funkci (Smékalová, 2010).

Cytokininy se kromě degradace CKX deaktivují i glykosylací. K *N*-glukosylaci irreverzibilně dochází na adeninu v pozici N<sup>9</sup>, N<sup>7</sup> a N<sup>3</sup>. Ke glykosylaci také přispívá *O*-glukosylace, která probíhá na hydroxylové skupině postranního řetězce zeatinu. V tomto případě se však jedná o vratný proces. Deglukosylaci katalyzuje enzym  $\beta$ -glukosidasa (EC 3.2.1.21), která nemá schopnost štípat *N*-glukosidy, mimo těch vázaných v N<sup>3</sup> pozici (Sakakibara, 2006).

Dalším způsobem deaktivace je fosforibosylace cytokininů, která je katalyzována adeninfosforibosyltransferasou (APRT; EC 2.4.2.7) (Sakakibara, 2006).

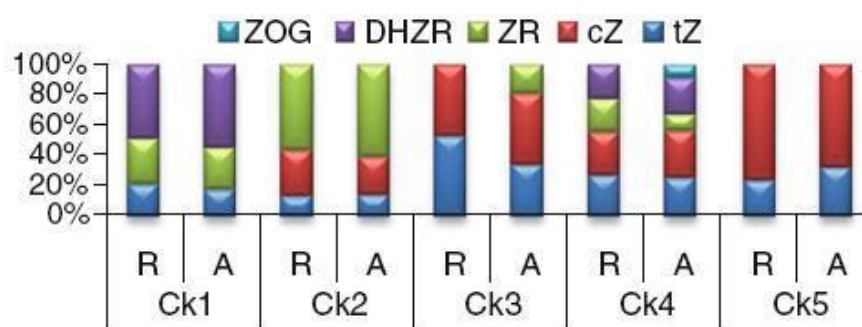
### 2.1.3 Analýza cytokininů u sinic

Stirk et al. (1999) za pomoci biotestů a chromatografických metod potvrdili přítomnost iP v cyanobakterii *Arthonema africanum* (řád *Oscillatoriales*).

O tři roky později Stirk et al. (2002) obdobným způsobem jako v předchozím případě detekovali cytokininy u *Calothrix* (řád *Nostocales*) a *Phormidium animale* (řád *Oscillatoriales*). Všechny druhy obsahovaly vysokou koncentraci zeatinů a jejich ribosid derivátů. Též byly detekovány iP a iPR (N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin ribosid).

HPLC-MS analýzou cytokininů u pěti druhů cyanobakterií *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Chroococcidiopsis* a *Synechosystis* bylo určeno pět cytokininů: tZ, cZ, ZR

(zeatin ribosid), ZOG (zeatin-O-glukosid) a DHZR (dihydrozeatin ribosid) (Obr. 3). Nejvyšší koncentrace cytokininů v buňce i v médiu se nacházela u *Chroococcidiopsis*. U *Oscillatoria* a *Phormidium* byly cytokinininy vylučovány do média minimálně. ZOG byl pozorován pouze v kultuře u *Chroococcidiopsis*. Poprvé byl u cyanobakterií, konkrétně u *Anabaena* a *Chroococcidiopsis* detekován DHZR. ZR nebyl zjištěn vůbec u *Synechosystis*, ale největší zastoupení z cytokininů měl u *Oscillatoria*. Naopak u tohoto druhu měl nejmenší podíl tZ, i u ostatních druhů s výjimkou *Phormidium* dosáhl pouze menšinového zastoupení. cZ nebyl detekován pouze u druhu *Anabaena* (Hussain et al., 2010).



Obrázek 3: Znázornění podílu jednotlivých cytokininů u druhů: Ck1 = *Anabaena*, Ck2 = *Oscillatoria*, Ck3 = *Phormidium*, Ck4 = *Chroococcidiopsis*, Ck5 = *Synechosystis*. Prováděl se rozbor endogenních cytokininů (A) a cytokininů uvolněných do kultivačního média (R) (Hussain et al., 2010).

Přidáním exogenního kinetinu ke kultuře *Anabaena doliolum* se zjistilo, že stimuluje tvorbu pigmentů, růst a fixaci molekulárního dusíku v heterocytech (Kapoor & Sharma, 1981).

Selivankina et al. (2006) jako první prokázali *in vitro* vliv exogenních BA a tZ na transkripční aktivitu RNA polymerasy u cyanobakterie *Synechocystis* PCC 6803. Cyanobakterie pravděpodobně obsahují faktory, které indukují cytokininovou aktivaci transkripce. Tyto faktory jsou zřejmě obdobou k chlCBP (chloroplastické proteiny vázající cytokinininy), které se nacházejí v rostlinných chloroplastech, kde aktivují RNA a DNA polymerasy (Kulaeva et al., 2000). Dalším experimentem zjistili, že chlCBP izolovaný z ječmene také aktivoval transkripci u sinic (Selivankina et al., 2006). Mimo jiné cyanobakterie také zřejmě vlastní receptory pro percepci cytokininových signálů, které jsou ovšem odlišné od receptorů, jenž se nalézají v rostlinách (Frébort et al. 2011).

Metabolismus cytokininů ovlivňují i jiné rostlinné hormony, proto v dalších podkapitolách budou stručně popsány auxiny a ostatní fytohormony.

## 2.2 Auxiny

Jedná se o skupiny různorodých látek, které se vyznačují převážně aromatickým systémem – naftalenem, fenylem nebo indolem (Bajguz & Piotrowska, 2009). Auxiny je možno rozdělit do dvou skupin: endogenní a syntetické. Za hlavní endogenní auxin se označuje kyselina indol-3-octová (IAA), dále se do této skupiny řadí kyseliny 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA), indol-3-máselná (IBA) a fenyl-octová (PAA). Pod pojmem syntetické auxiny se rozumí heterogenní syntetické látky působící jako auxiny (Simon & Petrášek, 2011).

Obdobně jako u cytokininů se i auxiny vyskytují ve formě konjugátů a rovněž tímto způsobem usměrňují koncentraci biologicky aktivních auxinů (Bajguz & Piotrowska, 2009).

### 2.2.1 Biosyntéza a degradace auxinů

U cyanobakterií se auxiny syntetizují několika způsoby. Tři cesty závisejí na přítomnosti tryptofanu a pouze jedna nepotřebuje k syntéze IAA tryptofan (Tsavkelova et al., 2006).

U *Nostoc* PCC 73102, *Nostoc* 268, *Nostoc* PCC 9229 a *Nostoc azollae* se syntetizují auxiny cestou, kde nejprve dochází k deaminaci tryptofanu na indol-3-pyruvát, který je poté katalyticky dekarboxylován na indol-3-acetaldehyd. Posledním krokem je oxidace na IAA (Sergeeva et al., 2002). U *Chlorogloea fritschii* (řád *Stigonematales*) (Tsavkelova et al., 2006) začíná syntéza dekarboxylací tryptofanu na tryptamin, jenž je posléze převeden na indol-3-acetaldehyd, a nakonec opět oxidován na IAA (Spaepen et al., 2007). Poslední typ syntézy závislý na tryptofanu byl v případě cyanobakterií identifikován u *Synechocystis* PCC 6803 a *Synechococcus* WH8102 (Sergeeva et al., 2002). Tryptofan zde dvěma různými reakcemi přechází na indol-3-acetonitril, který je hydrolyzován na IAA. U cyanobakterií se syntetizuje IAA také nezávisle na tryptofanu. V mechanismu této cesty je stále mnoho nezodpovězených otázek. Ví se ale, že jako prekurzor IAA slouží indol nebo indol-3-glycerolfosfát (Spaepen et al., 2007).

Bakterie mohou auxiny také degradovat, buď přeměnou na neaktivní formu nebo mineralizací, jíž získávají uhlík nebo dusík. Zatím nebyly objeveny všechny geny kódující enzymy zapojené do odbourání (Leveau & Gerards, 2008).

### 2.2.2 Analýza auxinů u sinic

Stirk et al. (2002) také provedli analýzu auxinů. U druhů *Calothrix* a *Phormidium animale* fazolovým biotestem detekovali pouze velmi malou aktivitu auxinů.

Ve stejném roce Sergeeva et al. (2002) analyzovali přítomnost auxinů u 34 cyanobakterií (16 volně žijících a 18 symbiotických). Pomocí Salkowskiho kalometrie zjistili auxiny u 38% volně žijících a 83% symbiotických cyanobakterií. Dále metodami ELISA a GC-MS změřili, že volně žijící cyanobakterie vykazovaly nižší koncentrace endogenních a exogenních IAA oproti symbiotickým. Také zjistili, že u obou skupin exogenní tryptofan pozitivně ovlivňuje biosyntézu auxinů, ale negativně jejich vylučování do prostředí.

Obdobný experiment prokázání auxinů provedli Hussain et al. (2010) UPLC–ESI–MS/MS analýzou u pěti druhů cyanobakterií *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Chroococcidiopsis* a *Synechosystis*. Mimo jiné bakterie druhu *Anabaena* produkovaly nejvíce IAA a v pořadí za nimi následoval druh *Synechosystis*. U *Anabaena*, *Oscillatoria* a *Phormidium* převládala akumulace auxinů nad jejich uvolňováním. To ovšem neplatilo pro *Synechosystis* a *Chroococcidiopsis*.

Auxiny u cyanobakterií podporují růst a rozvoj (Tsavkelova et al., 2006) a v neposlední řadě u *Anabaena doliolum* stimulují fixaci dusíku (Kapoor & Sharma, 1981).

## 2.3 Ostatní hormony

K nejrozšířenějším hormonům v přírodě patří gibberelliny. Poprvé byla aktivita gibberelinů potvrzena pomocí GA-biotestu u cyanobakterie *Phormidium foveolarum* (Gupta & Gupta, 1973). Také *Cylindrospermum* a *Anabaenopsis* z řádu *Nostocales* syntetizují gibberelliny. Exogenní gibberelliny působící na rod *Anabaena* stimulují růst a fixaci dusíku (Tsavkelova et al., 2006). U *Microcystis aeruginosa* (řád *Chroococcales*) vysoká hladina exogenního gibberellinu  $A_3$  ( $GA_3$ ) stimuluje růst a tvorbu mikrocystinu (Pan et al., 2008). Funkce a biosyntéza těchto hormonů v bakteriích zatím nebyla zcela prozkoumána.



Ani o dalším hormonu, kyselině abscisové (ABA), není příliš známo. Byla detekována u jedenácti druhů cyanobakterií. V rostlinách působí ABA jako stresový hormon. Několika experimenty se došlo k závěru, že odpověď na stres u cyanobakterií nutně neznamená zvýšení endogenní hladiny ABA (Hartung, 2010). Exogenním působením hormonu na *Anabaena* HA 101 se snížila propustnost cytoplasmatické membrány pro ionty a proteiny (Huang, 1991). Dále ABA pozitivně ovlivňuje tvorbu heterocyt a činnost nitrogenasy v *Nostoc* 6720 (Smith et al., 1987). Obdobných výsledků bylo dosaženo rovněž u *Nostoc muscorum* a *Trichormus variabilis* (Hartung, 2010).

Stejně jako v předchozích případech ani o ethylenu v cyanobakteriích není publikováno příliš informací. Tento hormon byl u cyanobakterií studován Huang & Chow (1984).

### **3 Endosymbiotický původ chloroplastů**

Již v roce 1885 si Schimper všiml analogií mezi plastidy a volně žijícími cyanobakteriemi. Na začátku dvacátého století „Mereschkowsky vyslovil hypotézu o symbióze dvou plazem v buňce rozsivek“. K této teorii se vědci vrátili až v padesátých letech, kdy byla prokázána genetická autonomie chloroplastů (Kalina & Váňa, 2005).

#### **3.1 Fotosyntetický aparát u sinic a vyšších rostlin**

Fotosyntetický aparát sinic je tvořen plochými měchýřky – thylakoidy obklopenými fotosyntetickou membránou. Tyto měchýřky se v buňce většinou nalézají pod buněčnou stěnou nebo v protoplastu. Na vnější straně membrány thylakoidů jsou vázány polokulovité proteinové komplexy - fykobilizomy představující anténní systém, který sbírá světelnou energii a přenáší ji do reakčního centra fotosystému II. Ten spolu s fotosystémem I vyplňuje vnitřní prostor thylakoidů. Fykobilizomy se skládají ze tří fykobiliproteinů: modrého allofykocyaninu a fykocyaninu a červeného fykoerytrinu. Dále jsou zastoupeny i jiné fotosyntetické pigmenty jako  $\beta$ -karoten, zeaxantin, echinenon, kantaxantin a myxoxantofyl. V cytoplasmě je uložen chlorofyl a, který je pro cyanobakterie nepostradatelný (Kalina & Váňa, 2005).

U *Gloeobacter violaceus* thylakoidy chybí a pigmenty jsou tudíž součástí plazmatické membrány. U *Prochloron*, *Prochlorococcus*, *Prochlorothrix* a *Acaryochloris* chybí fykobilizomy a thylakoidy jsou podobně jako v chloroplastech srostlé. Kromě chlorofylu *a* se vyskytuje u skupiny *Prochloron*, *Prochlorococcus*, *Prochlorothrix* také chlorofyl *b*, u *Prochlorococcus* chlorofyl *c* a u *Acaryochloris* chlorofyl *d* (Kalina & Váňa, 2005).

U vyšších rostlin fotosyntéza probíhá také na membráně thylakoidů, které se ale nacházejí v chloroplastech, jejichž velikost se pohybuje mezi 2-5  $\mu\text{m}$ . Tato organela je obklopená dvěma membránami vzdálenými 5-10 nm (Keegstra et al., 1984). Membrány uzavírají hustou tekutinu – stroma, ve které jsou thylakoidy naskládány na sebe a tvoří tzv. grana. Na rozdíl od cyanobakterií se chlorofyly *a* a *b* nacházejí v thylakoidní membráně (Campbell & Reece, 2005).

### 3.2 Endosymbiotický vznik plastidů

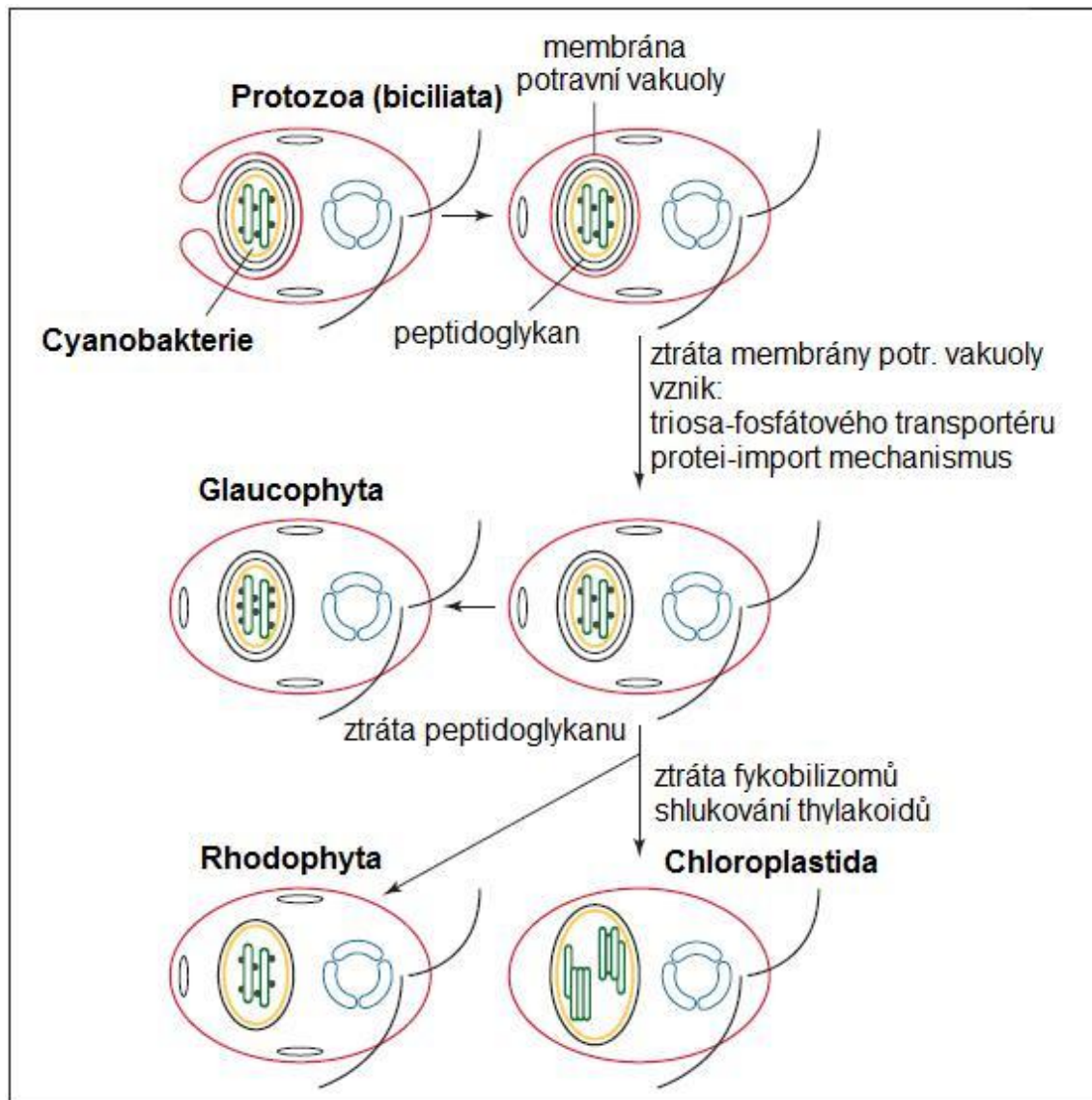
Úvodem je nutno zmínit, že o endosymbióze plastidů neexistují ve fosilních nálezech žádné přímé důkazy (Bergman et al., 2008). Plastidy se podle způsobu endosymbiózy dělí na primární, sekundární a terciární (Howe et al., 2008).

Primární plastid vznikl fagocytózou volně žijící cyanobakterie nefotosyntetizující buňkou Protozoa obsahující jádro, cytoskelet a mitochondrie (Obr. 4) (Cavalier-Smith, 1982).

Ve vyšších rostlinách je vnitřní membrána chloroplastu homologní k cytoplazmatické membráně cyanobakterií, ale původ vnější membrány je nejistý. Podobá se však buněčné stěně cyanobakterií (Keegstra et al., 1984), neboť u vnější membrány byla prokázána přítomnost galaktolipidů a karotenoidů (Jürgens & Weckesser, 1985) a také byl před několika lety u některých cyanobakterií nalezen protein homologní k chloroplastidovému proteinu Toc75 („translocon of the outer membrane of the chloroplast“) (více mechanismus importu proteinů do chloroplastu) (Reumann et al., 1999; Moslavac et al., 2005). Nicméně hlavní lipidová složka vnější membrány chloroplastu fosfatidylcholin, který je eukaryotického typu, spíše podporuje teorii, že membránu syntetizuje nefotosyntetizující eukaryotická buňka (Bölter et al., 1998).

Většina vědců podporuje monofyletický původ primárního plastidu (vznikl jedinkrát z jediné původní cyanobakterie), ale někteří autoři např. Nozaki et al. (2007) a Stiller et al. (2007) se spíše přiklánějí k polyfyletickému původu. Podle monofyletické

hypotézy obsahují primární plastid tři hlavní skupiny organismů: Chloroplastida (zelené řasy a rostliny), Rhodophyta a Glaucophyta (Howe et al., 2008).



Obrázek 4: Původ primárního plastidu. Cyanobakterie obsahující fykobilizomy byla fagocytována buňkou Protozoa (biciliata) a přeměněna na organelu. Poté došlo k eliminaci membrány potravní vakuoly, což umožnilo vývoj mechanismu importu proteinů a triosa-fosfátového transportéru. Pouze Glaucophyta si zachovala peptidoglykan. Chloroplastida následně ztratila fykobilizomy a thylakoidy vytvořily grana. K tomuto nedošlo u Rhodophyta (převzato z Cavalier-Smith, 2000).

Další skupiny eukaryot získaly plastidy, které obsahují tři nebo čtyři membrány a to procesem sekundární nebo terciární endosymbiózy. Při vzniku sekundárního plastidu dochází k pohlcení fotosyntetické eukaryotické buňky heterotrofní

eukaryotickou buňkou. Ve většině případů dochází ke ztrátě jádra fotosyntetické eukaryotní buňky. Pokud dojde ke ztrátě sekundárního plastidu z fotosyntetické eukaryotní buňky a nahrazení plastidem z jiného zdroje vzniká terciární plastid. Na rozdíl od původu primárního plastidu není pochyb, že tyto procesy v evoluci proběhly několikrát (Howe et al., 2008).

### 3.2.1 Transport genů do jádra a potenciální symbiont

Evoluční analýzou *A. thaliana* bylo zjištěno, že chloroplasty kódují jen 5-10 % celkového genomu cyanobakterie. Některé další geny byly přeneseny do jádra nebo byly zcela ztraceny. U *A. thaliana* představují přenesené geny přibližně 18 % jaderného genomu (Martin et al., 2002). Pro úspěšný přenos genů z chloroplastu do jádra je nutná přítomnost mechanismu, který poté importuje proteiny kódované geny cyanobakterie do chloroplastu (Soll & Schleiff, 2004). Rovněž bylo zjištěno, že více jak polovina proteinů kódovaná geny cyanobakterií není importována zpět do plastidů, ale v organismu rostlin převzaly jiné různorodé funkce - jakými jsou odolnost vůči chorobám nebo intracelulární transport proteinů (Martin et al., 2002).

Podle Larkuma et al. (2007) představuje monofyletická hypotéza zjednodušení toho, co se skutečně událo. Navrhli tzv. „model nákupní tašky“, jenž naznačuje, že u některých nestabilních endosymbiontů mohlo dojít k jejich lýzi. Právě lýzí může DNA snadno vstoupit do hostitelského jádra a přetrvat v něm, přestože se endosymbiont v buňce již nenachází. Pokud poté dojde k úspěšné endosymbióze, vzniká hybridní plastid, kde většina proteinů, které byly transportovány do plastidu, pochází od úspěšného endosymbionta a některé od neúspěšného. V rozboru genomu *A. thaliana* se ukázalo, že jaderný genom obsahoval geny ze tří druhů cyanobakterií: *Synechocystis* PCC6803, *Prochlorococcus marinus* MED4 a *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, nicméně většina proteinů se shodovala s proteiny *N. punctiforme* (Martin et al., 2002). Dalšími potenciálně úspěšnými symbionty také mohou být *Nostoc* PCC 7120 a *Anabaena variabilis* ATCC 29143. Počet homologních genů cyanobakterie převedených do rostliny zřejmě souvisí s velikostí genomu cyanobakterie. Nicméně je nutno zmínit, že velikost genomu nemá vliv na sekvenční podobnost srovnávaných proteinů cyanobakterie a rostliny (Deutsch et al., 2008). Mimo jiné významnou roli hraje také laterální přenos genů mezi cyanobakteriemi, který je velmi hojný (Zhaxybayeva et al., 2006). Z výsledků experimentů vyplývá, že za předchůdce plastidů lze s největší pravděpodobností označit vláknité cyanobakterie, jež tvoří heterocyty a poskytují hostiteli dusík (Deutsch et al., 2008).

Je nutno zmínit, že tyto výsledky jsou v rozporu s výsledky experimentu provedeným Deschamps et al. (2008), kteří navrhli, že u předků rostlinné říše se nachází genetický aparát zodpovědný za tvorbu škrobu, který běžně mají rostliny. Syntéza a ukládání škrobu byly prokázány u jednobuněčné cyanobakterie *Cyanothece* ATCC 51142 patřící do řádu *Chroococcales*, která netvoří heterocyty, a jsou tedy považovány za potenciálního původce plastidů, protože podporují jejich „jednobuněčný“ charakter. Syntézou škrobu časově oddělily fixaci dusíku a tvorbu kyslíku. Tyto schopnosti ztratily krátce po endosymbióze, protože došlo k přenosu genů, které kódují enzymy zodpovědné za syntézu škrobu, do jádra eukaryotní buňky dříve, než byl vyvinut mechanismus importu proteinů do chloroplastu. Pouze gen zodpovědný za expresi enzymu glukosa-1-fosfátadenyltransferasy (AGPasa, E.C. 2.7.7.27) nebyl převeden, protože je pevně spjat s fotosyntézou. Aby produkty genů převedených do jádra mohly katalyzovat syntézu škrobu, je nutná okamžitá přítomnost ADP-glukosy v cytosolu hostitele (Deschamps et al., 2008). Zjednodušeně lze říci, že ADP-glukosu a jiné uhlíkaté produkty vznikající při fotosyntéze v cyanobakterii může hostitel přijímat výměnou za AMP pomocí triosa-fosfátového transportéru, který byl okamžitě po uskutečnění endosymbiózy vytvořen v plasmatické membráně cyanobakterie z dosavadních cukerných nukleotidových transportérů transmembránového systému hostitelským organismem. Vznik transportéru je považován za rozhodující krok v nevratném spojení cyanobakterie a eukaryotní buňky (Deschamps et al., 2008; Weber et al., 2006).

### **3.2.2 Mechanismus importu proteinů do chloroplastu**

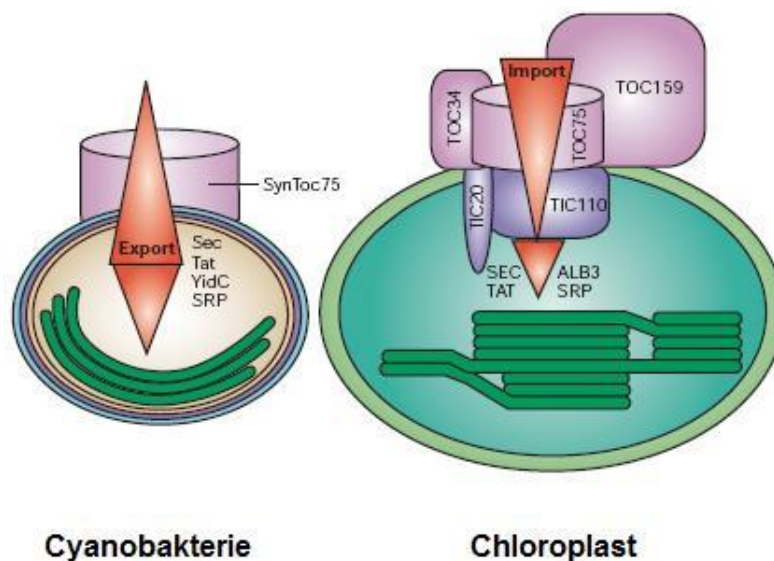
Hlavní mechanismus importu proteinů se nachází na obou membránách chloroplastu a skládá se z TOC („*translocon of the outer membrane of the chloroplast*“) a TIC („*translocon of the inner membrane of the chloroplast*“) komplexu. Jádro TOC komplexu se skládá z Toc159, Toc34 a Toc75. Toc 159 a Toc34 jako primární receptory pro prekurzory jsou nedílnou součástí GTPasy a dále se vážou na Toc75, který svou strukturou vytváří kanál. Kromě těchto hlavních komponent tvoří TOC komplex také Toc64 a Toc12 (Andrès et al., 2010).

Většina proteinů zapojených v metabolických drahách v chloroplastu je kódována jadernými geny. Chloroplastické proteiny jsou syntetizovány jako prekurzory v cytosolu, které obsahují na N-konci transitní peptid, jehož sekvence je nutná pro rozpoznání chloroplasty (Andrès et al., 2010).

Prekurzory mohou být na TOC komplex dopravovány čtyřmi cestami. Některé preproteiny mohou být posttranslačně fosforylovány, čímž umožňují jejich rychlejší

transport. Fosforylované preproteiny se vážou na cytosolární Hsp70 (protein tepelného šoku) a regulační protein 14-3-3, které je přednostně dopraví na GTP regulované receptory Toc34 a Toc159, kde dochází k jejich defosforylaci. Na receptory se přímo vážou také některé z nefosforylovaných prekurzorů. Další část nefosforylovaných prekurzorů se v cytosolu váže na Hsp90 a je dopravována na koreceptor Toc64, který interaguje s Toc34. Ten prekurzory převádí na Toc75. Čtvrtou cestou jsou za pomoci Hsp70 dopravovány preproteiny, které neobsahují transitní peptid. Tyto preproteiny neprocházejí membránou, ale jsou v ní lokalizovány. Preproteiny s transitním peptidem procházejí membránou přes kanál Toc75 za spotřeby ATP na TIC komplex, který je za hydrolýzy ATP dopraví do stromy, kde jsou transitní peptidy odštěpeny peptidasami a v poslední řadě poskládány pomocí chaperonů do funkční podoby (Andrès et al., 2010; Soll & Schleiff, 2004).

Toc75 tvoří kanál  $\beta$ -válcového typu, který je ohraničen 16 transmembránovými  $\beta$ -skládanými listy (Soll & Schleiff, 2004). Strukturální homolog k proteinu Toc75 izolovaného z hrachu se nachází také ve vnější membráně *Synechocystis* PCC 6803 (označen SynToc75), ale jejich vzájemná homologie je pouze 21%. *Synechocystis* také pravděpodobně syntetizuje proteiny homologní k Toc34 a Tic22, který je součástí TIC komplexu (Reumann et al., 1999), ale Toc159 a Tic110 byly zřejmě syntetizovány *de novo* v eukaryotních buňkách, neboť se zatím nenašly žádné jejich homology v cyanobakteriích. Ačkoliv existuje homologie mezi Toc75 a SynToc75, jejich funkce je odlišná (Bölter et al., 1998). Přestože SynToc75 na rozdíl od Toc75 jednoznačně neupřednostňuje směr transportu (Soll & Schleiff, 2004), zjistilo se, že exportuje (Bölter et al., 1998) toxický hemolysin a adhesin z cyanobakterií (Reumann et al., 1999). Až spojením Toc75 s Toc34 a Toc159 získal specifickou pro import proteinů. Též TIC komplex a chaperony poskytují hnací sílu pro import (Obr. 5) (Soll & Schleiff, 2004). Omp85 („outer membrane protein“) jako homologní protein k Toc75 byl také proteomickou analýzou nalezen ve vnější membráně *Nostoc* PCC 7120 (Moslavac et al., 2005).



Obrázek 5: Srovnání translokátoru cyanobakterie *Synechocystis* PCC 6803 a chloroplastu. Transport proteinů u cyanobakterií je zajištěn pouze proteinovým kanálem SynToc75, který proteiny exportuje z organismu, kdežto u chloroplastu je jejich import zajištěn TOC a TIC komplexem (Soll & Schleiff, 2004).

### 3.3 Endosymbióza z pohledu současné symbiózy

Informace o mechanismu endosymbiózy a vývoji symbiózy lze získat na základě současných vztahů cyanobakterií s *Gunnera* a *Azolla* sloužících jako modelové systémy symbiózy. Především druhy *Nostoc* vykazují vysoké symbiotické schopnosti, které mohou přetrvávat 2,1 miliard let od prvního kontaktu (Bergman et al., 2008).

Symbióza s *Gunnera* představuje jedinečný vnitrobuněčný vztah s krytosemennou rostlinou, která má vyvinuté selektivní žlázy pro vstup cyanobakterií. Mechanismus rozpoznání cyanobakterií při symbióze a jejich vstup do rostlinné buňky je zatím víceméně neznámý. Cyanobakterie mají schopnost se rychle adaptovat na vnitřní prostředí rostliny a stejnou tendenci zaujímají i ve snaze stát se opět volně žijícími mikroorganismy. Tato adaptace vede ke změně fenotypu cyanobakterií, kdy dochází k diferenciaci vegetativních buněk cyanobakterií na pohyblivá hormogonia, která vstupují do rostlinné buňky. Poté následuje opět přeměna buněk na vegetativní vlákna s heterocyty. Cyanobakterie uvnitř rostlinné buňky mají mnohem větší počet heterocyt než volně žijící mikroorganismy (Bergman et al., 2008).

Vztah mezi volně se vznášející vodní kapradinou *Azolla* s cyanobakteriemi pravděpodobně rodu *Nostoc* a *Anabaena* představuje další typ trvale udržované symbiózy. Cyanobakterie zde žijí vně buněk listu a zcela ztratily schopnost volně žít,

což je zřejmě způsobeno ztrátou nebo umlčením části jejich genomu. Další vlastností této symbiózy je to, že *Azolla* umožňuje vertikální přenos cyanobakterií mezi generacemi rostlin (Bergman et al., 2008).

Rostliny buněčnými a molekulárními změnami, které byly rozhodující i u předchůdce chloroplastu, navozují v cyanobakteriích symbiotický fenotyp. Tyto změny souvisejí především s buněčným dělením u cyanobakterií a diferenciací jejich buněk. Na rozdíl od současné symbiózy, kdy jsou stimulovány procesy v metabolismu dusíku, byla při endosymbióze nejspíš podporována fotosyntéza a naopak potlačován metabolismus dusíku (Bergman et al., 2008).



# **Praktická část**

## 4 Metody a materiál

### 4.1 Příprava biologického materiálu

Tritiem značené cytokininy byly získány z Izotopové laboratoře Ústavu Experimentální botaniky AV ČR. Jejich radioaktivita byla po vhodném ředění (1:100) ověřena pomocí scintilačního detektoru LS 6500 (Beckman; Brea, CA, USA) a čistota pomocí kapalinového chromatografu Alliance 2695 (Waters; Milford, MA, USA) spojeného s detektorem fotodiodového pole 2996 (Waters; Milford, MA, USA), který detekuje sloučeniny v rozmezí vlnových délek od 210 nm do 600 nm. Cytokininy iP a BA byly získány od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA) a iPR od firmy OIChemIm (Olomouc, ČR). Cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 (The Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria; Paříž, Francie) byly kultivovány v 50 ml bezdusíkatého média (BG11<sub>0</sub>; složení: 0,18 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O; 0,3 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O; 0,25 mM CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O; 0,03 mM kyselina citronová; 0,03 mM citronan amonno-železitý; 0,38 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,003 mM Na<sub>2</sub>EDTA·2 H<sub>2</sub>O; 1 ml směsi stopových prvků (2,86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O; 0,222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O; 0,390 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O; 0,079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O; 0,0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O); pH 7,4) nebo dusíkatého média (BG11; složení: BG11<sub>0</sub> + 17,65 mM NaNO<sub>3</sub>) v přítomnosti jednoho z cytokininů (iP, iPR, BA).

V každé experimentální sadě byly cyanobakterie kultivovány: bez přítomnosti cytokininu, v přítomnosti 5 μmol<sup>-1</sup> cytokininu a v přítomnosti 5 μmol<sup>-1</sup> cytokininu a tritiem značeného cytokininu o celkové radioaktivitě 240 000 – 250 000 DPM. Zásobní roztok cytokininu byl připraven v dimethylsulfoxidu (DMSO). Všechna kultivační média obsahovala přibližně stejné množství DMSO (0,07 %). Z takto připravených médií bylo 10 μl analyzováno pomocí HPLC (kontrola přidaného množství cytokininu). Poté byla média inokulována kulturou *Nostoc* PCC 7120 tak, aby obsahovala 0,1 μg chlorofylu na 1 ml média. Současně byl proveden kontrolní experiment, při kterém byla ověřena stabilita cytokininů za podmínek kultivace: 50 ml média obsahujícího odpovídající množství značeného a neznačeného cytokininu bylo inkubováno bez přítomnosti cyanobakterie za stejných podmínek jako inokulovaná média. Množství tritiem značených cytokininů přidaných do média bylo ověřeno pomocí scintilačního detektoru.

## 4.2 Kultivace cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120

Cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 byly kultivovány v kultivační komoře SANYO MLR 350H (Osaka, Japonsko) 30 dní, při teplotě 24°C s režimem den/noc 16/8 hodin. Intenzita osvětlení byla nastavena na 25  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a vlhkost vzduchu na 60 %.

## 4.3 Úprava biologického materiálu

Nejprve byly kultury cyanobakterií 15 minut centrifugovány při 24 150 g a teplotě 4°C. U každého supernatantu (média), který byl odlit, bylo zkontrolováno množství zbývajících cytokininů pomocí HPLC a aktivita tritium značených sloučenin scintilačním detektorem. Médium bylo poté zmrazeno do další analýzy při – 25°C. Buňky byly kvantitativně převedeny do mikrozkušavek a 10 minut centrifugovány při 23 500 g a teplotě 4°C. Vzniklý supernatant byl odebrán a usazené buňky byly následně promyty 1 ml destilované vody, zvortexovány a znovu 10 minut centrifugovány za stejných podmínek. Odstředěný supernatant byl pak opět odebrán. Postup byl opakován ještě jednou.

Dále byly buňky zlyzovány, po přidavku 1 ml Bielského pufru (60 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 25 %  $\text{CHCl}_3$ , 5 %  $\text{HCOOH}$ , 10 %  $\text{H}_2\text{O}$ ), zmražením v kapalném dusíku a následným rozmražením při teplotě 42°C. Tento proces byl opakován celkem pětkrát.

Takto upravené buňky byly 30 minut extrahovány při teplotě 4°C na rotátoru a poté 5 minut centrifugovány při 20 630 g a 4°C. Vzniklý supernatant byl kvantitativně převeden do čistých mikrozkušavek, k peletu byl přidán 1 ml Bielského pufru a celý postup extrakce byl ještě jednou zopakován.

## 4.4 Přečištění vzorků extrakcí na pevné fázi (SPE)

Buněčné extrakty byly přečištěny na kolonkách Mega BE-SCX (1g 6ml; Varian; Palo Alto, CA, USA) metodou vycházející z postupu uvedeného v Novák et. al (2003). Sorbent byl aktivován 5 ml methanolu a následně ekvilibrován 5 ml ekvilibračního roztoku (50 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 2 %  $\text{HCOOH}$ , 48 %  $\text{H}_2\text{O}$ ). Poté byl na kolonky nanesen vzorek. Po jeho projití byla dále kolonka promyta nejprve 5 ml Bielského pufru a pak stejným množstvím methanolu. Eluce byla provedena 4 ml elučního pufru (60 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 40 % 4 M  $\text{NH}_3$ ) a eluát byl jímán do předem připravených zkumavek. Na závěr byly vzorky

odpařeny na rotační vakuové odparce (Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, USA) dosucha.

Média a kontrolní vzorky ( $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  neznačeného cytokininu a příslušné množství značeného cytokininu v 50 ml média BG11<sub>o</sub> nebo BG11), které nebyly kultivovány, byly přečištěny na kolonkách StrataX C18 ( $33 \mu\text{m}$ , 0,5 g; Phenomenex; Torrance, CA, USA). Sorbent byl aktivován 3 x 5 ml methanolu a ekvilibrován 3 x 5 ml redestilované vody. Poté bylo nanášeno 40 ml média a průchozí frakce byla jímána do připravených zkumavek. Poté byly kolonky promyty 5 ml redestilované vody. Zachycené cytokininy a jejich metabolity byly eluovány 2 x 5 ml methanolu do zkumavek.

V průchozích frakcích vzorků médií a kontrolních vzorků a eluátech byla ověřena aktivita tritiem značených sloučenin. Ke 400  $\mu\text{l}$  média nebo 100  $\mu\text{l}$  eluátu ve scintilačních zkumavkách bylo přidáno 1,5 ml scintilačního koktejlu Ecolite (MP Biomedicals; Santa Ana, CA, USA). Směs byla zvortexována a aktivita tritia změřena scintilačním detektorem. Nakonec byl eluát stejně jako v předchozím případě odpařen.

#### 4.5 Analýza metabolitů pomocí HPLC

Odpařené vzorky obsahující extrakt z buněk byly rozpuštěny ve 150  $\mu\text{l}$  a vzorky média v 200  $\mu\text{l}$  směsi (5 % methanolu a 95 % 15mM kyseliny mravenčí, pH 4). Vzorky byly vortexovány a rozpouštěny pomocí ultrazvuku. Po rozpuštění bylo k měření radioaktivity odebráno 10  $\mu\text{l}$  do scintilačních zkumavek a k nim bylo přidáno 2 ml scintilačního koktejlu. Zbytek vzorku byl kvantitativně převeden do čisté mikrozkušavky a 2 min centrifugován při 9 600 *g*. Čistý supernatant byl použit pro HPLC měření.

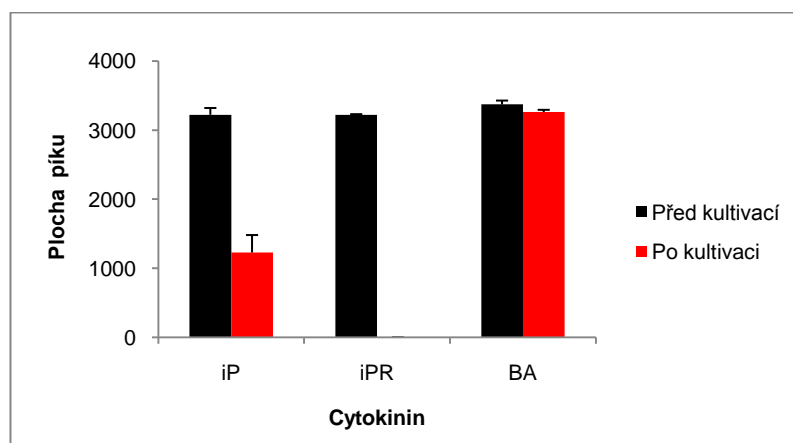
Pro HPLC analýzu cytokininů byla použita metoda vycházející z postupu dle Novák et. al (2003). K jejich analýze byla použita kolona Symmetry C18 ( $5 \mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm; Waters; Milford, MA, USA), na kterou bylo nastříknuto 80  $\mu\text{l}$  extraktu buněk a 20  $\mu\text{l}$  média. Teplota kolony byla pomocí termostatu udržována na teplotě 30°C. Mobilní fáze na počátku se skládala ze 2 % roztoku A (methanol) a 98 % roztoku B (15 mM HCOOH upravená NH<sub>4</sub>OH na pH 4). Složení mobilní fáze ve 31. minutě odpovídalo 60 % roztoku A a 40 % roztoku B a ve 32. minutě tvořil mobilní fázi pouze roztok A, kterým byla kolona minutu promývána. Poté bylo složení mobilní fáze převedeno do počátečních podmínek. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,25 ml/min. Cytokininy a jejich metabolity byly detekovány pomocí detektoru fotodiodového pole v rozmezí 210-600 nm. Data byla zpracována pomocí softwaru Masslynx (Waters; Milford, MA, USA). U vzorků, které obsahovaly tritiem značené cytokininy, byly frakce

během HPLC separace sbírány po jedné minutě sběračem frakcí LKB Frac 100 (Pharmacia; Peapack, NJ, USA), ve kterých byla po přidání 2 ml scintilačního koktejlu měřena aktivita značených sloučenin pomocí scintilačního detektoru.

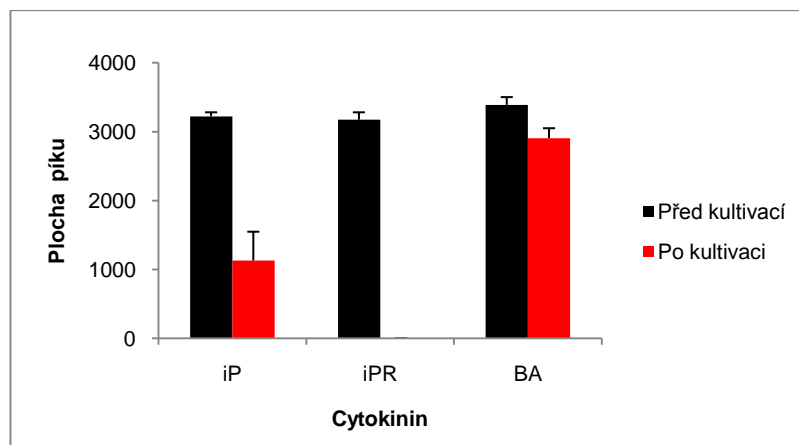
## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 HPLC/UV analýza obsahu cytokininů v médiu před a po kultivaci

Před inokulací bylo nejprve 10  $\mu\text{l}$  média obsahující 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  neznačeného cytokininu analyzováno pomocí HPLC/UV. Měření bylo opětovně provedeno po třiceti dnech kultivace. Z výsledků měření je u obou médií zřejmé, že iP přibližně z jedné třetiny vstoupil do buněk. iPR nebyl detekován, avšak ve chromatogramu byl nalezen pík odpovídající iP, který představoval přibližně jednu třetinu obsahu plochy píku iPR. Tato skutečnost plyne z přeměny iPR na iP vlivem metabolických procesů. BA se nacházel v BG11<sub>o</sub> médiu v téměř stejném množství jako před kultivací, na rozdíl od BG11 média, kde vlivem částečného vstupu do buněk bylo jeho množství výrazněji sníženo (Obr. 6 a 7).



Obrázek 6: Obsah cytokininů před a po kultivaci v médiu BG11<sub>o</sub> inokulovaném kulturou *Nostoc*.



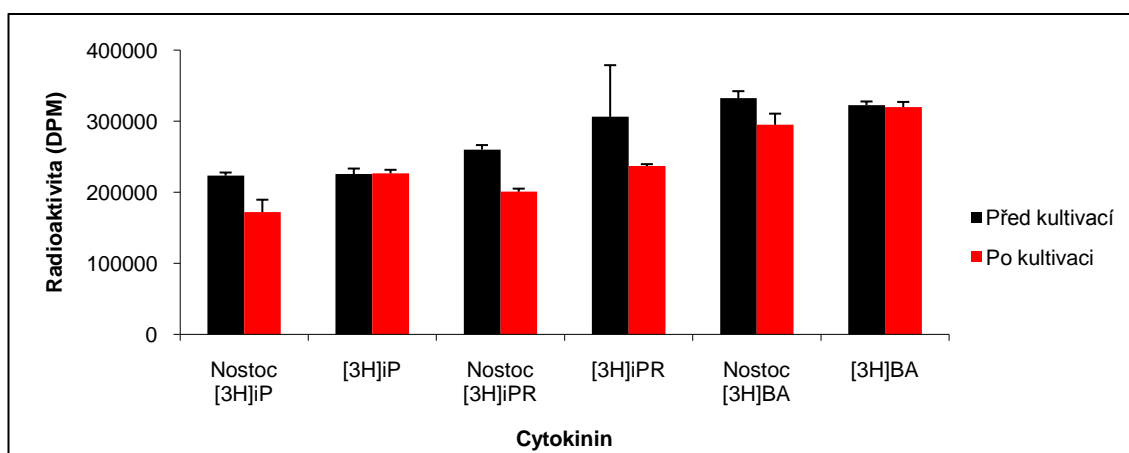
Obrázek 7: Obsah cytokininů před a po kultivaci v médiu BG11 inokulovaném kulturou *Nostoc*.

## 5.2 Radioaktivita u vzorků média a extraktů z buněk

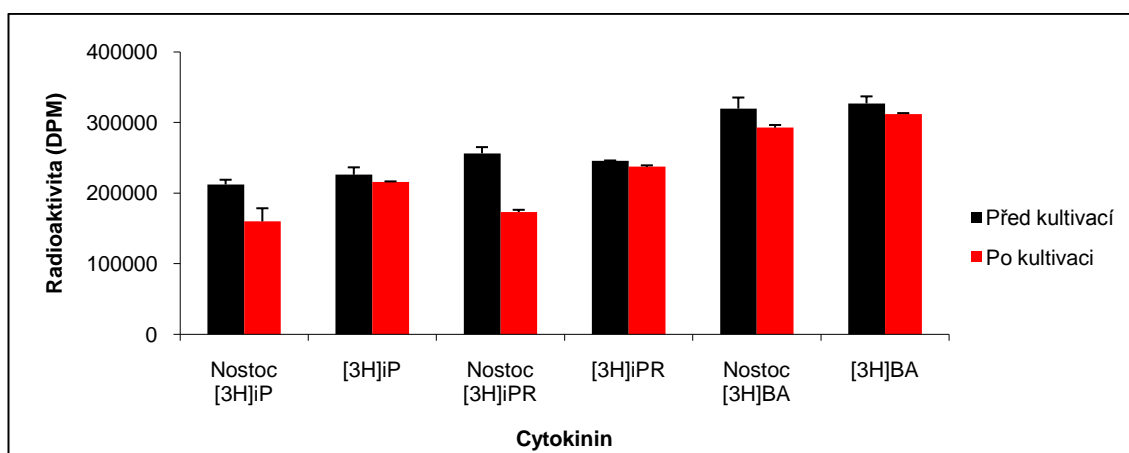
Současně s analýzou HPLC/UV byla ve vzorcích média obsahujících tritiem značené cytokininy změřena radioaktivita tritia před a po kultivaci scintilačním detektorem (Obr. 8 a 9). Také množství radioaktivně značených sloučenin přítomných v proších frakcích, jako i v eluátech po přečištění SPE a v rozpuštěném odparku vzorků média bylo měřeno scintilačním detektorem (Tab. 1). Radioaktivita ve vzorcích obsahujících extrakt z buněk byla měřena pouze po rozpuštění odpařeného eluátu z SPE sorbentu v roztoku 5 % methanolu a 95 % kyseliny mravenčí z důvodu přítomnosti barviv, která rušila stanovení.

Naměřené hodnoty radioaktivit značených sloučenin před kultivací ukazují, že celková radioaktivita v médiu obsahující  $[^3\text{H}]i\text{P}$  se pohybovala v rozmezí 200 000-230 000 DPM, u  $[^3\text{H}]i\text{PR}$  se jednalo o rozmezí 240 000-260 000 DPM. V médiu obsahující  $[^3\text{H}]BA$  byly změřeny hodnoty aktivit od 300 000 do 340 000 DPM (Obr. 8 a 9). Ačkoliv jsou hodnoty celkové radioaktivity po kultivaci pouze přibližné, neboť nebyl znám přesný objem média (cca 43 ml) v důsledku jeho odparu. U vzorků obsahujících značené cytokininy, které byly inokulovány kulturou *Nostoc*, lze pozorovat, že radioaktivita po kultivaci klesla, i když v případě  $[^3\text{H}]BA$  se jednalo pouze o mírný pokles. Po porovnání s médii bez *Nostoc*, kde hodnoty radioaktivity byly srovnatelné s hodnotami před kultivací, lze vyslovit závěr, že část značených cytokininů vstoupila do buněk. Srovnáním inokulovaných médií po kultivaci s médii před kultivací bylo zjištěno, že u  $[^3\text{H}]i\text{P}$  a  $[^3\text{H}]i\text{PR}$  do buněk vstoupilo přibližně 20-30 % značených cytokininů, u BA ubylo v médiu pouze přibližně 10 % radioaktivity

(Obr. 8 a 9). Po porovnání obou typů médií je vidět, že v BG11 je pokles radioaktivity výraznější než v BG11<sub>o</sub>.



Obrázek 8: Celková radioaktivita cytokininů v médiích BG11<sub>o</sub> před a po kultivaci v přítomnosti a nepřítomnosti kultury *Nostoc*.



Obrázek 9: Celková radioaktivita cytokininů v médiích BG11 před a po kultivaci v přítomnosti a nepřítomnosti kultury *Nostoc*.

Ve frakcích procházejících přes SPE sorbenty byla naměřena u všech vzorků nízká radioaktivita. Radioaktivita byla vyšší (15-40 % celkové radioaktivity před SPE) v přítomnosti kultury, než v médiu bez *Nostoc* (7-15 %). *Nostoc* pravděpodobně metabolizuje původní cytokininy na sloučeniny, které se nezadržují na sorbentu, případně je účinnost SPE snížena v přítomnosti biologického materiálu (Tab. 1). Radioaktivita, která byla změřena ve frakcích kontrolních vzorků připravených pro kontrolu účinnosti SPE, byla nižší (4-10 %) než v inkubovaných médiích bez *Nostoc*. Zřejmě dochází k výměně tritia mezi cytokininy a vodou. Jinými slovy lze říci, že SPE byla účinná přibližně z 90 % (Tab. 2).

Pro separaci metabolitů HPLC metodou byly použity přečištěné vzorky média, které ve 20 µl obsahovaly v případě přítomnosti kultury *Nostoc* přibližně radioaktivitu 10 000 DPM, výjimkou byly vzorky obsahující [<sup>3</sup>H]BA, kde bylo množství radioaktivity v analyzovaném vzorku okolo 20 000 DPM.

Tabulka 1: Celková radioaktivita v průběhu čištění vzorků média pro HPLC analýzu.

		Radioaktivita (DPM)				
Vzorek		Před SPE	Prošlá frakce	Eluát	Rozpuštěný odparek	Nástřík
Bezdušikaté médium BG11 <sub>0</sub>	<i>Nostoc</i> + [ <sup>3</sup> H]iP	171603	44505	80554	117092	<b>11709</b>
		148461	62433	67439	104836	<b>10484</b>
	[ <sup>3</sup> H]iP	207534	26807	163126	173552	<b>17355</b>
		214179	29691	85968	182729	<b>18273</b>
	<i>Nostoc</i> + [ <sup>3</sup> H]iPR	184959	46095	158414	143278	<b>14328</b>
		184044	65535	127573	132767	<b>13277</b>
	[ <sup>3</sup> H]iPR	249968	39783	227245	196423	<b>19642</b>
		218467	34723	209557	210948	<b>21095</b>
	<i>Nostoc</i> + [ <sup>3</sup> H]BA	264232	44310	252125	232620	<b>23262</b>
		263464	43178	237974	209617	<b>20962</b>
	[ <sup>3</sup> H]BA	292687	34338	258936	212848	<b>21285</b>
		302396	28705	273460	212339	<b>21234</b>
Dušikaté médium BG11	<i>Nostoc</i> + [ <sup>3</sup> H]iP	160950	52772	119690	105636	<b>10564</b>
		136423	67050	92704	74090	<b>7409</b>
	[ <sup>3</sup> H]iP	199993	27869	187689	170724	<b>17072</b>
		201166	25781	159553	172166	<b>17217</b>
	<i>Nostoc</i> + [ <sup>3</sup> H]iPR	163114	27288	99232	84145	<b>8415</b>
		139146	49599	81046	82021	<b>8202</b>
	[ <sup>3</sup> H]iPR	222054	39451	208244	201636	<b>20164</b>
		219778	38944	216482	198192	<b>19819</b>
	<i>Nostoc</i> + [ <sup>3</sup> H]BA	269712	56862	235064	212038	<b>21204</b>
		274688	57157	230857	216046	<b>21605</b>
	[ <sup>3</sup> H]BA	290988	37947	264904	233556	<b>23356</b>
		289254	38879	279384	247737	<b>24774</b>



Tabulka 2: Celková radioaktivita v průběhu čištění kontrolních vzorků. Vzorky, pro kontrolu účinnosti SPE, byly připraveny bezprostředně před jejich čištěním SPE.

Kontroly	Radioaktivita (DPM)				
	Před SPE	Prošlá frakce	Eluát	Rozpuštěný odparek	Nástřík
[ <sup>3</sup> H]iP	177524	16910	158078	140323	<b>14032</b>
[ <sup>3</sup> H]iPR	194202	7383	210402	193057	<b>19306</b>
[ <sup>3</sup> H]BA	228145	17284	256008	222371	<b>22237</b>

Radioaktivita, změřená po rozpuštění odpařených vzorků extraktů buněk ve 150 µl směsi (5 % methanolu a 95 % 15 mM kys. mravenčí, pH 4), odpovídala pouze přibližně 2 % původní radioaktivity v médiu bez kultury *Nostoc* po kultivaci. Protože nebylo možné ověřit množství cytokininu vstoupeného do buňky a ani radioaktivitu během čistícího procesu v těchto vzorcích scintilačním detektorem z důvodu zabarvení, nelze říci, kolik cytokininu přesně vstoupilo do buněk a zda *Nostoc* metabolizuje přidaný cytokinin na sloučeniny, které se zadržují na sorbentu a následně se neeluují nebo jím přímo procházejí. Radioaktivita v 80 µl vzorků použitých pro HPLC analýzu nebyla, mimo dvou vzorků, větší než 3 000 DPM (výsledky zde nejsou uvedeny).

### 5.3 HPLC/UV analýza metabolismu cytokininů v kultivačním médiu

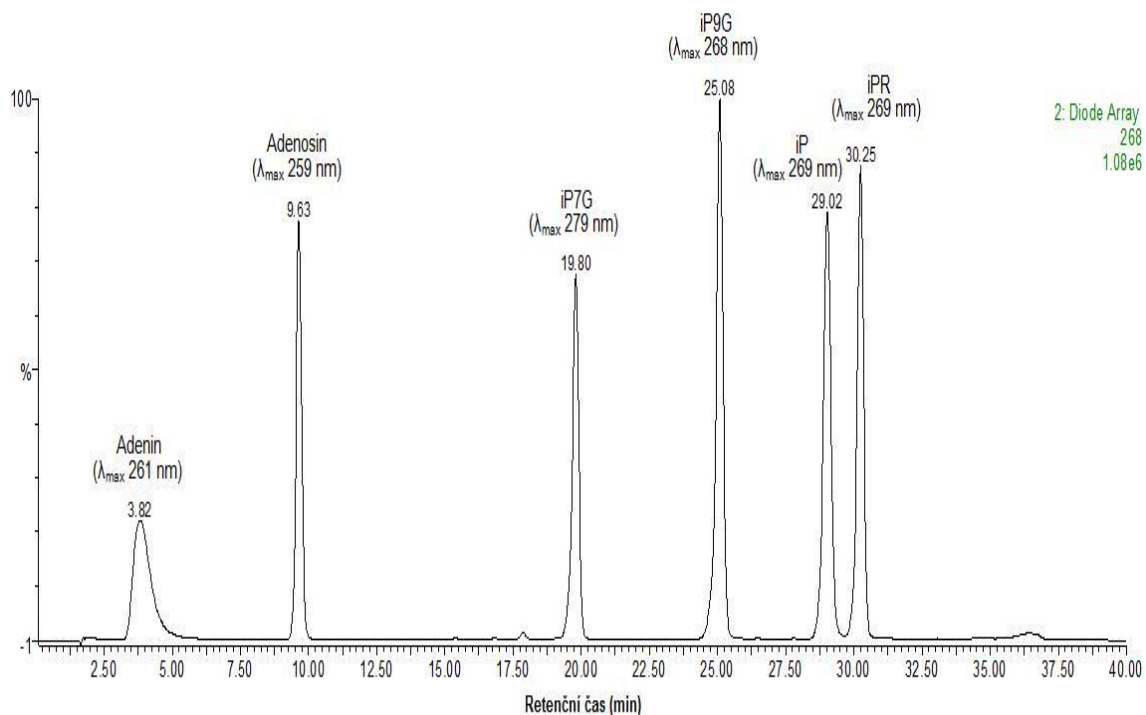
Pro HPLC analýzu vzorků média bylo použito 20 µl. V případě, že média obsahovala radioaktivně značené sloučeniny, byly jejich frakce sbírány po jedné minutě a radioaktivita v nich proměřena scintilačním detektorem. Naměřená data byla poté zpracována do podoby grafu. Z grafů lze vyčíst, že převládá trend nižších hodnot radioaktivity v médiu inokulovaném kulturou *Nostoc* než v médiu bez kultury. Tento trend podporují výsledky získané v předchozích měřeních.

V kultivačních médiích BG11<sub>o</sub> a v kontrolním vzorku, do kterých byl přidán [<sup>3</sup>H]iP, byla v chromatogramech nalezena sloučenina s retenčním časem 4 min a v odpovídající frakci byla naměřena zvýšená radioaktivita. Tato sloučenina měla absorpční maximum při 261 nm, jež odpovídá adeninu (Obr. 10, 12). Adenin byl však částečně nebo zcela získán samovolným rozkladem iP v zásobním roztoku. Protože naměřená radioaktivita ve frakci odpovídající eluci adeninu v médiích bez *Nostoc* a v kontrolním vzorku byla vyšší než v inokulovaných médiích (Obr. 12A, 12B, 13A, 13B), lze předpokládat, že adenin byl spotřebován buňkou jako běžná sloučenina jejího metabolismu. Zvýšená radioaktivita byla také naměřena ve frakci v čase mezi 26. a 27.

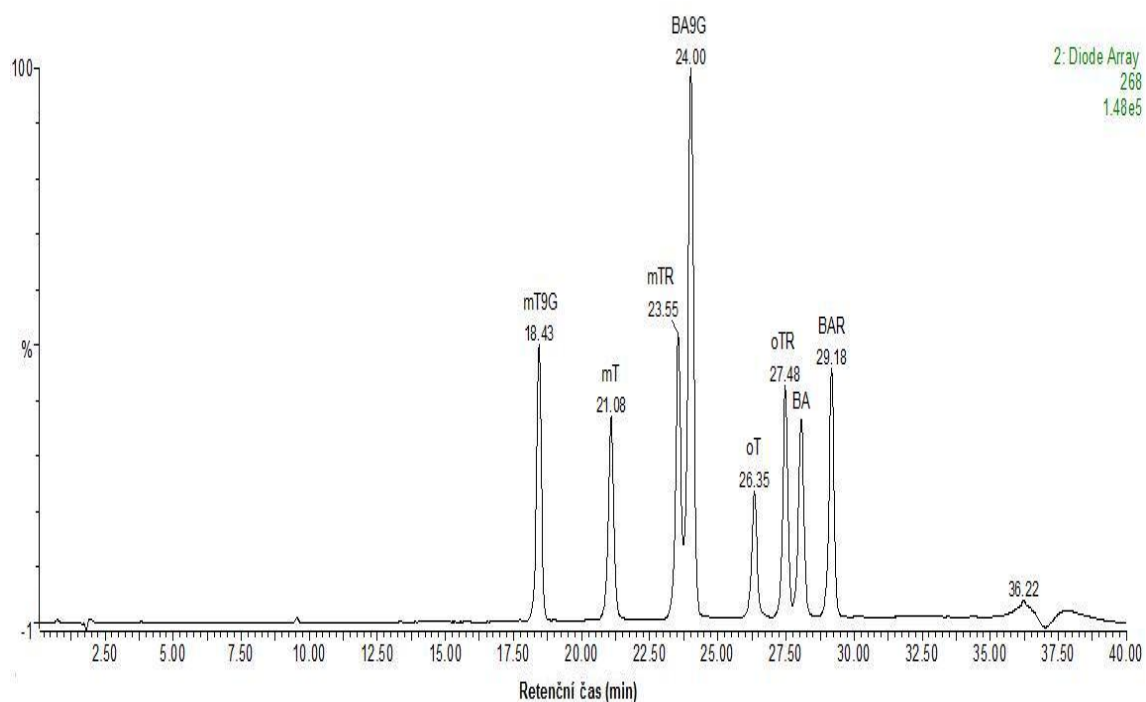
minutou, kde eluuje sloučenina s retenčním časem 26,5 minut a absorpčním maximem při 268 nm (Obr. 12A, 12C) Přestože absorpční maximum této sloučeniny odpovídá oblasti, ve které absorbují cytokininy, nelze říci, o kterou sloučeninu by se mohlo jednat, neboť jí neodpovídá žádný ze standardních cytokininů. Dalo by se uvažovat o cytokininu iP N<sup>9</sup>-glukosidu, který při této vlnové délce má sice maximum, ale jeho retenční čas je 25,1 minut (Obr. 10). Tato neznámá sloučenina, která nebyla detekována v médiích BG11 (Obr. 13), bude v dalších experimentech identifikována. Stejně tak byla ve všech médiích obsahujících [<sup>3</sup>H]iP, jako i v kontrolním vzorku naměřena aktivita mezi 17. – 19. minutou. Vzhledem k přítomnosti zvýšené radioaktivity i v kontrolním vzorku se jednalo o samovolný rozklad produktu iP. V chromatogramech médií bez kultury *Nostoc* a kontrolního vzorku byl nalezen pouze pík odpovídající iP. Cytokinin iP opouští kolonu v čase mezi 28. a 29. minutou (Obr. 12, 13).

V chromatogramech médií BG11<sub>0</sub> a BG11 bez kultury *Nostoc*, která obsahovala <sup>3</sup>HiPR byly nalezeny píky odpovídající adenosinu a iPR (chromatogram zde není uveden). Těmto píkům také odpovídala aktivita detekovaná scintilačním detektorem (Obr. 14B, 15B). Tyto sloučeniny nebyly nalezeny v inokulovaném médiu, neboť adenosin byl spotřebován buňkou *Nostoc* při různých metabolických cestách a iPR byl také zmetabolizován na iP. iP byl eluován mezi 28. a 29. minutou (Obr. 14C, 15C). V inokulovaném médiu BG11<sub>0</sub> se obdobně jako v BG11<sub>0</sub> médiích obsahujících iP, nacházela sloučenina s retenčním časem 26,6 minut a s maximem 269 nm (14C), která obsahovala radioaktivní značku (14A). Tato sloučenina se nenacházela u média BG11 (15A, 15C). Bylo zvažováno, zda se nejedná o iP N<sup>9</sup>-glukosid. Nicméně, zmíněný konjugát iP se eluuje v retenčním časem 25,1 minut a vykazuje maximum 268 nm (Obr. 10). Přestože byla u média BG11<sub>0</sub> změřena mírně zvýšená radioaktivita mezi 4. a 5. minutou (Obr. 14A), odpovídající pík nebyl nalezen (Obr. 14C). U BG11 média byl sice nalezen pík s retenčním časem 3,9 min a maximem absorpce při 264 nm, ale zřejmě se nejedná o adenin (Obr. 15A, 15C).

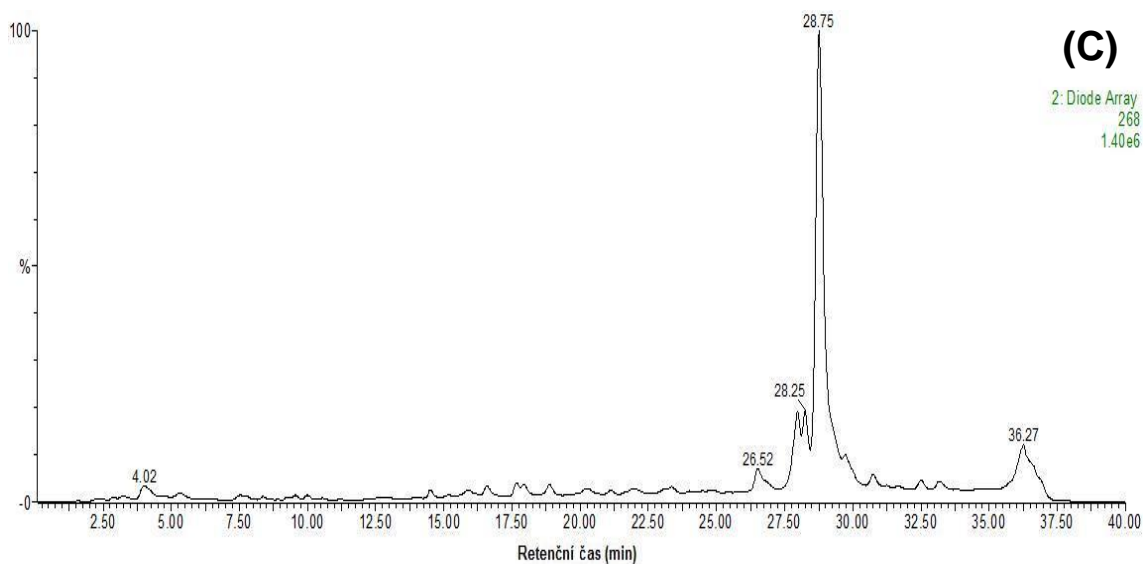
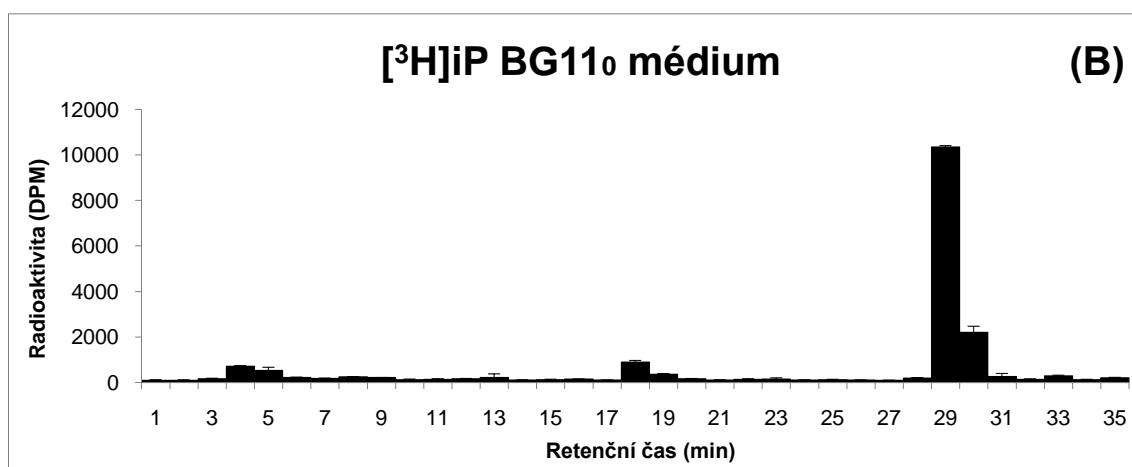
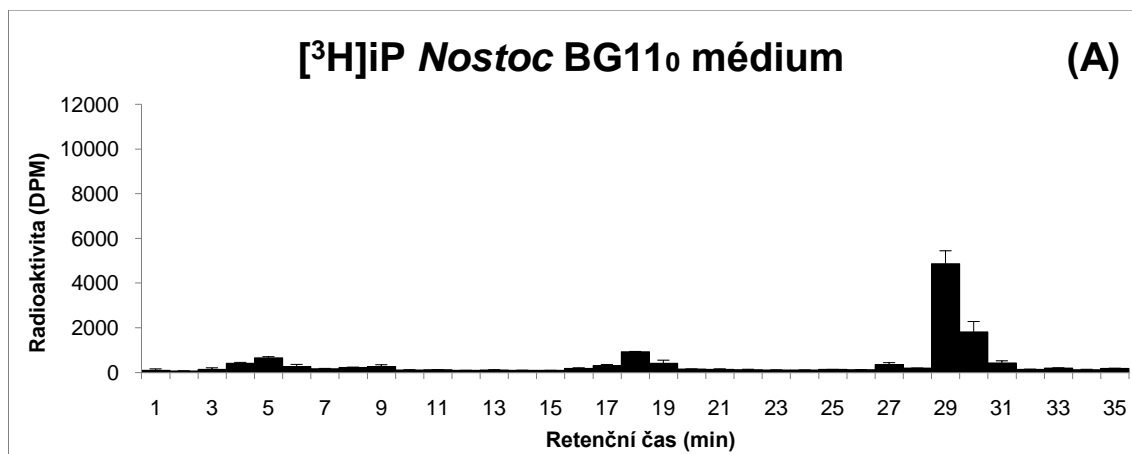
U médií obsahujících [<sup>3</sup>H]BA byla naměřena radioaktivita ve frakcích, které odpovídají sloučenině s retenčním časem přibližně 28 minut a maximem při 269 nm. Jedná se pravděpodobně o BA (Obr. 11, 16, 17).



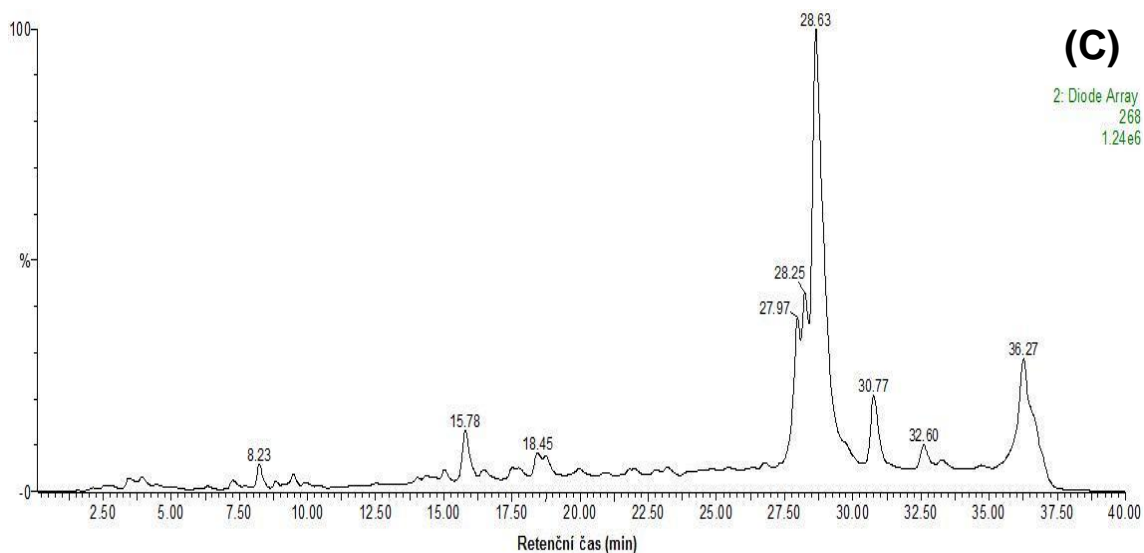
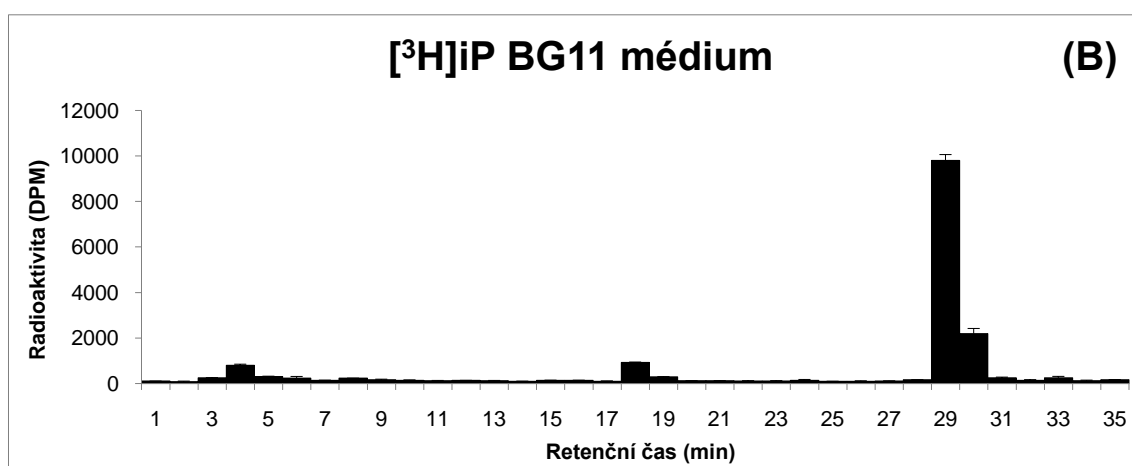
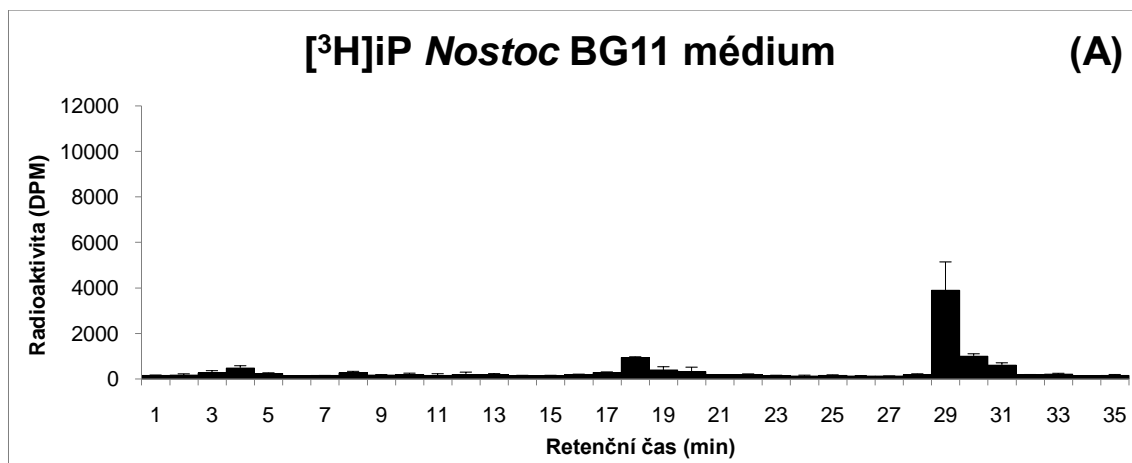
Obrázek 10: Separace standardních sloučenin metabolitů iP. Chromatogram je znázorněn při 268 nm.



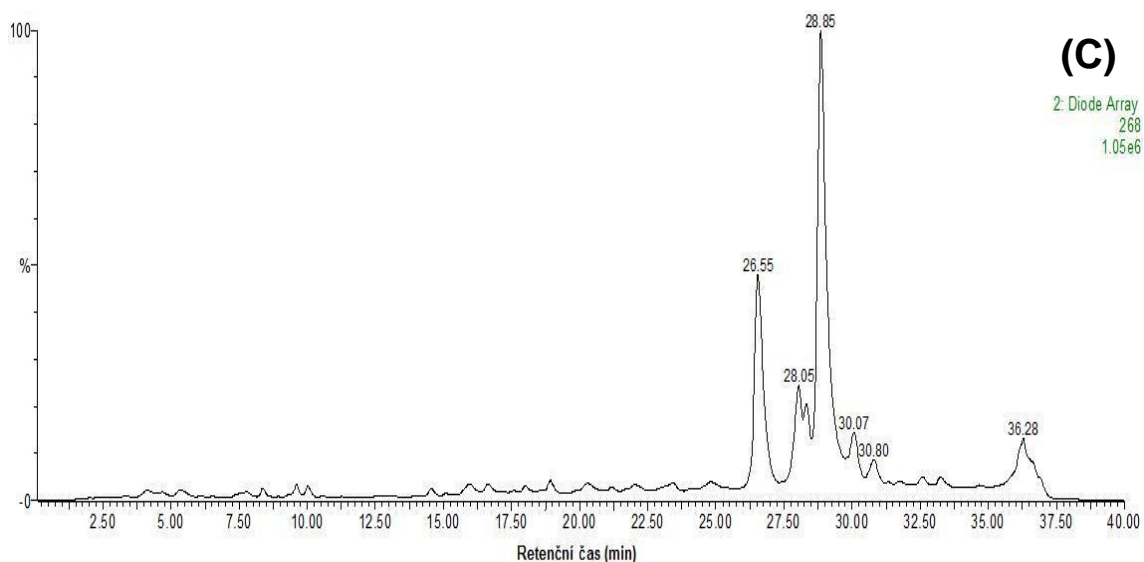
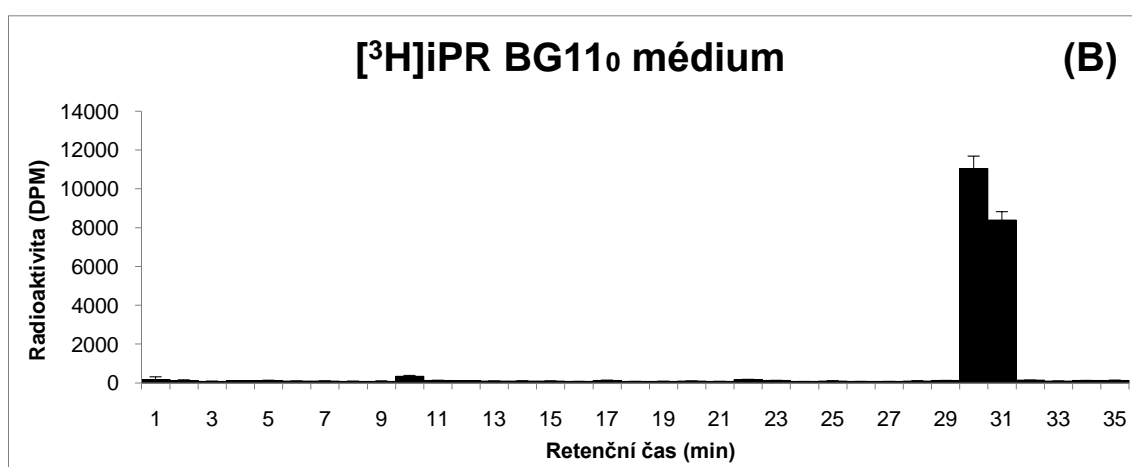
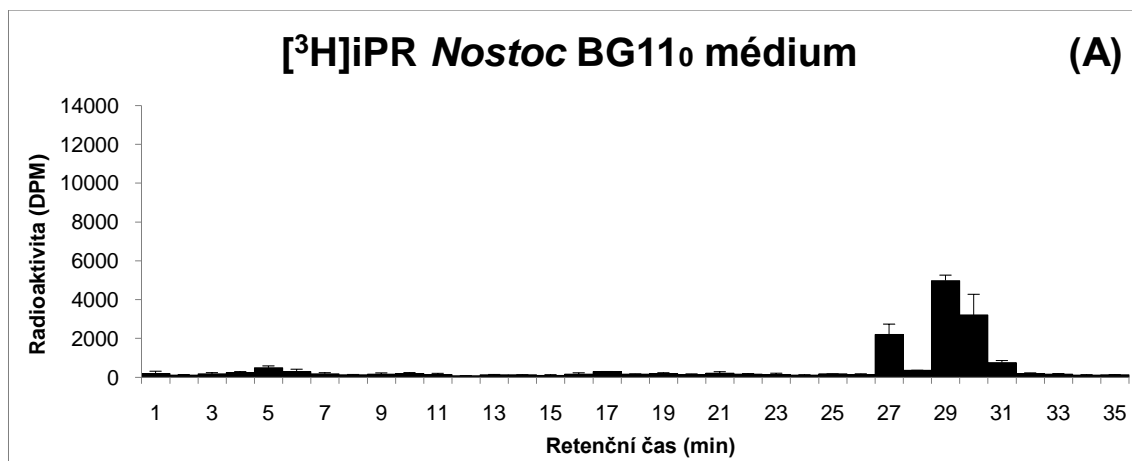
Obrázek 11: Separace standardních sloučenin metabolitů BA. Chromatogram je znázorněn při 268 nm. BA s absorpčním maximem 270 nm opouští kolonu přibližně ve 28. minutě.



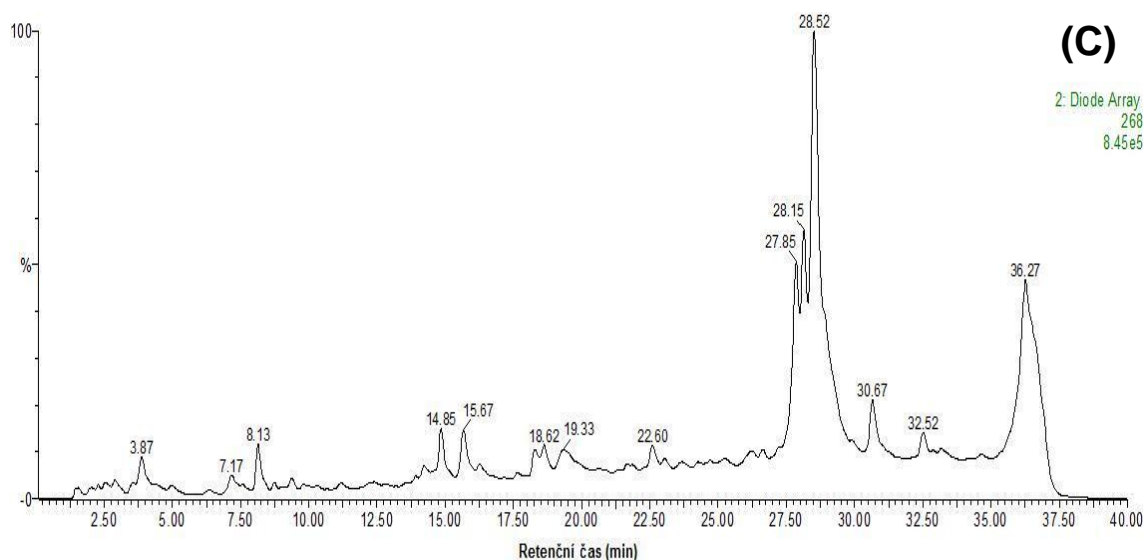
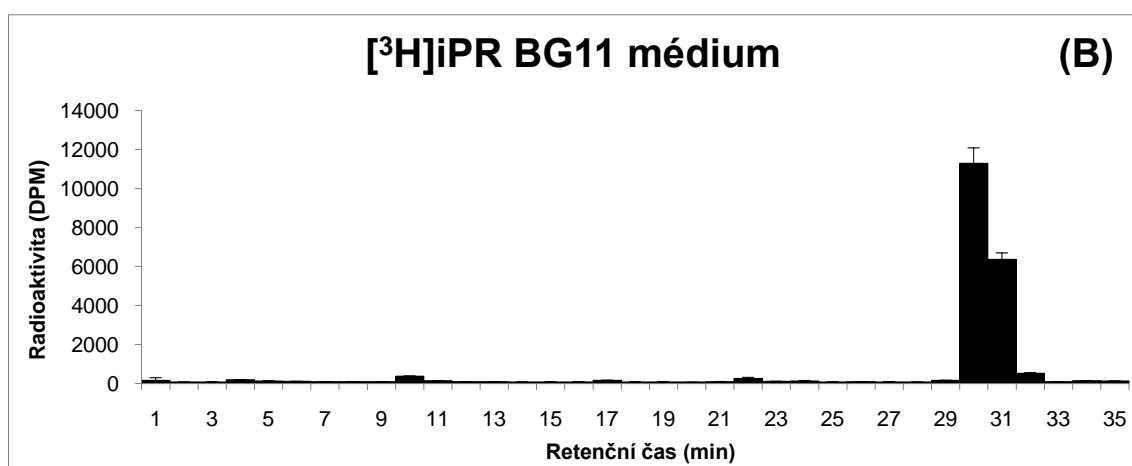
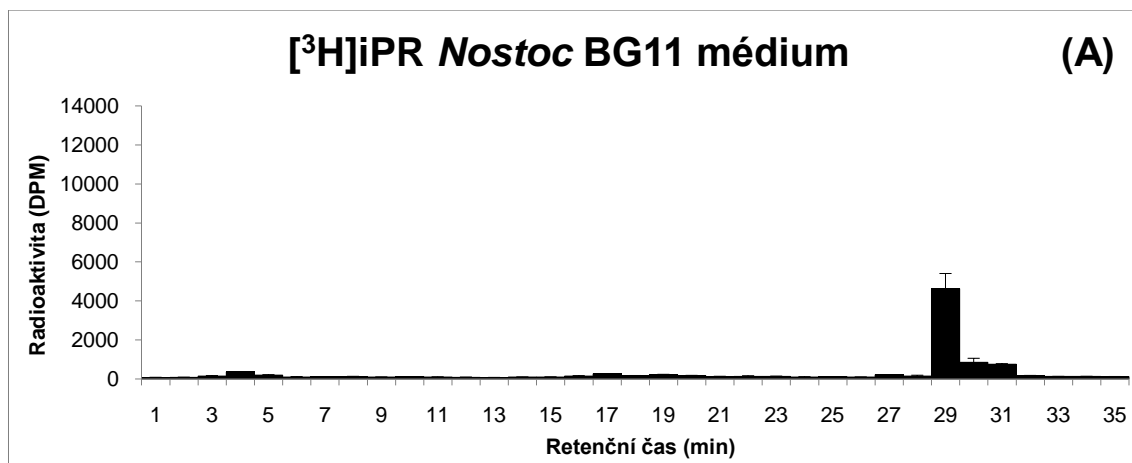
Obrázek 12: Metabolismus iP cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v médiu BG11<sub>0</sub>. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC analýzy média inokulovaného kulturou *Nostoc*. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných analýzou média (<sup>3</sup>H]iP a iP inkubováno bez *Nostoc*). (C) Separace média po kultivaci *Nostoc* v přítomnosti [<sup>3</sup>H]iP. Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.



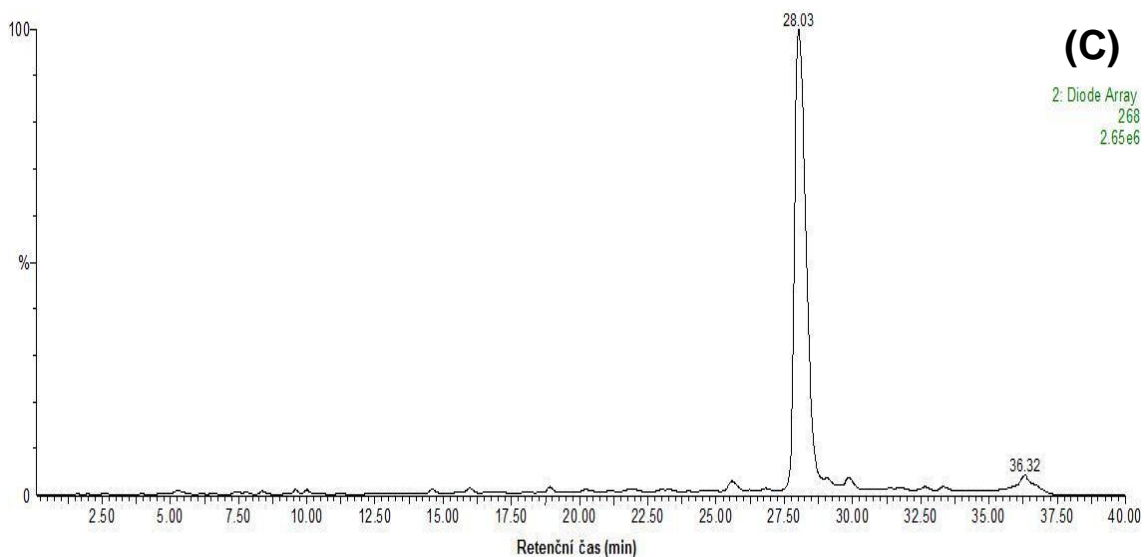
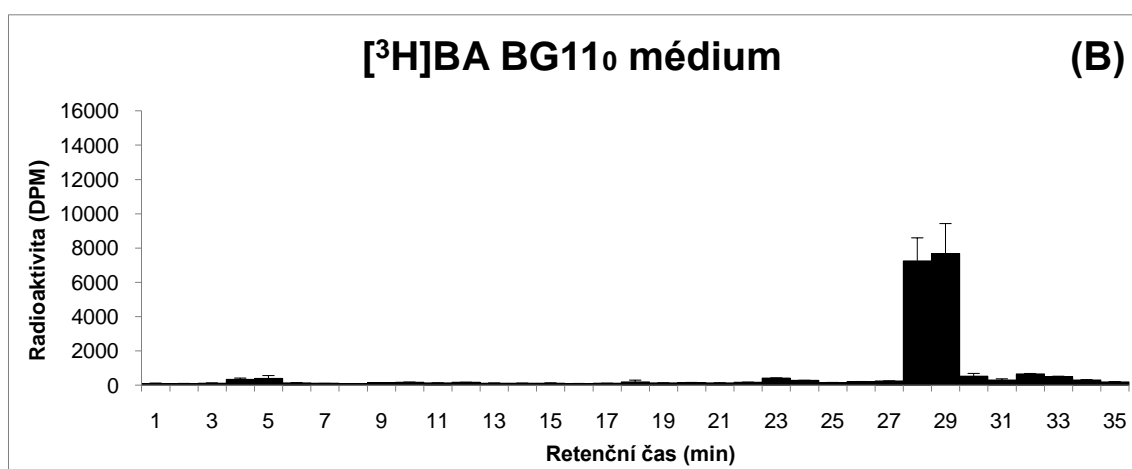
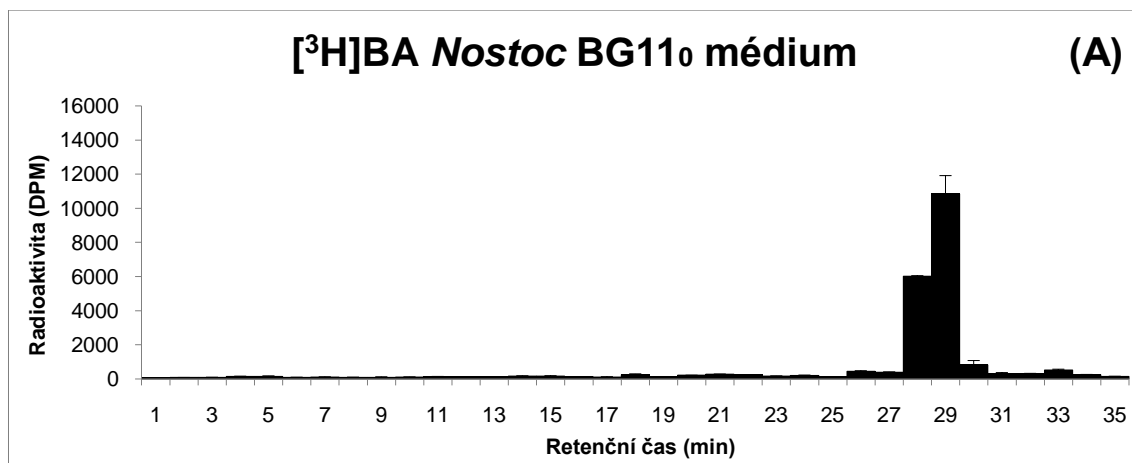
Obrázek 13: Metabolismus iP cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v médiu BG11. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC analýzy média inokulovaného kulturou *Nostoc*. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných analýzou média ([<sup>3</sup>H]iP a iP inkubováno bez *Nostoc*). (C) Separace média po kultivaci *Nostoc* v přítomnosti [<sup>3</sup>H]iP. Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.



Obrázek 14: Metabolismus iPR cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v médiu BG11<sub>o</sub>. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC analýzy média inokulovaného kulturou *Nostoc*. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných analýzou média ([<sup>3</sup>H]iPR a iPR inkubováno bez *Nostoc*). (C) Separace média po kultivaci *Nostoc* v přítomnosti [<sup>3</sup>H]iPR. Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.

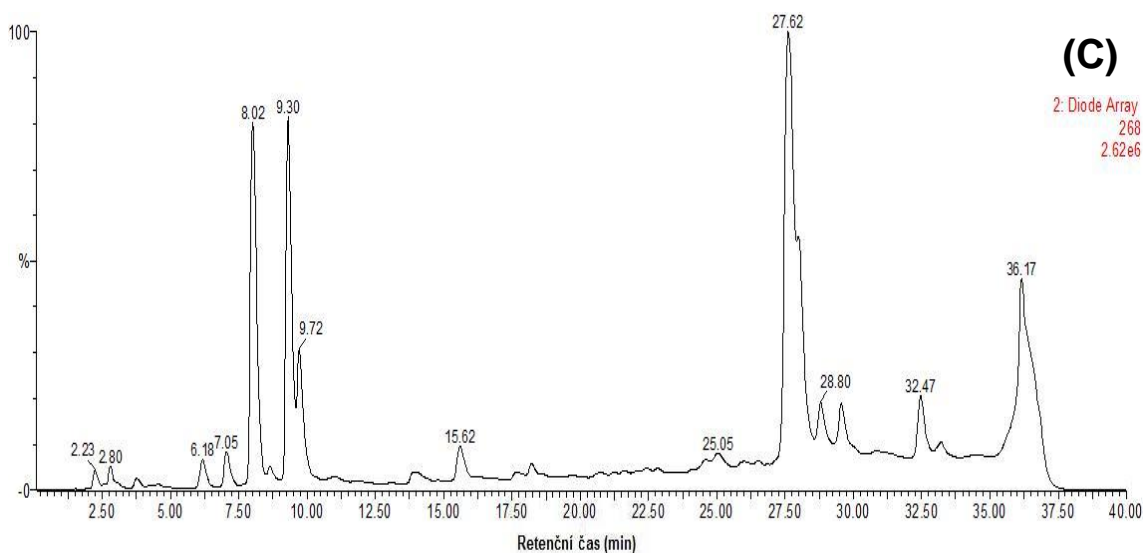
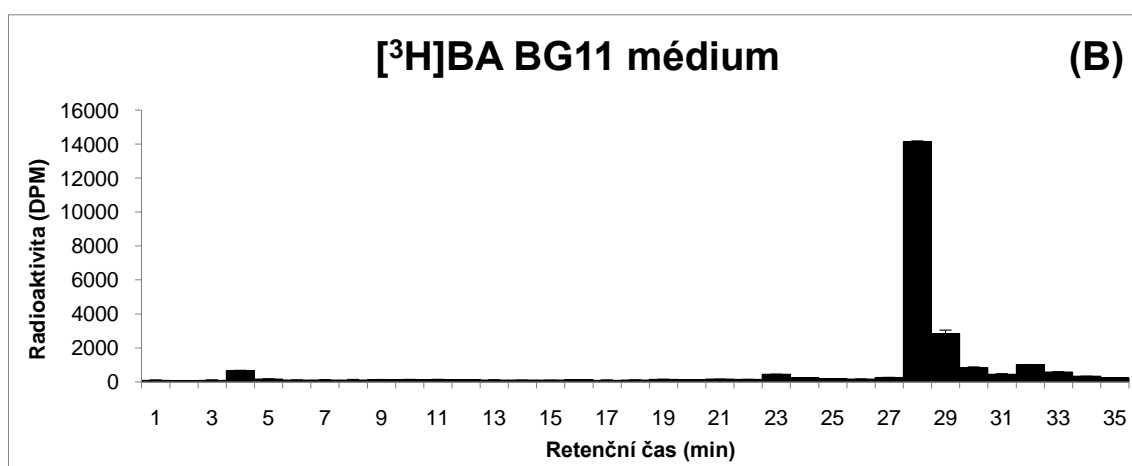
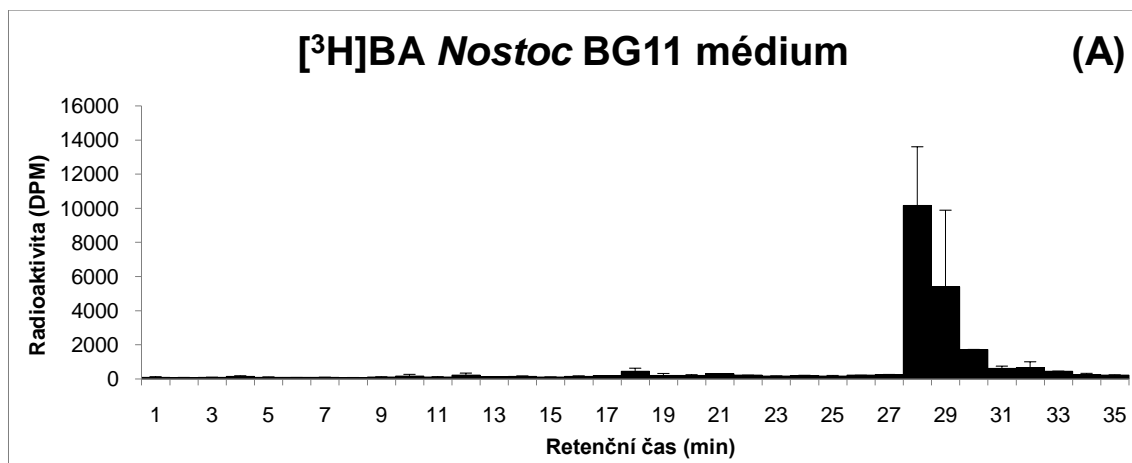


Obrázek 15: Metabolismus iPR cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v médiu BG11. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC analýzy média inokulovaného kulturou *Nostoc*. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných analýzou média (<sup>3</sup>H]iPR a iPR inkubováno bez *Nostoc*). (C) Separace média po kultivaci *Nostoc* v přítomnosti [<sup>3</sup>H]iPR. Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.



Obrázek 16: Metabolismus BA cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v médiu BG11<sub>o</sub>. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC analýzy média inokulovaného kulturou *Nostoc*. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných analýzou média ([<sup>3</sup>H]BA a BA inkubováno bez *Nostoc*). (C) Separace média po kultivaci *Nostoc* v přítomnosti [<sup>3</sup>H]BA. Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.



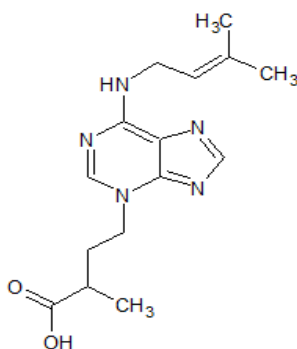


Obrázek 17: Metabolismus BA cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v médiu BG11. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC analýzy média inokulovaného kulturou *Nostoc*. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných analýzou média (<sup>3</sup>H]BA a BA inkubováno bez *Nostoc*. (C) Separace média po kultivaci *Nostoc* v přítomnosti [<sup>3</sup>H]BA. Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.

## 5.4 HPLC/UV analýza metabolismu cytokininů v buňkách *Nostoc*

Pro HPLC analýzu extraktů z buněk bylo použito 80  $\mu$ l přečištěného extraktu. V případě, že cyanobakterie byla kultivována v přítomnosti radioaktivně značené sloučeniny, byly rozdělené frakce sbírány v 1-minutových intervalech a radioaktivita v nich proměřena scintilačním detektorem. Naměřená data byla poté zpracována do podoby grafu. Z grafů lze vyzorovat, že v žádných buňkách nebyl přítomen původní přidaný cytokinin a radioaktivita byla zabudována do jiných metabolitů. Hlavní cílem práce bylo zjistit, zda jsou cytokininy metabolizovány na adenin nebo adenosin. U všech extraktů z buněk byla naměřena nejvyšší radioaktivita ve frakcích, které eluovaly z kolony přibližně mezi třetí a pátou minutou. Jednalo se zřejmě o směs dvou sloučenin s absorpčními maximy 259 a 331 nm (Obr. 19D). Není jisté, zda sloučeninou, která absorbuje při 259 nm, je adenin, protože jeho maximum leží za podmínek separace při vlnové délce 261 nm. Nelze ani s jistotou říci, do které sloučeniny byla radioaktivita zabudována, neboť se jedná o velmi polární látky, které nebylo možné na použité koloně dobře rozdělit.

Cytokininy iP, iPR a BA se v cyanobakterii *Nostoc* PCC 7120 metabolizují na neznámou polárnější sloučeninu s absorpčním maximem 331 nm, jejíž identita bude v dalších experimentech zkoumána. Anjard & Loomis (2008) popsali, že cytokinin iP se u prvoka *Dictyostelium discoideum* přeměňuje na diskadenin (Obr. 18). Jedná se o derivát iP, u něhož byla biotestem detekována cytokininová aktivita. U tohoto prvoka vyvolává rychlý proces sporulace a působí jako inhibitor klíčení.



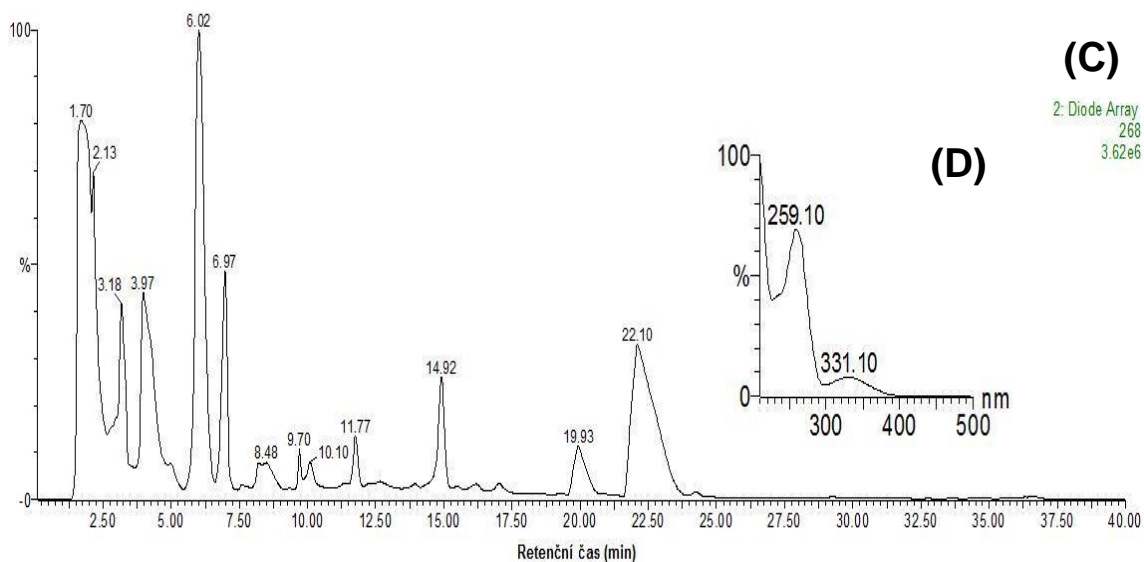
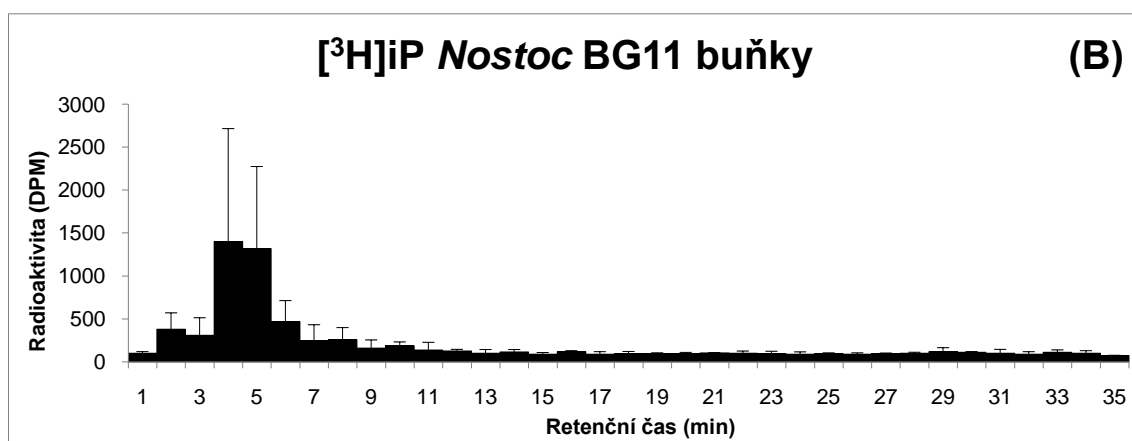
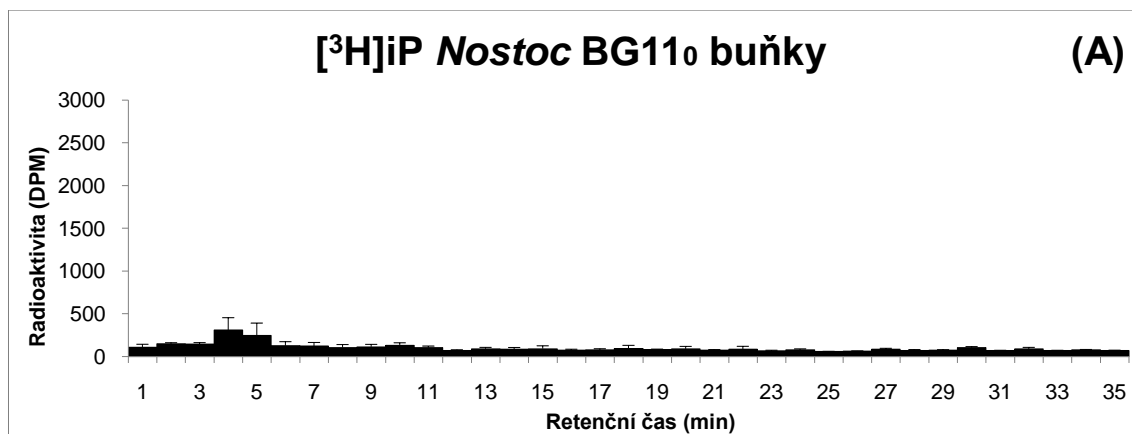
Obrázek 18: Diskadenin

V extraktech z buněk, do kterých vstoupil [ $^3$ H]BA, byla radioaktivita zvýšena také ve sbíraných frakcích mezi šestou a sedmou minutou (Obr. 21A, 21B). V odpovídajícím píku s retenčním časem 5,9 minut (Obr. 21C) byla detekována směs blíže

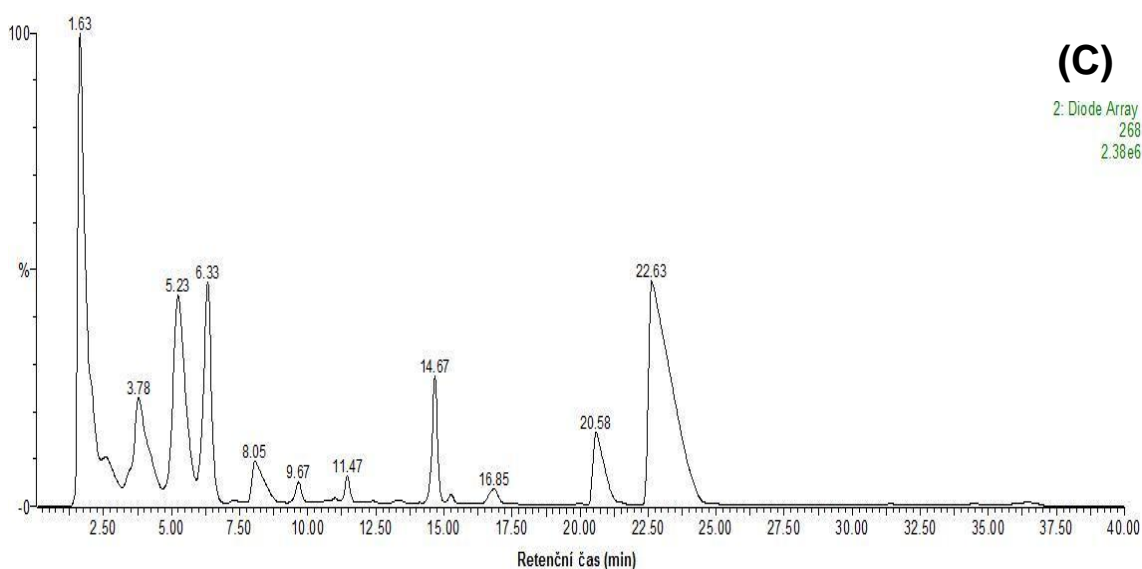
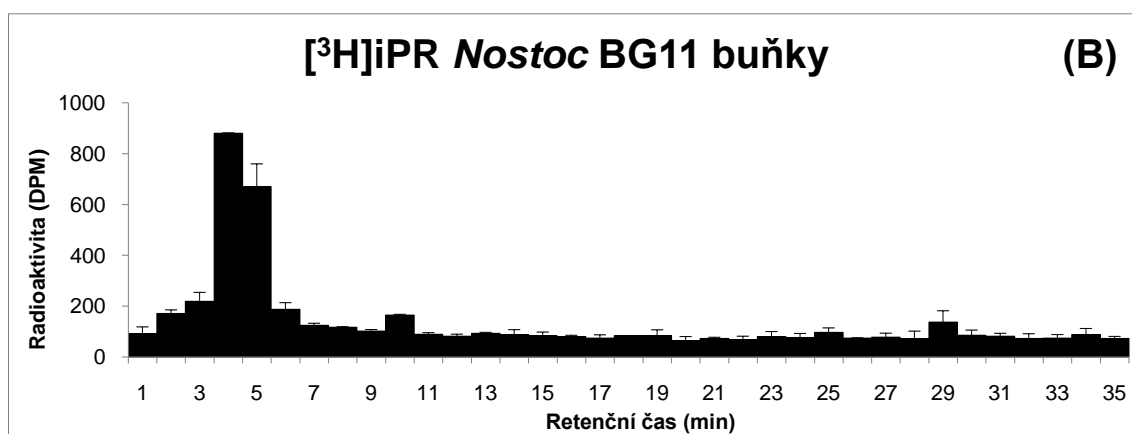
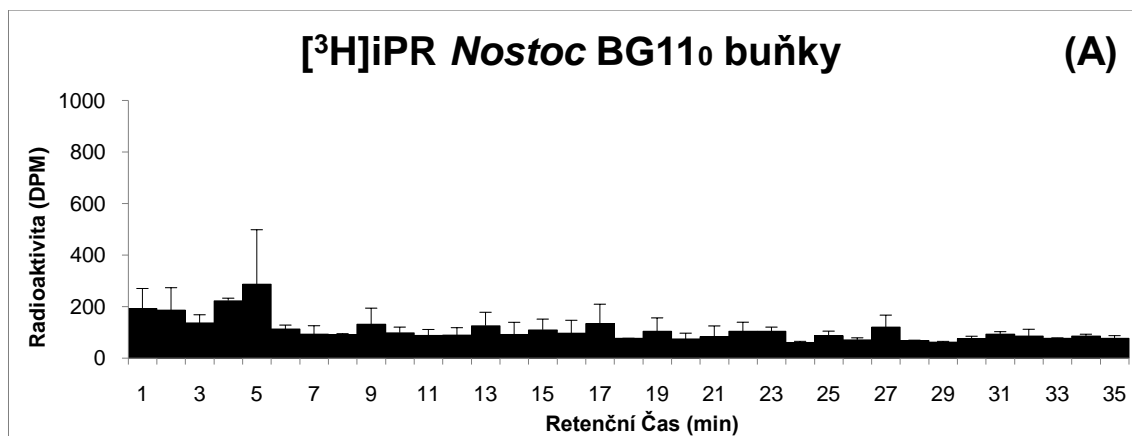
nespecifikovaných sloučenin s absorpčními maximy 234, 277 a 340 nm (data zde nejsou uvedena).

Ve srovnání s médiem, kde byly ve sbíraných frakcích změřeny srovnatelné hodnoty radioaktivit u duplicitních vzorků. U extraktů buněk byly hodnoty radioaktivit velmi různé. Jedním z důvodů může být nejednotný počet extrahovaných buněk a rozdělení značených sloučenin do dvou po sobě následujících frakcí v důsledku nestability retenčních časů polárnějších sloučenin.

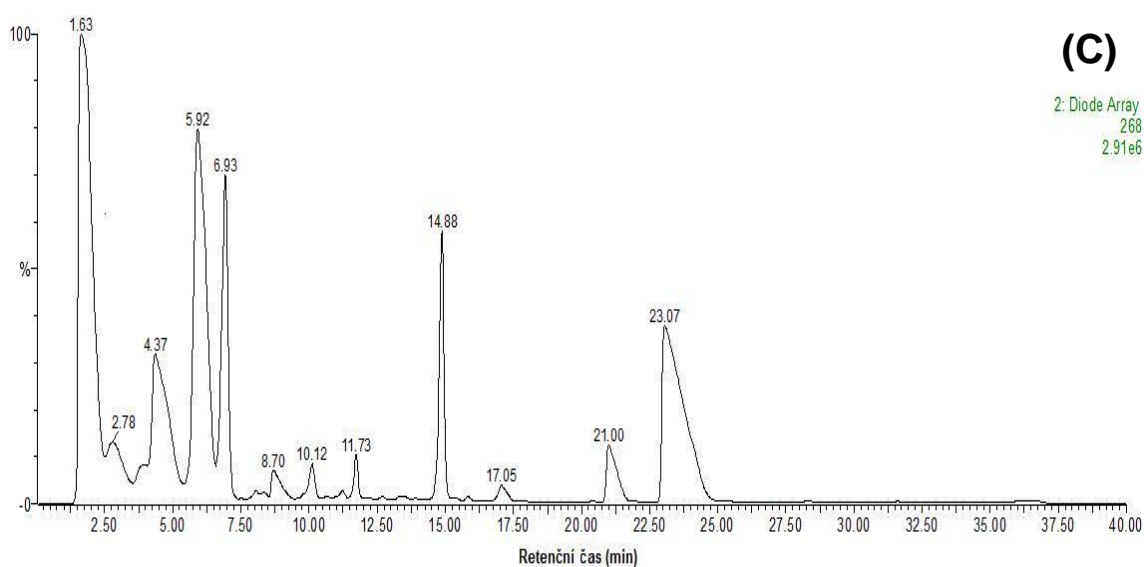
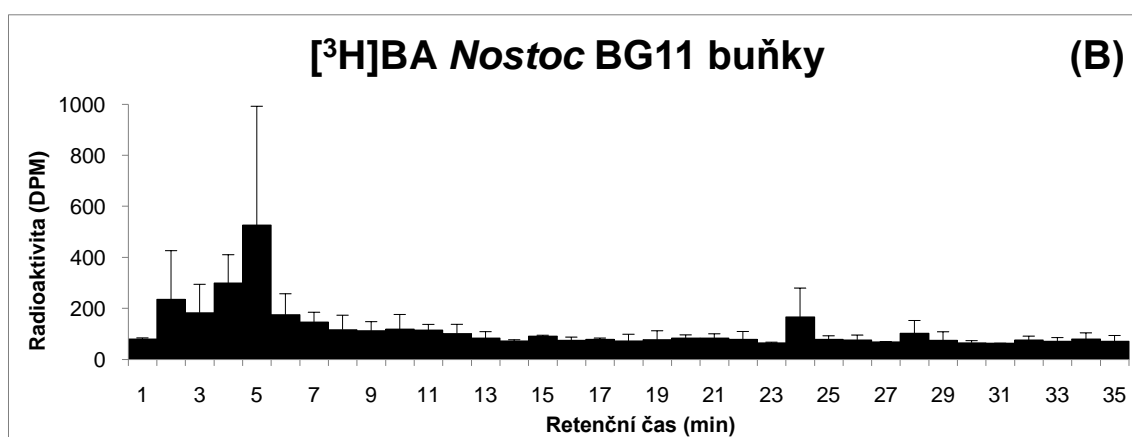
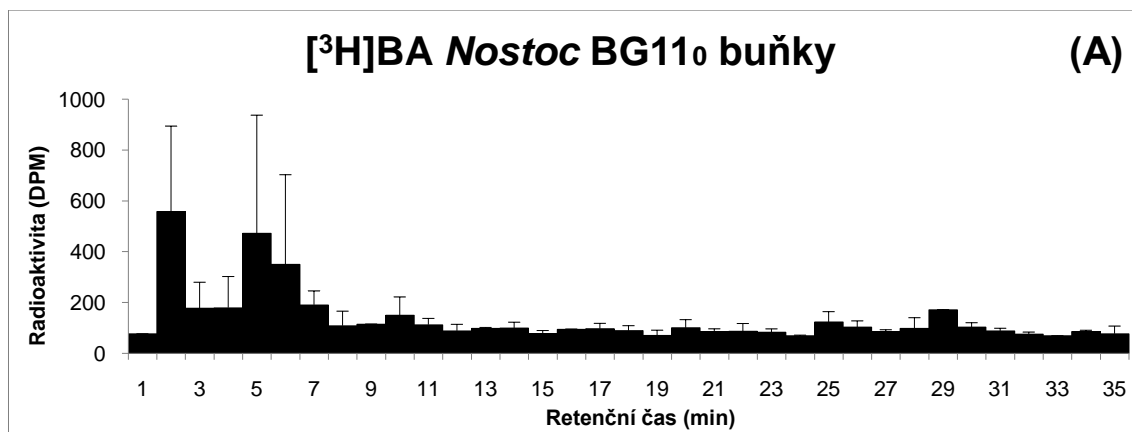
Byla také provedena kultivace *Nostoc* bez přítomnosti exogenních cytokininů. Vzorky média a extraktů z buněk byly po přečištění SPE separovány HPLC/UV metodou. V chromatogramech extraktů buněk byly znázorněny obdobné sloučeniny jako u ostatních vzorků. U vzorků média nebyly pozorovány sloučeniny s retenčními časy, které se nacházely u vzorků médiích kultivovaných v přítomnosti cytokininů (data nejsou znázorněna).



Obr. 19: Metabolismus iP cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v buňkách. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC separace extraktů z buněk kultivovaných v BG11<sub>0</sub> médiu. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných separací extraktů z buněk kultivovaných v BG11 médiu. (C) Separace extraktů buněk *Nostoc* po kultivaci v médiu BG11<sub>0</sub> v přítomnosti [<sup>3</sup>H]iP. (D) Spektrum celého píku s retenčním časem 3,97 minut. Chromatografická data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.



Obr. 20: Metabolismus iPR cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v buňkách. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC separace extraktů z buněk kultivovaných v BG11<sub>0</sub> médiu. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných separací extraktů z buněk kultivovaných v BG11 médiu. (C) Separace extraktů buněk *Nostoc* po kultivaci v médiu BG11<sub>0</sub> v přítomnosti [<sup>3</sup>H]iPR. Chromatografická data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.



Obr. 21: Metabolismus BA cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120 v buňkách. (A) Radioaktivita v jednotlivých frakcích během HPLC separace extraktů z buněk kultivovaných v BG11<sub>0</sub> médiu. (B) Radioaktivita ve frakcích získaných separací extraktů z buněk kultivovaných v BG11 médiu. (C) Separace extraktů buněk *Nostoc* po kultivaci v médiu BG11<sub>0</sub> v přítomnosti [<sup>3</sup>H]BA. Chromatografická data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm.

## 6 Závěr

V úvodu teoretické části bakalářské práce bylo pojednáno o charakteristických vlastnostech cyanobakterií s popisem jejich významu pro rostliny. Navazující kapitola byla věnována typickým rostlinným hormonům, především cytokininům a jejich metabolismu, se zaměřením na cyanobakterie. Závěr patřil problematice v níž byly diskutovány cyanobakterie jako předchůdci rostlinných chloroplastů. V této souvislosti pak byly zmíněny hypotézy o endosymbióze cyanobakterií. Také byl popsán transport genů cyanobakterií do jaderného genomu rostlin a mechanismus importu proteinů, kódovaných těmito geny, zpět do chloroplastu.

V praktické části byl studován metabolismus cytokininů při kultivaci cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 v přítomnosti třemi značených a neznačených cytokininů isopentenyladeninu, isopentenyladenin ribosidu a benzyladeninu. Při přečištění cytokininových metabolitů z kultivačního média extrakcí na pevné fázi pouze malá část značených metabolitů prošla sorbentem popřípadě z něj nebyla vylučována, avšak u extraktů z buněk nebyla výtěžnost při SPE příliš vysoká. Přečištěné vzorky byly separovány metodou HPLC/UV a sesbírané frakce byly následně analyzovány pomocí scintilačního detektoru. Ve všech médiích byl zjištěn původní cytokinin v menším množství než před kultivací, iPR dokonce zcela zmetabolizoval na iP. Lze předpokládat, že značené cytokininy pravděpodobně vstoupily do buněk, ve kterých ale jejich množství nebylo možné stanovit. Na základě získaných výsledků je možno poukázat na skutečnost, že mezi pravděpodobné metabolity cytokininů výše uvedených buněk může být zřejmě zařazen adenin a jiná, zatím neznámá sloučenina koelující s adeninem. Cytokininy jsou také nejspíš metabolizovány na sloučeniny, které jsou výrazně polárnější než cytokininy.

V dalších experimentech budou metabolity cytokininů separovány na vhodnější koloně a identifikovány pomocí hmotnostního spektrometru.

## 7 Seznam použitých zkratek

iP	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
iPR	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin ribosid
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
ZR	zeatin ribosid
BA	benzyladenin
ZOG	zeatin- <i>O</i> -glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DMAPP	dimethylallyldifosfát
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
ATP (ADP, AMP)	adenosin tri (di, mono)fosfát
IPT	adenylátdimethylallyltransferasa
tRNA-IPT	tRNA-dimethylallyltransferasa
CKX	cytokinindehydrogenasa
ZmCKX1	cytokinindehydrogenasa <i>Zea mays</i> (kukuřice)
AtCKX7	cytokinindehydrogenasa <i>Arabidopsis thaliana</i>
FAD	flavinadenindinukleotid
cICBP	chloroplastické proteiny vázající cytokininy
IAA	kyselina indol-3-octová
ABA	kyselina abscisová
TOC	translokátor vnější membrány chloroplastu
TIC	translokátor vnitřní membrány chloroplastu
Hsp	protein tepelného šoku
GTP	guanosintrifosfát
SPE	extrakce na pevné fázi
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
DPM	počet rozpadů za minutu
[ <sup>3</sup> H]iP	tritiem značený $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
[ <sup>3</sup> H]iPR	tritiem značený $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin ribosid
[ <sup>3</sup> H]BA	tritiem značený benzyladenin



## 8 Literatura:

Andrès C., Agne B., Kessler F. (2010) The TOC complex: Preprotein gateway to the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1803**, 715-723.

Anjard C., Loomis W. F. (2008) Cytokinins induce sporulation in *Dictyostelium*. *Development* **135**, 819-827.

Auer C. A. (1997) Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. *Plant Growth Regul.* **23**, 17-32.

Bajguz A., Piotrowska A. (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.

Bashan Y., Holguin G. (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* **43**, 103-121.

Bergman B., Zheng W. W., Klint J., Ran L. (2008) On the origin of plants and relations to contemporary cyanobacterial-plant symbioses. *Plant Biotechnol. J.* **25**, 213-220.

Bölter B., Soll J., Schulz A., Hinnah S., Wagner R. (1998) Origin of a chloroplast protein importer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15831-15836.

Campbell N. A., Reece J. B. (2005) Biology, 7th edition, pp. 110, 182-183, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.

Cavalier-Smith T. (1982) The origins of plastids. *Biol. J. Linnean Soc.* **17**, 289-306.

Cavalier-Smith T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* **5**, 174-182.

Deschamps P., Colleoni C., Nakamura Y., Suzuki E., Putaux J. L., Buléon A., Haebel S., Ritte G., Steup M., Falcón L. I., Moreira D., Löffelhardt W., Raj J. N., Plancke C., d'Hulst C., Dauvillée D., Ball S. (2008) Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 536-548.

Deusch O., Landan G., Roettger M., Gruenheit N., Kowallik K. V., Allen J. F., Martin W., Dagan T. (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 748-761.

Flores E., Herrero A. (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 39-50.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.*, v tisku, doi: 10.1093/jxb/err004.

Gupta A. B., Gupta K. K. (1973) Effect of Phormidium extract on growth and yield of *Vigna-Catjang* (cowpea) T-5269. *Hydrobiologia* **41**, 127-132.

Hartung W. (2010) The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Funct. Plant Biol.* **37**, 806-812.

Howe C. J., Barbrook A. C., Nisbet R. E. R., Lockhart P. J., Larkum A. W. D. (2008) The origin of plastids. *Philos. Trans R. Soc. B-Biol. Sci.* **363**, 2675-2685.

Huang C. Y. (1991) Regulation of ionic fluxes and protein-release from *Anabaena* HA101 by exogenous abscisic-acid. *Bot. Bull. Academia Sinica* **32**, 265-270.

Huang T. C., Chow T. J. (1984) Ethylene production by blue-green-algae. *Bot. Bull. Academia Sinica* **25**, 81-86.

Hussain A., Hasnain S. (2011) Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *J. Ind. Mikrobiol. Biotechnol.* **38**, 85-92.

Hussain A., Krischke M., Roitsch T., Hasnain S. (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* **61**, 361-369.

Jürgens U. J., Weckesser J. (1985) Carotenoid-containing outer-membrane of *Synechocystis* sp. strain PCC6714. *J. Bacteriol.* **164**, 384-389.

Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* **116**, 233-239.

Kalina T., Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, pp. 41, 60-73, Karolinum, Praha, ČR.

Kapoor K., Sharma V. K. (1981) Effect of growth-promoting chemicals on growth, nitrogen fixation and heterocyst frequency of a blue-green alga. *Z. Allg. Mikrobiol.* **21**, 305-311.

Keegstra K., Werner-Washburne M., Cline K., Andrews J. (1984) The chloroplast envelope – is it homologous with the double membranes of mitochondria and gram-negative bacteria? *J. Cell. Biochem.* **24**, 55-68.

Knoll A. H. (2008) Cyanobacteria and earth history. In *The cyanobacteria: Molecular biology, Genomics and Evolution* (Herrero & Flores, eds.), pp. 2, Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Kulaeva O. N., Karavaiko N. N., Selivankina S. Y., Kusnetsov V. V., Zemlyachenko Y. V., Cherepneva G. N., Maslova G. G., Lukevich T. V., Smith A. R., Hall M. A. (2000) Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcription regulation. *Plant Growth Regul.* **32**, 329-335.

Larkum A. W. D., Lockhart P. J., Howe C. J. (2007) Shopping for plastids. *Trends Plant Sci.* **12**, 189-195.

Leveau J. H., Gerards S. (2008) Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**, 238-250.

Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. (2009) Brock Biology of Microorganisms, 12th edition, pp. 463-466, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.

Malito E., Coda A., Bilyeu K. D., Fraaije M. W., Mattevi A. (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: Implications for flavoenzyme catalysis. *J. Mol. Biol.* **341**, 1237–1249.

Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., Penny D. (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial,

and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12246-12251.

Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowská D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16598–16603.

Moslavac S., Bredemeier R., Mirus O., Granvogl B., Eichacker L. A., Schleiff E. (2005) Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Proteome Res.* **4**, 1330-1338.

Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležel K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **480**, 207-218.

Nozaki H., Iseki M., Hasegawa M., Misawa K., Nakada T., Sasaki N., Watanabe M. (2007) Phylogeny of primary photosynthetic eukaryotes as deduced from slowly evolving nuclear genes. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1592–1595.

Osman M. E. H., El-Sheekh M. M., El-Naggar A. H., Gheda S. F. (2010) Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biol. Fert. Soils* **46**, 861-875.

Pan X. J., Chang F. Y., Kang L. J., Liu Y. D., Li G. B., Li D. H. (2008) Effects of gibberellin A(3) on growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* (cyanophyta). *J. Plant Physiol.* **165**, 1691-1697.

Reumann S., Davila-Aponte J., Keegstra K. (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: Identification of a cyanobacterial homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 784-789.

Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431-449.

Selivankina S. Y., Zubkova N. K., Kupriyanova E. V., Lyukevich T. V., Kusnetsov V. V., Los D. A., Kulaeva O. N. (2006) Cyanobacteria respond to cytokinin. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 751-755.

Sergeeva E., Liaimer A., Bergman B. (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* **215**, 229-238.

Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Manns I. B. Y. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241–252.

Simon S., Petrášek J. (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci.* **180**, 454-460.

Smékalová V. (2008) Klonování a exprese genu cytokinindehydrogenasy ze sinice *Nostoc* 7120. Bakalářská práce, UP Olomouc, ČR.

Smékalová V. (2010) Studium hypotetické cytokinindehydrogenasy bakterie *Nostoc* 7120. Diplomová práce, UP Olomouc, ČR.

Smith R. J., Hobson S., Ellis I. R. (1987) The effect of abscisic-acid on calcium-mediated regulation of heterocyst frequency and nitrogenase activity in *Nostoc* 6720. *New Phytol.* **105**, 543-549.

Soll J., Schleiff E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 198-208.

Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425-448.

Stiller J. W. (2007) Plastid endosymbiosis, genome evolution and the origin of green plants. *Trends Plant Sci.* **12**, 391–396.

Stirk W. A., Ördög V., van Staden J. (1999) Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthonema africanum* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **35**, 89-92.

Stirk W. A., Ördög V., van Staden J., Jäger K. (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* **14**, 215-221.

Stirk W. A., van Staden J. (2010) Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regul.* **62**, 101-116.

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. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866–41872.

Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol. Plant.* **117**, 579-590.

Tsavkelova E. A., Klimova S. Yu., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2006) Microbial producers of plant growth Stimulators and their practical use: A review. *Appl. Biochem. Mikrobiol.* **42**, 117-126.

Weber A. P. M., Linka M., Bhattacharya D. (2006) Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in Plantae from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryot. Cell* **5**, 609-612.

Zhaxybayeva O., Gogarten J. P., Charlebois R. L., Doolittle W. F., Papke R. T. (2006) Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res.* **16**, 1099-1108.