

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Selekce a fenotypizace homozygotních linií *Arabidopsis thaliana* s pozměněnými hladinami nukleotidpyrofosfatas

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Michaela Baková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Hluska
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s uvedením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena 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

.....

Děkuji svému školiteli Mgr. Tomáši Hluskovi, za jeho čas, odborné vedení, cenné rady a připomínky, trpělivost a pomoc, které mi poskytl během zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph. D. ze odborné rady a konzultace, Mgr. Janě Dobruškové za odborné rady při práci na kořenových testech, Zuzaně Barbuščákové za optimalizaci podmínek pro PCR a za pomoc při selekci homozygotních linií FLAG a GK. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem zaměstnancům Oddělení molekulární biologie za ochotu kdykoliv poradit a pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Baková
Název práce	Selekce a fenotypizace homozygotních linií <i>Arabidopsis thaliana</i> s pozměněnými hladinami nukleotidpyrofosfatas
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Hluska
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které řídí celou řadu růstových a vývojových procesů. Existují dvě dráhy popisující biosyntézu cytokininů. První, přímou drahou vznikají isopentenyladenin a *trans*-zeatin. Druhou, nepřímou drahou vzniká *cis*-zeatin degradací tRNA. Předpokládalo se, že *trans*-zeatin může vznikat isomerací *cis*-zeatinu pomocí hypotetické zeatin *cis-trans*-isomerasy. Enzym byl ale znovu purifikován a identifikován jako nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesterasa.

Arabidopsis thaliana obsahuje 4 homology nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesteras. Cílem této diplomové práce bylo vyizolovat homozygotní linie s umlčenými geny rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí metody PCR. Aktivita enzymu byla změřena v semenáčcích a šesulích homozygotních rostlin metodou HPLC. Dále byla změřena hladina celkových cytokininů v overexpresorech.

Klíčová slova	Cytokininy, biosyntéza cytokininů, zeatin <i>cis-trans</i> isomerasa, nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesterasa
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Michaela Baková
Title	Selection and phenotyping of homozygous lines of <i>Arabidopsis</i> with altered expression of nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Tomáš Hluska
The year of presentation	2015

Abstract

Cytokinins are plant hormones essential for plant growth and development. There are two pathways described for biosynthesis of cytokinins. The first is the direct pathway, leading to isopentenyladenine and *trans*-zeatin. The second pathway is the indirect pathway, in which cytokinins are released by hydrolysis from tRNA containing *cis*-zeatin. Isomeration of *cis*-zeatin to *trans*-zeatin by hypothetical zeatin *cis-trans* isomerase is another possible source of *trans*-zeatin. Recently, the enzyme was purified and annotated as nucleotidpyrophosphatase/phosphodiesterase.

Arabidopsis thaliana contains 4 nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase homologs. The aim of this diploma thesis was to isolate the homologous lines of *Arabidopsis thaliana* using PCR. The activity of the enzyme was measured using the HPLC method in seedlings and siliques. Further, levels of cytokinins were measured.

Keywords	Cytokinins, biosynthesis of cytokinins, zeatin <i>cis-trans</i> isomerase, nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Cíle práce	8
2	Úvod.....	9
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1	Cytokininy	10
3.1.1	Struktura.....	10
3.1.2	Biosyntéza.....	11
3.1.3	Metabolismus	16
3.1.4	Degradace.....	16
3.2	Nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy	19
3.2.1	Struktura NPP	21
3.2.2	Charakteristika jednotlivých homologů	22
3.2.3	Rostlinné nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Materiál a chemikálie	29
4.2	Seznam použitých pufrů a roztoků	30
4.3	Přístroje	31
4.4	Metody.....	31
4.4.1	Genotypizace.....	31
4.4.2	Analýza celkových cytokininů.....	35
4.4.3	Měření aktivity enzymu	37
4.4.4	HPLC	38
4.4.5	Měření koncentrace proteinů.....	38
4.4.6	Kořenové testy	39
4.4.7	Testy klíčivosti	39
5	Výsledky	40
5.1	Genotypizace	40
5.2	Stanovení celkových cytokininů	42
5.3	Aktivita enzymu	44
5.4	Kořenové testy.....	47
5.5	Test klíčivosti	49
6	Diskuze	50

7	Závěr	52
8	Literatura.....	53
9	Seznam použitých zkratek	59

1 Cíle práce

Teoretická část:

Vypracovat literární rešerši na téma cytokininy.

Vypracovat literární rešerši na téma nukleotid pyrofosfatasy/fosfodiesterasy.

Praktická část:

Vyselektovat homozygotní linie *Arabidopsis thaliana*.

Pozorovat fenotyp vybraných linií.

Proměřit aktivitu zeatin *cis-trans* isomerasy, nukleotid pyrofosfatasy a množství cytokininů v jednotlivých liniích.

2 Úvod

Rostlinné hormony, tzv. fytohormony, jsou látky, jež regulují růst rostliny již při velmi nízkých koncentracích. Jsou to přirozeně se vyskytující látky, jež se ve většině případů mohou volně pohybovat po těle rostliny a vázat se na specifický receptor (Frébort *et al.*, 2011).

Vůbec prvním důkazem existence těchto sloučenin byl experiment F. Wenta, jenž dokázal přítomnost látky, která podporuje růst rostlinných pletiv (Went, 1928). Později byla tato látka identifikována jako kyselina indol-3-máselná (Kögl a Kostermans, 1934).

Mezi zástupce fytohormonů řadíme auxiny, cytokininy, gibberliny, ethylen, kyselinu abscisovou, polyaminy, brasinosteroidy, jasmonáty, kyselinu salicylovou a strigolaktony.

Cytokininy patří mezi jedny z nejlépe charakterizovaných skupin fytohormonů. Ačkoli jsou jejich biosyntéza a metabolismus intenzivně studovány, stále existují některé neobjasněné procesy. Příkladem je isomerace *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin za pomoci zeatin *cis-trans*-isomerasy. Tento enzym byl purifikován již v roce 1993 (Bassil *et al.*, 1993), avšak dále již nebyl charakterizován. Enzym byl znovu vyizolován a purifikován mým školitelem. Na základě analýzy na hmotnostním spektrometru byl enzym anotován jako nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa (Hluska, nepublikováno). Pro ověření byl gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu naklonován do vektoru pro expresi v rostlinách a následně byl exprimován v kořenech rajčete. V hrubém extraktu byly měřeny enzymové aktivity, čímž se potvrdila jeho NPP aktivita (Baková, 2013).

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou rostlinné hormony, které se uplatňují v celé řadě růstových a vývojových procesů u rostlin. Jelikož jsou tyto sloučeniny schopny stimulovat buněčné dělení – cytokinezi, získaly název cytokininy. První cytokinin, kinetin, byl objeven roku 1955 F. Skoogem a C. Millerem v autoklávovaném spermatu sled'ů (Miller *et al.*, 1955). Prvním objeveným přirozeně se vyskytujícím cytokininem byl zeatin. Název získal z latinského názvu kukuřice (*Zea mays* L.), v níž byl objeven (Letham *et al.*, 1963).

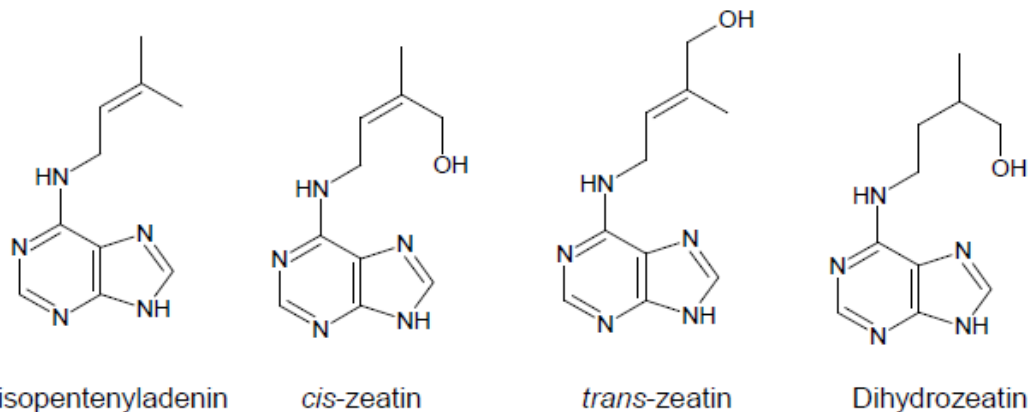
Kromě stimulace buněčného dělení se cytokininy uplatňují i při jejich diferenciaci, při klíčení semen, při růstu a regeneraci rostlinných orgánů, ovlivňují apikální dominanci, regulují senescenci (Mok *et al.*, 2000). Většina těchto funkcí ale souvisí na spolupráci s dalšími rostlinnými hormony, zejména s auxiny.

3.1.1 Struktura

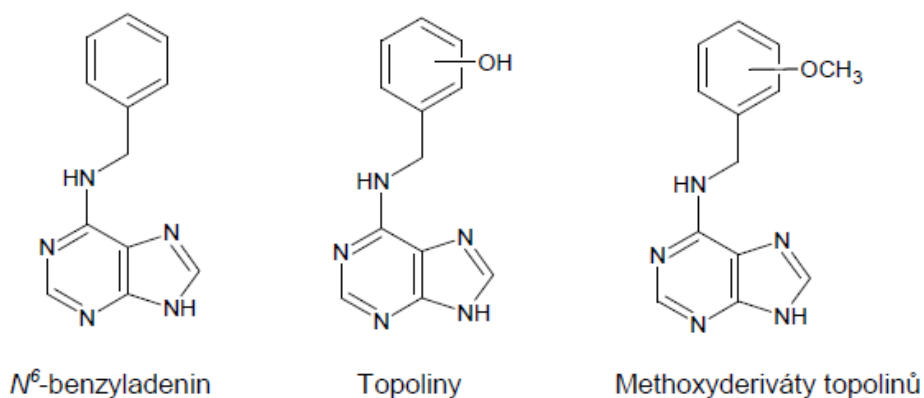
Po chemické stránce jsou cytokininy N^6 -substituované deriváty adeninu, které se dělí podle struktury postranního řetězce na isoprenoidní a aromatické. Mohou se objevovat v mnoha metabolických formách, např. jako volné báze, ribosidy, nukleotidy a N^3 -, N^7 -, N^9 - nebo *O*-glukosidy (Kakimoto, 2003).

Isoprenoidní cytokininy se v přírodě vyskytují častěji. Řadí se zde N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ), dihydrozeatin (DZ; Obr. 1) a jejich deriváty. Po dlouhou dobu byly iP a tZ považovány za hlavní CK v rostlinách, především díky častému výskytu a vysoké aktivitě v používaných testech, zatímco cZ byl považován za neaktivní formu. Po analýze mnoha rostlinných druhů bylo ale zjištěno, že cZ a jeho deriváty se v rostlinách vyskytují hojně, u některých rostlin představovaly dokonce více než 50 % z celkového množství CK (Gajdošová *et al.*, 2011). Vysoký obsah cZ byl zjištěn např. u bramboru (Mauk a Langille, 1978), v rýži (Takagi *et al.*, 1985), kukuřici (Veach *et al.*, 2003) a luštěninách (Emery *et al.*, 1998, 2000; Quesnelle a Emery, 2007).

Mezi zástupce aromatických cytokininů se řadí benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (oT), *meta*-topolin (mT) a jejich methoxy-deriváty (meoT, memT; Obr. 2). Ačkoli byl kinetin objeven už v 50. letech, trvalo asi 20 let, než byly aromatické CK objeveny v rostlinách. Po dlouhou dobu se tedy předpokládalo, že aromatické CK jsou čistě syntetické sloučeniny. V přírodě byly objeveny až v polovině 70. let, konkrétně v listech topolu (Horgan *et al.*, 1973).



Obr. 1 Isoprenoidní cytokininy.



Obr. 2 Aromatické cytokininy.

3.1.2 Biosyntéza

Pro biosyntézu cytokininů jsou popsány dvě dráhy. První, přímou drahou, vznikají isoprenoidní cytokininy iP a tZ typu. Jejich biosyntéza spočívá v isopentenylaci adenosin mono/di/trifosfátu a následné hydroxylaci postranního řetězce. Druhou, nepřímou dráhou, vznikají CK *cis*-zeatinového typu degradací tRNA (Vreman *et al.*, 1972, 1978).

Přímá dráha (*de novo* biosyntéza):

Prvním krokem biosyntézy je *N*-prenylace adenosin 5'-fosfátu (ATP, ADP nebo AMP) na *N*⁶-konci, která je katalyzována adenylát isopentenyltransferasou (IPT, EC 2.5.1.27). Jako substráty této reakce jsou využity hydroxymethylbutenyldifosfát (HMBDP) a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP; Sakakibara 2006). HMBDP je produktem methylerythritolfosfátové dráhy (MEP), která je typická pro bakterie a plastidy (Hecht

et al., 2001). DMAPP vzniká jak při MEP, tak i mevalonátovou drahou (MVA), která je lokalizována v cytosolu u eukaryot (Lichtenthaler, 1999, Rohmer, 1999). Pokud je jako substrát využit DMAPP, primárním produktem bude iP nukleotid. Pokud ale IPT upřednostní HMBDP, vznikají tZ nukleotidy (Kakimoto, 2001).

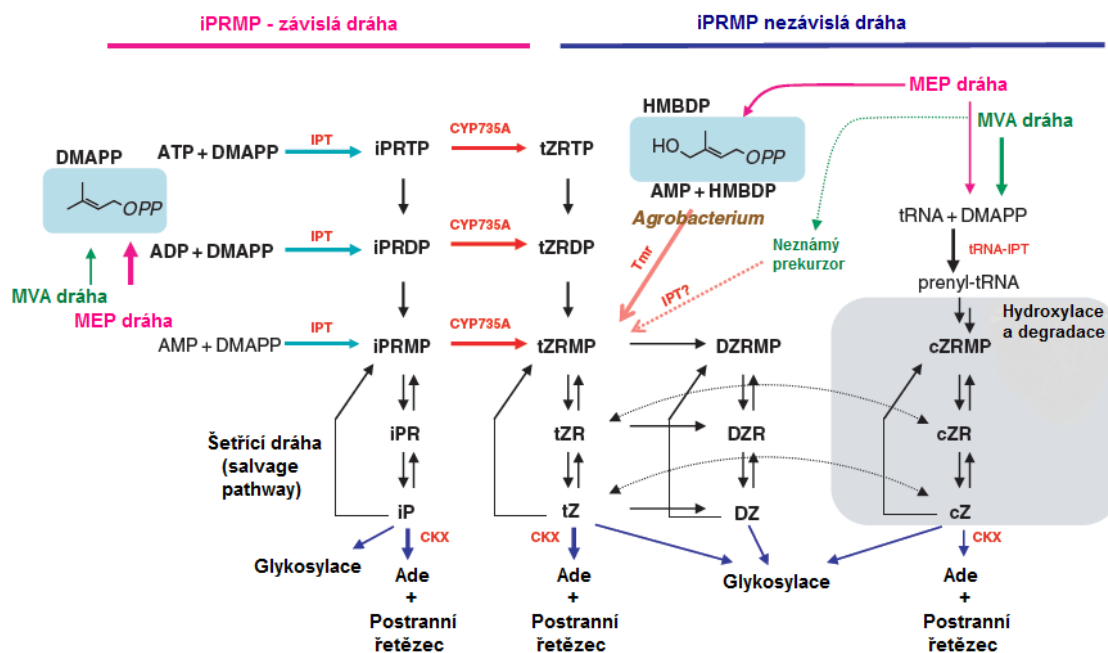
Enzym IPT byl poprvé objeven v bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi *et al.*, 1984, Barry *et al.*, 1984). Jakmile *A. tumefaciens* infikuje rostlinu, část Ti plasmidu, tzv. T-DNA, se zabuduje do chromosomu rostliny. T-DNA nese *tmr* gen, který se exprimuje v rostlinné buňce a je zodpovědný za produkci cytokininů. *Tmr* gen byl naklonován a exprimován v bakterii *Escherichia coli*. Bylo prokázáno, že *tmr* kóduje IPT, která katalyzuje produkci iPRMP z DMAPP a AMP (Akiyoshi *et al.*, 1984, Barry *et al.*, 1984).

U *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno celkem 7 adenylátových IPT (AtIPT1 a AtIPT3–AtIPT8; Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003). Studie ukázaly, že rostlinné IPT preferují ADP a ATP oproti AMP, produkují tedy především iPRDP nebo iPRTP (Kakimoto, 2001). Jednotlivé IPT mají v *Arabidopsis* různou subcelulární lokalizaci. AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5 a AtIPT8 jsou lokalizovány v plastidech, jako prekurzor pro tvorbu CK využívají produkt MEP dráhy (Kasahara, 2004). AtIPT4 a AtIPT7 jsou lokalizovány v cytosolu a mitochondriích, využívají DMAPP z MVA dráhy (Kasahara, 2004).

Primárními produkty *de novo* biosyntézy jsou příslušné isopentenyladenosin 5'-fosfáty - iPMP, iPDP, iPTP (Obr. 3; Blackwell a Horgan 1993; Kakimoto 2001, Takei *et al.*, 2001). Pro vznik tZ cytokininů existují dvě možné biosyntetické dráhy, první je závislá na iP nukleotidu (iPRMP), druhá je nezávislá (Obr. 3).

V iPRMP závislé dráze je syntéza tZ katalyzována cytochromem P450 monooxygenasou (P450). Dva takové enzymy, CYP735A1 a CYP735A2 byly identifikovány v *Arabidopsis*. Enzymy využívají iP nukleotidy, ale ne nukleosidy ani volné báze (Takei *et al.*, 2004).

Předpokládá se, že iPRMP nezávislou drahou vzniká tZ ribosid 5'-fosfát přímo katalýzou IPT za využití neznámého prekurzoru s hydroxylovaným postranním řetězcem (Åstot *et al.*, 2000). Je pravděpodobné, že tento prekurzor pochází z MVA dráhy, jelikož mevastatin, který inhibuje tuto dráhu, také snižuje rychlost biosyntézy tZ (Åstot *et al.*, 2000). Ačkoli se HMBDP zdá být lepším kandidátem, jedná se o produkt MEP dráhy a navíc je rostlinnými IPT stěží využíván (Takei *et al.*, 2003). Povaha iPRMP nezávislé dráhy je proto dosud nejasná.

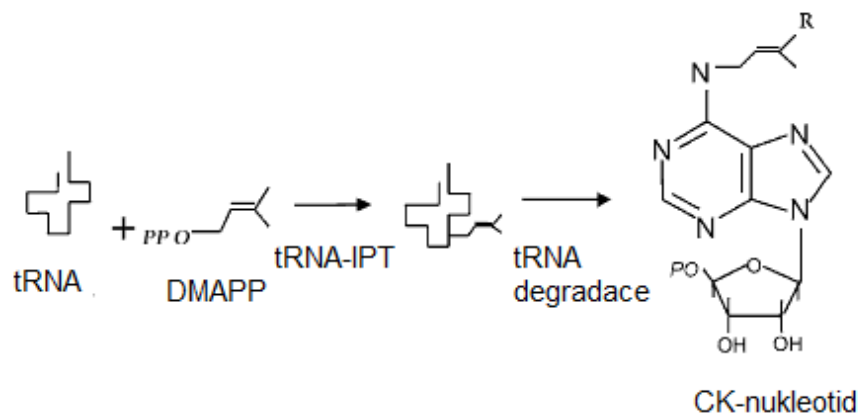


Obr. 3 Model biosyntézy cytokininů v rostlinách. Konverze mezi nukleotidy, nukleosidy a nukleobázemi (např. iPRMP, iPR a iP) jsou katalyzovány enzymy tzv. purinové šetrící dráhy (salvage pathway). Cytokininové nukleobáze a nukleosidy (kromě DZ) mohou být katabolizovány cytokininindehydrogenasami (CKX) na adenin (Ade) nebo adenosin. cZR - cZ ribosid; cZRMP - cZ ribosid 5'-monofosfát; DZR - DZ ribosid; DZRMP - DZ ribosid 5'-monofosfát; iP - N⁶-(D²-isopentenyl)adenin; iPR - iP ribosid; iPRMP - iP ribosid 5'-monofosfát; tZR - tZ ribosid; tZRDP - tZ ribosid 5'-difosfát; tZRMP - tZ ribosid 5'-monofosfát; tZRTP - tZ ribosid 5'-trifosfát. Ostatní zkratky jsou vysvětleny v textu (upraveno podle Hwang *et al.*, 2006).

Nepřímá dráha biosyntézy cytokininů:

Některé druhy tRNA, které mají antikodony komplementární ke kodonům začínajícím uridinem (tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser}), nesou prenylovaný adenosin připojený k antikodonu v poloze 37 (A₃₇, Golovko *et al.*, 2002). Nepřímá dráha biosyntézy cytokininů spočívá v uvolnění CK z takovýchto tRNA. Jelikož tyto tRNA obsahují *cis*-hydroxylovanou skupinu, je tRNA degradace zdrojem cZ cytokininů (Obr. 4). Reakce je katalyzována enzymem tRNA isopentenyltransferasou (tRNA-IPT, EC 2.5.1.8).

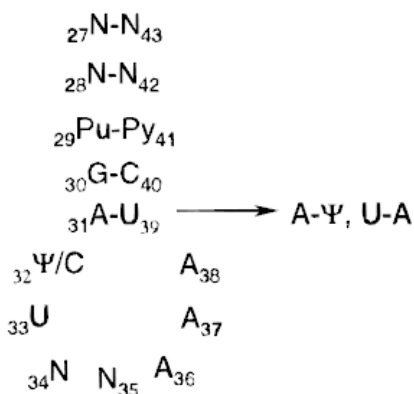
tRNA degradace není regulovaný proces, zatímco biosyntéza *de novo* je přesně kontrolována. *De novo* biosyntéza je navíc lokalizována v místech s vysokou biosyntetickou aktivitou (kořenové špičky, klíčící semena; Letham, 1994), zatímco tRNA degradace není tkáňově specifická.



Obr. 4 Zjednodušené schéma biosyntézy cytokininů nepřímou drahou. Prenylace adeninu pomocí tRNA-IPT v pozici 37 specifických tRNA a uvolnění nukleotidů degradací tRNA (upraveno podle Yevdakova a von Schwartzberg, 2007).

Porovnáním některých tRNA bylo identifikováno několik prvků ve struktuře antikodonu, které jsou nutné pro funkci tRNA-IPT. Je nutné, aby ve struktuře byl adenin v pozicích 36, 37 a 38 (A_{36} , A_{37} a A_{38}), dále purinová báze na pozici 29 a pyrimidinová báze na pozici 41. Na pozici 30 a 40 by měly být báze G-C, na pozici 31 a 39 naopak báze A-U (Obr. 5; Soderberg a Poulter, 2000).

Mikrobiální geny kódující tRNA-IPT byly identifikovány v *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a v *Saccharomyces cerevisiae* (Yevdakova *et al.*, 2008). První rostlinné tRNA-IPT, *AtIPT2* a *AtIPT9*, byly identifikovány v *Arabidopsis* (Kakimoto *et al.*, 2001, Takei *et al.*, 2001), funkčně byla *AtIPT2* popsána o rok později použitím komplementace mutované alely MOD5 v *S. cerevisiae* (Golovko *et al.*, 2002).



Obr. 5 Sekvence antikodonu tRNA *E. coli*, které jsou modifikované tRNA-IPT. Ve struktuře jsou vyznačena pravidla modifikace. Ψ - pseudouridin, Pu - purinová báze, Py - pyrimidinová báze, N - jakákoliv báze (Soderberg a Poulter, 2000).

V mechu *Physcomitrella patens* jsou přítomny pouze tRNA-IPT, nikoli adenylátová IPT (Yevdakova *et al.*, 2008). Předpokládalo se, že cytokininy v *P. patens* vznikají výhradně degradací tRNA a že důležitou roli zde hraje gen *PpIPT1* (Yevdakova a von Schwartzberg, 2007).

V roce 2014 byl připraven mutant umlčením genu *IPT1*. Bylo zjištěno, že za prenylaci A₃₇ ve *Physcomitrelle* je zodpovědná chloroplastová IPT1. Bylo prokázáno, že rostliny s umlčeným genem měly sníženou hladinu cZ, zatímco hladiny tZ a iP byly zvýšené. Data ukázaly, že v mechu existuje i jiná, tRNA nezávislá dráha biosyntézy cytokininů (Lindner *et al.*, 2014).

V genomu rýže (*Oryza sativa*) existuje deset IPT genů. Geny *OsIPT1* - *OsIPT8* kódují adenylátovou IPT (*OsIPT6* je pseudogen). Geny *OsIPT9* a *OsIPT10* se zřejmě účastní prenylace tRNA. Tento předpoklad je založen na jejich podobnosti s geny *AtIPT2* a *AtIPT9* (Sakamoto *et al.*, 2006).

V kukuřici (*Zea mays*) bylo objeveno deset IPT genů (*ZmIPT1* - *ZmIPT10*). Geny *ZmIPT1* a *ZmIPT10* kódují tRNA-IPT (Vyroubalová *et al.*, 2009).

Aktivace cytokininů:

Produktem *de novo* biosyntézy jsou málo aktivní mono/di/trifosfáty, v případě degradace tRNA jsou to monofosfáty. Pro jejich plnou funkčnost je nutná hydrolytická aktivace, která je zprostředkována enzymem Lonely Guy (LOG). Enzym byl objeven v rýži (*Oryza sativa* L.; Kurakawa *et al.*, 2007). Jedná se o cytokinin ribosid 5'-monofosfát fosforibohydrolasu, jež štěpí cytokininové nukleotidy na ribosu 5'-monofosfát, za současného uvolnění biologicky aktivních nukleových bází. LOG štěpí pouze cytokinin nukleosid 5'-monofosfáty, nikoli di- nebo trifosfáty, AMP ani cytokininové ribosidy (Kurakawa *et al.*, 2007).

V *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 homologů LOG (AtLOG; Kuroha *et al.*, 2009). Jsou lokalizovány v cytosolu a jádře, jejich aktivita je ekvivalentní k LOG rýže. Nadexprese genů kódujících AtLOG snížila koncentraci iP ribosid 5'-fosfátu a zvýšila množství iP a glukosidů. Několikanásobné mutanty AtLOG vykazaly změny v růstu a vývoji rostliny, konkrétně při vývoji květů nebo tvorbě postranních kořenů (Kuroha *et al.*, 2009).

3.1.3 Metabolismus

Metabolické procesy cytokininů se dělí na dvě skupiny. První z nich se týká modifikací na adeninovém kruhu, druhá modifikací na postranním řetězci.

Modifikace na adeninovém kruhu zahrnují *N*-glykosylaci na pozici 3, 7 a 9. *N*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.118) byla izolována z ředkvičky (Entsch a Letham, 1979) a následně i z *Arabidopsis* (Hou *et al.*, 2004). Katalyzuje tvorbu cytokinin glukosidů na dusíku v pozici 7 a 9, s preferencí pro pozici 7. *N*⁷ a *N*⁹-glukosylace je ireverzibilní proces, kdy dochází k inaktivaci CK, protože *N*-glukosidy nejsou štěpeny β-glukosidasou (Brzobohatý *et al.*, 1993). *N*-glukosyltransferasa specifická pro *N*³ polohu nebyla dosud identifikována.

Cytokininy, které obsahují na postranním řetězci hydroxylovou skupinu, podléhají *O*-glykosylaci. Reakce je zprostředkována *O*-glykosyltransferasami, které byly objeveny ve fazolu - *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.203; Martin *et al.*, 1999a), *trans*-zeatin-*O*-xylosyltransferasa (EC 2.4.2.40; Martin *et al.*, 1999b), a v kukuřici *cis*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.215; Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003). *O*-glukosylace je reversibilní, glykosidy cytokininů mohou být zpětně přeměňovány na aktivní formu β-glukosidasou (EC 3.2.1.21; Brzobohatý *et al.*, 1993).

Dalšími příklady modifikací na postranním řetězci jsou reakce týkající se zeatinu. Při první z nich je zeatin redukován zeatinreduktasou (EC 1.3.1.69) na dihydrozeatin (Martin *et al.*, 1989; Gaudinová *et al.*, 2005). Druhou reakcí je isomerace *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin či naopak pomocí zeatin *cis-trans*-isomerasy. Ta byla poprvé vyizolována z nezralých semen fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.; Bassil *et al.*, 1993). Enzym byl znovu purifikován z kukřice a pomocí hmotnostní spektrometrie byl identifikován jako gi|226531542 (Hluska, nepublikováno). Daný gen byl anotován jako nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa. FAD hydrolasová aktivita enzymu byla potvrzena experimentálně (Baková, 2013).

3.1.4 Degradace

Cytokinoxidasy/dehydrogenasy (CKX) jsou zodpovědné za většinu katabolických procesů cytokininů, jsou schopné inaktivovat cytokininy v jediném kroku. Jelikož změny v aktivitě těchto enzymů ovlivňují koncentraci CK v rostlinných pletivech, jsou CKX důležité pro kontrolu hladiny cytokininů a přispívají k regulaci procesů řízených cytokininy.

Poprvé bylo oxidativní štěpení cytokininů popsáno v roce 1971 v tabáku (Pačes *et al.*, 1971). Příslušné enzymy byly pojmenovány cytokinin oxidasy (EC 1.4.3.18; Whitty a Hall, 1974). Degradace cytokininů je dosaženo oxidativním štěpením na dusíku N^6 za vzniku adeninu nebo jeho derivátu (Obr. 6).

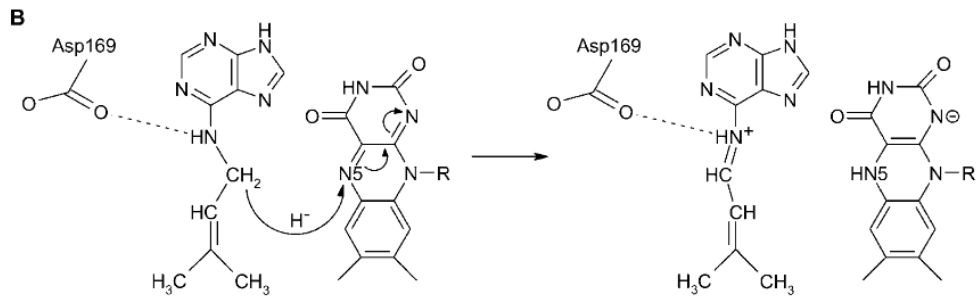
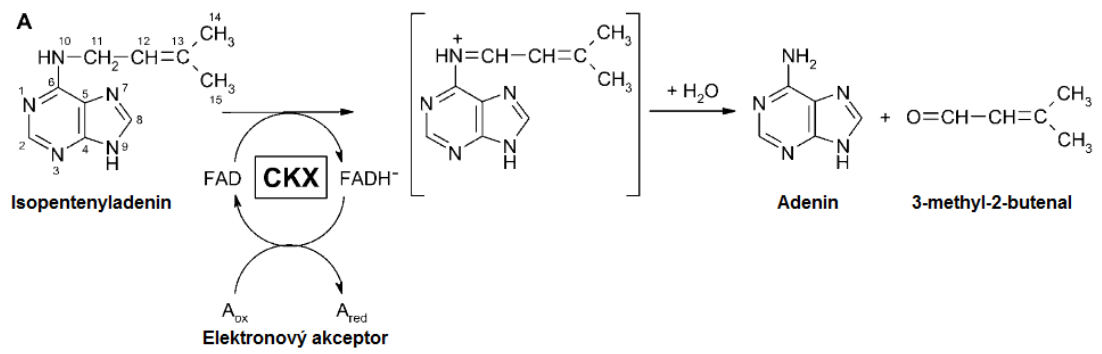
Po mnoho let se předpokládalo, že molekulární kyslík je nezbytný pro aktivitu enzymu. Později bylo ale zjištěno, že enzymy upřednostňují jiné elektronové akceptory než je kyslík a proto byly pojmenovány cytokinindehydrogenasy (CKX; EC 1.5.99.12; Galuszka *et al.*, 2001).

Nejlepšími elektronovými akceptory jsou *p*-chinony zahrnující analogy ubichinonu (Q_0 , Q_1 , 1,4-naftochinon) a také syntetický elektronový akceptor 2,6-dichlorofenol-indofenol (DCPIP; Frébortová *et al.*, 2004).

Bylo prokázáno, že CKX fungují v duálním módu. Jako dehydrogenasy upřednostňují isoprenoidní cytokininy, zatímco jako oxidasy je rychlost přeměny isoprenoidních a aromatických CK podobná (Frébortová *et al.*, 2004).

V *Arabidopsis* byla prozkoumána oxidasová/dehydrogenasová aktivita u sedmi genů *AtCKX* (*AtCKX1* – *AtCKX7*), které byly exprimovány v transgenních rostlinách tabáku (Galuszka *et al.*, 2007). Všechny enzymy se chovají spíše jako dehydrogenasy, žádný z nich se nedá označit striktně jako cytokininoxidasa. Jednotlivé isoformy CKX enzymů se velmi liší v substrátové specifitě.

Analýza ukázala, že *AtCKX2* a *AtCKX4* vykazují vysokou enzymatickou aktivitu při reakci s isoprenoidními CK a jejich ribosidy za využití syntetických elektronových akceptorů DCPIP a Q_0 (2,3-dimetoxy-5-methyl-1,4-benzochinon) při neutrálním pH. Aktivita zbylých *AtCKX* byla značně nižší. *AtCKX1* a *AtCKX7* zato vykazují nejvyšší aktivitu při slabě kyselém pH s využitím CK-glykosidů, konkrétně N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin 9-glukosidu (iP9G). *AtCKX3* zřejmě preferuje degradaci CK-nukleotidů. Aromatické cytokininy byly degradovány nízkou reakční rychlostí (Galuszka *et al.*, 2007).



Obr. 6 Mechanismus degradace cytokininů pomocí CKX. (A) Schéma degrační reakce. (B) Schéma oxidace substrátu (převzato z Werner *et al.*, 2006)

3.2 Nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy

Nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy jsou enzymy, které štěpí pyrofosfátovou nebo fosfodiesterovou vazbu a uvolňují nukleosid 5'-monofosfát z celé řady substrátů (nukleotidy, fosfolipidy; Obr. 7).

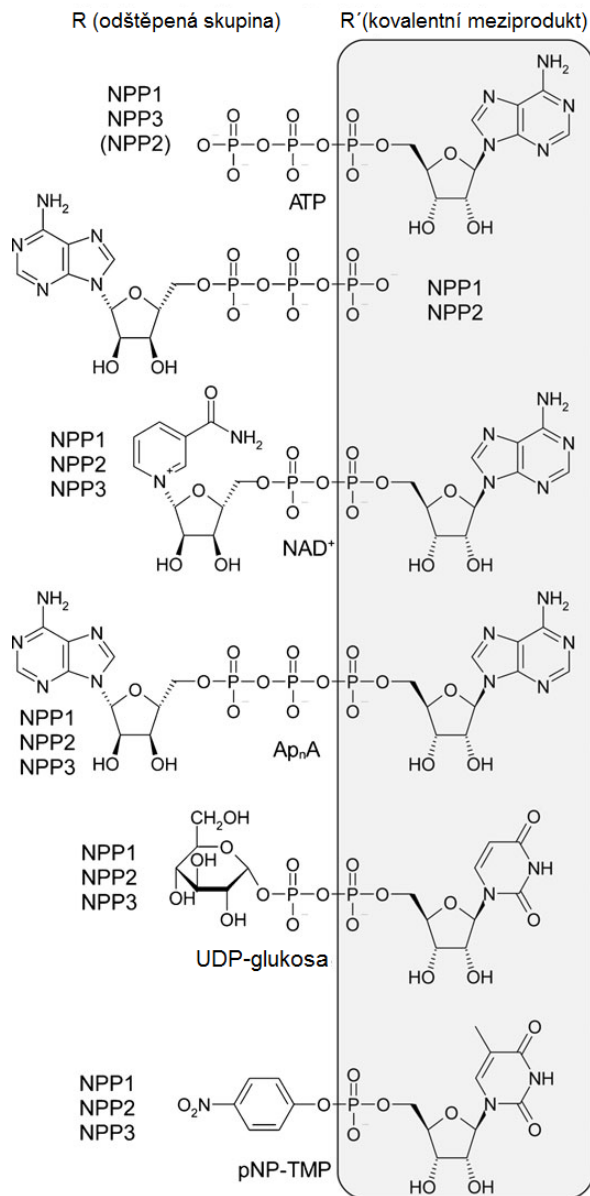
U obratlovců bylo doposud objeveno 7 homologů (Obr. 8). Jsou značeny NPP1 - NPP7, podle pořadí, v jakém byly objeveny (Stefan *et al.*, 2006). Jednotlivé homology byly objevovány nezávisle na sobě a získávaly různé názvy (Tab. 1), jelikož jejich funkce nebyla zpočátku příliš jasná. Ke sjednocení názvosloví došlo na mezinárodním workshopu, kde byl přijat název nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa (Zimmermann *et al.*, 2000). Stejně jako názvosloví ostatních enzymů se název skládá ze substrátu (nukleotidy a jejich deriváty) a názvu reakce, kterou enzym katalyzuje (hydrolyza pyrofosfátové nebo fosfodiesterové vazby). Ke konečné úpravě došlo po zjištění, že se jedná o ektoenzymy, tedy že mají katalytické místo na vnější straně membrány. Název byl upraven na ekto-nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP; EC 3.1.4.×; EC 3.6.1.×; Zimmermann *et al.*, 2000).

V rostlinné říši nejsou NPP dobře prozkoumané, jejich zástupci byli objeveni v sóji (Salvucci, 1995), čočce (Medda *et al.*, 2000), pryšci (Pintus *et al.*, 2009), pšenici (Joye *et al.*, 2010) a opuncii (Spanò *et al.*, 2011).

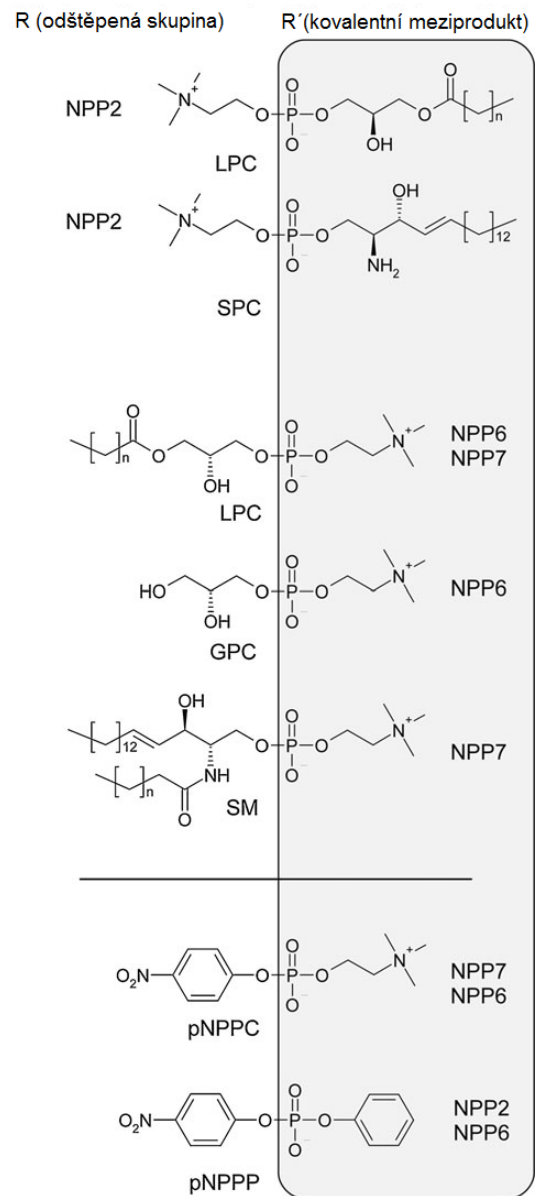
Tab. 1 Přehled lidských / savčích NPP a jejich substrátů.

Enzym	Jiný název enzymu	Nukleotidové substráty	Jiné substráty
NPP1	MAFP, NPPase, NPP γ , NTPPPH, PC-1	ATP, ADP, ApnA, NAD ⁺ , UDP cukry	-
NPP2	Autotaxin, Lysofosfolipasa-D, ATX α - ϵ , PD-I α	ATP, ADP, ApnA, NAD ⁺ , UDP cukry	LPC
NPP3	B10, CD203c, gp130RB13-6, NPP β , PD-I β	ATP, ADP, ApnA, NAD ⁺ , UDP cukry	-
NPP4		?	?
NPP5		?	?
NPP6		-	GPC,LP C
NPP7	Alkalická sfingomyelinasa	-	SM, LPC

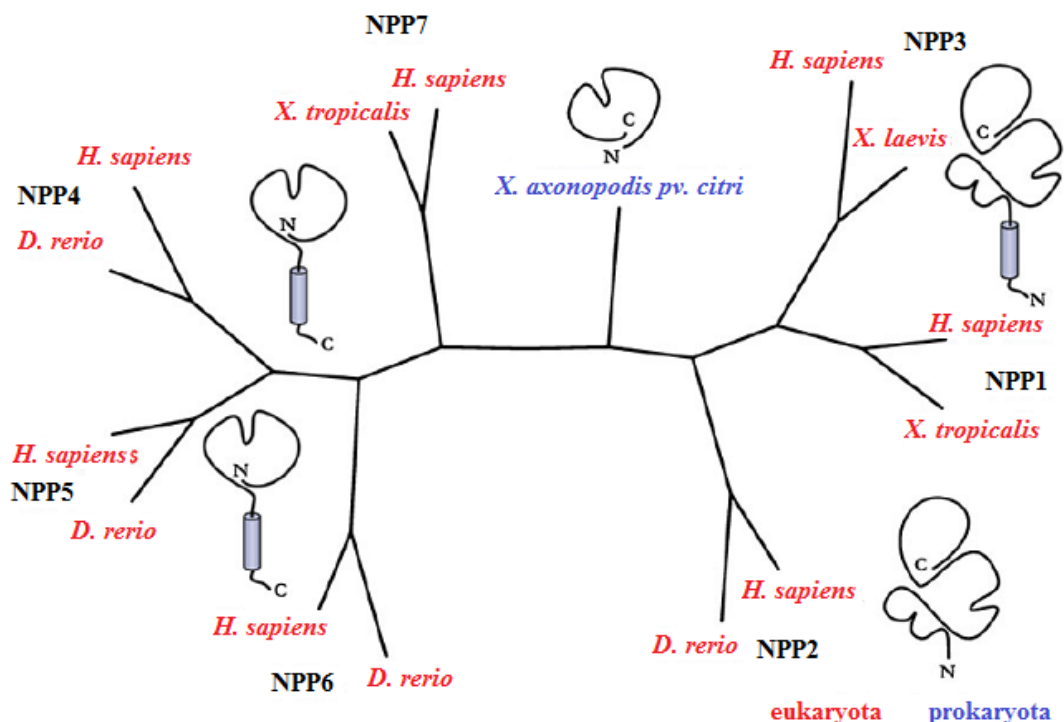
Nukleotidové substráty



Lipidové substráty



Obr. 7 Substrátová specifita savčích NPP enzymů. Katalýza začíná nukleofilní adicí Thr alkoxidu na atom fosforu, čímž vzniká kovalentně vázaný meziprodukt s R' skupinou. V druhém kroku je meziprodukt hydrolyzován vodou aktivovanou Zn²⁺. K některým enzymům se mohou substráty vázat v obou orientacích. Kvůli změně specifity ve vazebných místech R a R' jsou substráty navázané v opačné poloze, čímž dochází k vytváření různých produktů hydrolyzy. GPC - glycerofosforylcholin, LPC – lysosfosfatidylcholin, pNPPC - *p*-nitrofenylfosforylcholin, SPC - sfingosylfosforylcholin (převzato ze Zimmermann *et al.*, 2012).



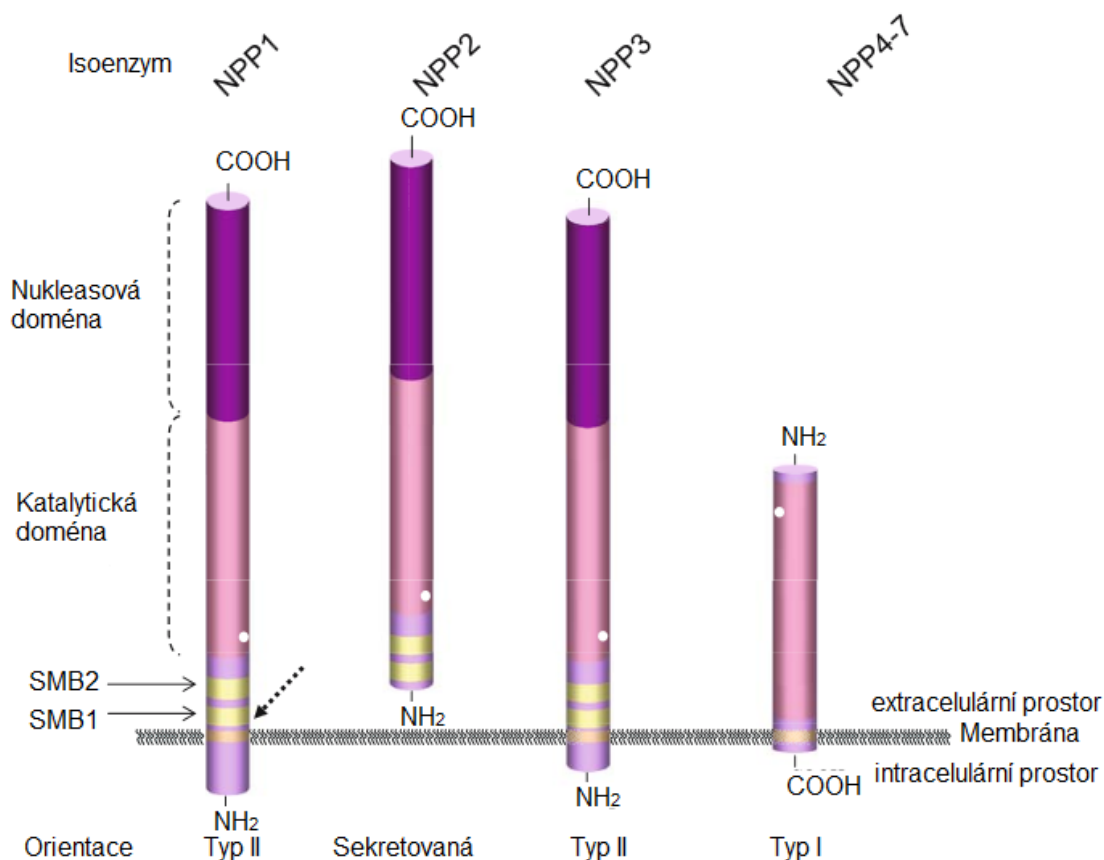
Obr. 8 Fylogenetický strom NPP a znázornění jejich membránové topologie. Na obrázku je zdůrazněn rozdíl mezi NPP1 – 3 a NPP4 – 7, které se skládají pouze z katalytické domény. K dělení do sedmi různých isoformů došlo brzy v evoluci. Sekvence jednotlivých enzymů: *D. rerio* NPP2: gi|82187289, NPP4: gi|62955749, NPP5: gi|113462025, NPP6: gi|61806626; *H. sapiens* NPP1: gi|23503088, NPP2: gi|290457674, NPP3: gi|206729860, NPP4: gi|172045555, NPP5: gi|50401201, NPP6: gi|108935979, NPP7: gi|134047772; *X. axonopodis pv. citri*: gi|21243551; *X. laevis* NPP3: gi|254946550; *X. tropicalis* NPP1: gi|254946558, NPP7: gi|296010817 (převzato ze Zimmermann *et al.*, 2012).

3.2.1 Struktura NPP

NPP mají modulární strukturu. NPP1 a 3 se skládají z *N*-terminální intracelulární domény, transmembránového helixu a velké extracelulární *C*-terminální domény (orientace typu II). Extracelulární část obsahuje dvě somatomedin-B domény (40 – 50 aminokyselin), katalytickou doménu (400 residuí) a *C*-terminální nukleasovou doménu (250 residuí). NPP2 je sekretovaná v extracelulárním médiu. NPP4 – 7 mají orientaci typu I, skládají se pouze z katalytické domény, *N*-terminálního signálního peptidu a *C*-terminální transmembránové domény (Obr. 9, Gijsbers *et al.*, 2001, Sakagami *et al.*, 2005). Intracelulární doména, která je u NPP1 – 3 na *N*-konci a u NPP4 – 7 na *C*-konci, je poměrně malá, má pouze 11 – 77 residuí a liší se mezi jednotlivými isoenzymy.

Lidské NPP4 (453 residuí) a NPP5 (477 residuí) jsou značně menší než NPP1 – NPP3 (863 – 925 residuí), což je způsobeno nepřítomností somatomedin-B domény a *C*-terminální nukleasové domény u NPP4 – 7. NPP4 a 5 jsou navíc o 250 residuí

kratší na C-konci. Identita aminokyselinové sekvence mezi jednotlivými homology se pohybuje mezi 24 – 60 % (Gijsbers *et al.*, 2001).



Obr. 9 Struktura a lokalizace enzymů NPP rodiny. Sedm homologů má strukturálně příbuznou katalytickou doménu. NPP1 a NPP3 mají *N*-terminální transmembránový helix (orientace typu II), NPP2 je sekretovaná v extracelulárním médiu. *N*-terminální hydrofobní sekvence NPP2 a NPP4 – NPP7 představuje signální peptid, transmembránový helix NPP4 – NPP7 se nachází na *C*-konci (orientace typu I). Ve struktuře NPP1 – NPP3 se navíc vyskytují dvě *N*-terminální somatomedin-B domény (SMB1, SMB2) a *C*-terminální nukleasová doména, ale jejich přesná funkce není dosud známá (upraveno podle Stefan *et al.*, 2006).

3.2.2 Charakteristika jednotlivých homologů

Gen pro lidskou NPP1 byl lokalizován na chromozomu 6 na q22-q23 pomocí *in situ* hybridizace, protein se skládá z 873 aminokyselin (Funakoshi *et al.*, 1992). Enzym je homodimer o velikosti 230 – 260 kDa (v redukované formě 115 – 135 kDa), v závislosti na typu buněk (Goldfine *et al.*, 2008).

NPP1 je dosud nejlépe popsaným homologem. Je exprimována v celé řadě tkání, např. v játrech, svalech, adiposní tkáni, srdci, mozku, pankreatických ostrůvcích, placentě, ledvinách, plicích, slinných žlázách, nadvarlatech, chámovodu, chondrocytech, lymfocytech a dermálních fibroblastech (Funakoshi *et al.*, 1992; Goding

et al., 1998, 2003; Stefan *et al.*, 2005). Poprvé byla objevena v roce 1970 jako ukazatel pozdního stádia diferenciaci B buněk produkujících protilátky. Odtud získala i svůj původní název, PC-1 (Plasma Cell differentiation antigen 1; Takahashi *et al.*, 1970). Další název, MAFP (Major aFGF-stimulated Protein), pochází z roku 1991, kdy byl enzym nezávisle objeven v játrech hovězího dobytka jako protein, který váže aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor; Oda *et al.*, 1991). NPP1 pravděpodobně reguluje kalcifikaci měkkých tkání a mineralizaci kostí díky své schopnosti vytvářet PP_i , což je inhibitor kalcifikace a mineralizace (Johnson *et al.*, 1999). NPP1 také interaguje s inzulinovým receptorem a tím ruší jeho účinky (Grupe *et al.*, 1995).

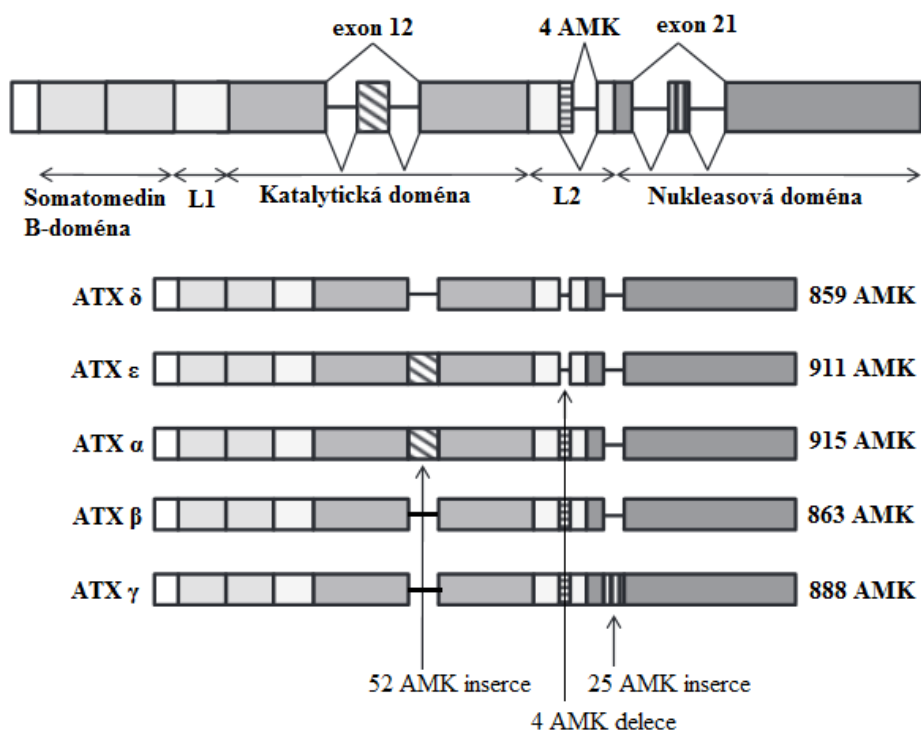
Gen pro lidskou NPP2 byl lokalizován na chromozomu 8 na q24.1. Molekulová hmotnost NPP2 je 125 kDa, jako jediný zástupce skupiny NPP enzymů je sekretovaný v extracelulárním prostoru jako katalyticky aktivní glykoprotein (Stracke *et al.*, 1992).

NPP2 je také známá pod názvem autotaxin, poprvé byla vyizolována v roce 1992 z buněk melanomu A2058 jako glykoprotein, který v pikomolárních koncentracích stimuluje pohyblivost nádorových buněk (Stracke *et al.*, 1992). Zvýšená exprese autotaxinu byla zaznamenána u více nádorových linií a jeho přítomnost byla prokázána u celé řady onemocnění rakoviny (glioblastomy, karcinomy štítné žlázy, prsu, slinivky a krve – lymfomy, myelomy, leukémie). Jeho nadměrná exprese dokonce způsobila spontánní vznik rakoviny prsu u myši starých 8 - 24 měsíců (Liu *et al.*, 2009). Autotaxin katalyzuje hydrolýzu lysofosfatidylcholinu na cholin a kyselinu lysofosfatidovou (Tokumura *et al.*, 2002), která způsobuje přeměny cytoskeletu, záněty, buněčnou proliferaci a metastázy (Liu *et al.*, 2009).

Bylo objeveno 5 variant NPP2 značených ATX $\alpha - \epsilon$ (Obr. 10). ATX α byl objeven jako první (Stracke *et al.*, 1992), má však ze všech isoform nejnížší expresi. Druhý objevený ATX γ byl původně pojmenován jako PD-I α , je exprimován především v centrálním nervovém systému (Narita *et al.*, 1994). ATX β se vyskytuje ze všech isoform nejčastěji. Byl získán klonováním z buněk teratokarcinomu (Giganti *et al.*, 2008). ATX δ je druhá nejčastější isoforma, od ATX β se liší pouze 4 aminokyselinovou delecí v L2 linkeru, Obr. 10), má také podobné biochemické vlastnosti (Hashimoto *et al.*, 2012). ATX α a ATX ϵ , dvě nejméně časté isoformy, jsou charakteristické 52 aminokyselinovou insercí v katalytické doméně. Tato inserce je štěpitelná heparin vazebná doména, která zprostředkovává interakci sulfátu heparinu s proteoglykany a tím i produkci kyseliny lysofosfatidové do plazmatické membrány (Houben *et al.*, 2013).

NPP3 byla poprvé identifikována jako gp130^{RB13-6}, tedy glykoprotein plasmatické membrány, který je rozpoznán monoklonální protilátkou RB13-6. Tato protilátka zachycuje prekurzory nervových buněk, které jsou citlivé k maligní konverzi (Deissler *et al.*, 1995). Molekulová hmotnost enzymu je přibližně 130 kDa. Gen pro NPP3 byl lokalizován na chromozomu 6 q22.

NPP4 a 5 byly ke skupině nukleotidpyrofosfatas připojeny na základě podobnosti jejich katalytické domény s doménou NPP1 – 3 (Gijsbers *et al.*, 2001). Obsahují všechna residua esenciální pro katalytickou aktivitu NPP1 – 3. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 50 kDa. Gen pro NPP4 se nachází na chromozomu 6 p21.1, pro NPP5 na chromozomu 6 p21.1-p11.2.



Obr. 10 Schéma proteinové struktury jednotlivých domén ATX. ATX α a ε obsahují 52 aminokyselinou inserci kódovanou exonem 12, u ostatních ATX je exon 11 připojen přímo k exonu 13. Stejně tak je exon 20 spojen s exonem 22, výjimku tvoří ATX γ, kde je vložena 25 aminokyselinová inserce (exon 21). ATX δ a ε mají 4 aminokyselinovou delecí na L2 linkeru (delece 12 bp na exonu 19; převzato z Hashimoto *et al.*, 2012).

Tab. 2 Shrnutí některých vlastností lidských NPP

	NPP1 - 3	NPP4, 5	NPP6, 7
Molekulová hmotnost monomeru	110 - 125 kDa	50 kDa	50 - 60 kDa
Forma	dimer	oligomer	?
Substráty	nukleotidy	neznámé	fosfolipidy
Transmembránová doména	ano (typ II) (NPP2 ne)	ano (typ I)	ano (typ I)
Glykosylace	ano	ano	ano
Optimální pH	alkalické	alkalické	alkalické
Termostabilita	vysoká	vysoká	vysoká
Inhibice	EDTA	-	Zn ²⁺

NPP7 byla identifikována jako NPP v roce 2003 (Duan *et al.*, 2003), NPP6 o dva roky později (Sakagami *et al.*, 2005). NPP6 štěpí fosfolipidy, přednostně ty, které obsahují cholin (glycerofosforylcholin – GPC a sfingosylfosforylcholin - SPC), dále také lysofosfatidylovou kyselinu (Sakagami *et al.*, 2005). Narozdíl od NPP2, která štěpí lysofosfatidylovou kyselinu na cholin, ji NPP6 a 7 štěpí na fosfocholin. NPP7 katalyzuje přeměnu sfingomyelinu na ceramid (Duan *et al.*, 2003). Molekulová hmotnost NPP6 je asi 50 kDa, NPP7 60 kDa. Gen pro NPP6 se nachází na chromozomu 4 q35.1, pro NPP7 na chromozomu 17 q25.3.

3.2.3 Rostlinné nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy

Nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy v rostlinách nejsou dobře prostudovány, dosud bylo objeveno pouze pár zástupců. Mají zřejmě roli v iniciaci, terminaci a modulaci signálních kaskád. NPP by se mohly uplatňovat také při recyklaci nukleotidů (Joye *et al.*, 2010).

První objevenou nukleotidpyrofosfatou/fosfodiesterasou v rostlinné říši byla NPP ze sóji (*Glycine max* L.; Salvucci *et al.*, 1995). Přirozeně se enzym vyskytuje jako oktamer o molekulové hmotnosti 560 kDa (Tab. 3; podjednotky mají velikost 72 kDa). Porovnáním aminokyselinové sekvence N-konce nebyla objevena podobnost s NPP1 u obratlovců. Enzymy rovněž vykazují rozdílné fyzikální a katalytické vlastnosti. Zatímco NPP1 je pevně vázána v membráně, NPP ze sóji je rozpustný. Rozdíly jsou patrné i v pH optimu pro fosfodiesterasovou aktivitu. Zatímco NPP1 upřednostňuje alkalické pH, pH optimum sójové NPP závisí na daném substrátu (pH 4,5 pro UDP-glukosu, pH 5,5 pro UDP a pH 7,5 pro pNP-TMP). Oproti NPP1 se liší i v substrátové specifitě, jelikož není schopna hydrolyzovat NADP, nukleotidové difosfáty a PP_i (Salvucci *et al.*, 1995).

NPP byla purifikována také ze sazenic čočky (*Lens esculenta* L.; Medda *et al.*, 2000). Jedná se o enzym o molekulové hmotnost 75 ± 5 kDa. Hydrolyzuje nukleotidy, především NAD(P), v menší míře pak FAD. Pyrofosfatasová aktivita je zvýšená v přítomnosti divalentních kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Medda *et al.*, 2000).

Dále byla NPP vyizolována z latexu pryšce statného (*Euphorbia characias*, ELNPP; Pintus *et al.*, 2009). Molekulová hmotnost enzymu činí 80 ± 5 kDa. Enzym je složen ze dvou zřejmě totožných podjednotek. Každá tato podjednotka obsahuje jeden Ca^{2+} a jeden Mg^{2+} kation. Zatímco Mg^{2+} kation je pevně vázán k enzymu, Ca^{2+} se dá odstranit použitím EDTA, čímž ale enzym ztrácí aktivitu. ELNPP hydrolyzuje velké množství substrátů, jako např. NADH, NAD^+ , FAD, A_nP_n , 3',5'-cAMP, ATP, ADP a ADP-ribosu, dále pNP-TMP a Bis-p-nitrofenylfosfát (Pintus *et al.*, 2009).

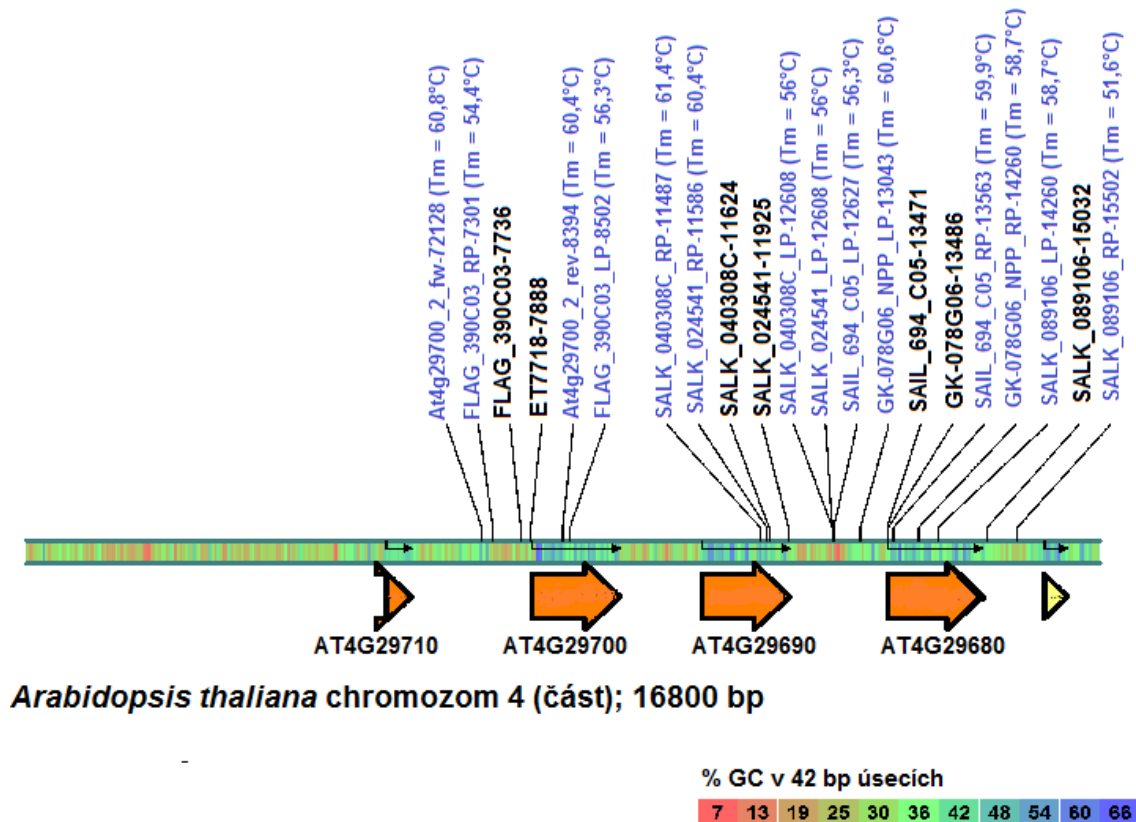
V roce 2010 byla popsána nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesterasa z pšenice (*Triticum aestivum* L., TaNPP; Joye *et al.*, 2010). Ačkoli je struktura TaNPP jednodušší, jako je tomu u NPP4 – 7, sekvence aminokyselin a substrátová specifita enzymu odpovídá spíše lidským NPP1 a 3. Molekulová hmotnost enzymu je pouze 52 kDa, vyskytuje se jako monomer nebo oligomer. V aktivním místě má enzym dva kovové ionty. Stejně jako ELNPP hydrolyzuje nukleotidy, ale i pNP-TMP a p-nitrofenylfosfát (Joye *et al.*, 2010).

Nedávno byla popsána i NPP izolovaná z plodů opuncie (*Opuntia ficus indica*, ONPP; Spanò *et al.*, 2011). Molekulová hmotnost enzymu je 105 ± 8 kDa, má velmi podobné vlastnosti jako NPP z pryšce a pšenice (Tab. 3). Stejně jako ELNPP se enzym skládá ze dvou totožných podjednotek, z nichž každá obsahuje jeden Ca^{2+} a jeden Mg^{2+} kation. Také vykazuje vysokou katalytickou aktivitu k nikotinamidovým koenzymům, zatímco jeho aktivita vůči ADP/UDP-glukose, což jsou nejvýznamnější substráty pro NPP z rýže a ječmene, je velmi nízká. Zatímco poslední dva jmenované enzymy se uplatňují při biosyntéze nukleotidových cukrů, fyziologická funkce ONPP nebyla s jistotou prokázána. Nicméně vysoká účinnost ONPP hydrolyzovat NAD(P)(H) ukazuje, že by enzym mohl ovlivňovat aktivitu některých dehydrogenas (Spanò *et al.*, 2011).

Tab. 3 Shrnutí některých vlastností rostlinných NPP.

	Pšenice	Čočka	Sója	Pryšec	Opuncie
Molekulová hmotnost monomeru	52 kDa	75±5 kDa	72 kDa	80±5 kDa	105±8 kDa
Možné oligomery	monomer, oligomer	-	oktamer	-	-
Substráty	nukleotidy	nukleotidy	nukleotidy, pNP_TMP	nukleotidy	nukleotidy
Transmembrá-nová doména	ano (<i>N</i> -terminální)	-	-	-	-
Glykosylace	<i>N</i> -glykosylace	-	-	-	<i>N</i> -glykosylace
Optimální pH	pH 12	pH 10	pH 4,5/5,5/7,5	-	alkalické
Optimální teplota	70°C	-	-	-	75°C
Termostabilita	vysoká	-	-	-	vysoká
Inhibice	EDTA, AMP	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , sulfhydrylová činidla	EDTA	EDTA, AMP

U *Arabidopsis thaliana* se vyskytují 4 isoformy nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesteras, jsou to geny AT4G29680, AT4G29690, AT4G29700, AT4G29710, přičemž posledně jmenovaný je pseudogen (Obr. 11).



Obr. 11 Geny *Arabidopsis thaliana* kódující NPP. Na obrázku jsou znázorněny KO linie *Arabidopsis* příslušných genů spolu s jejich primery.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

Pro přípravu růstových médií bylo použito Murashige & Skoog médium s vitamíny (Duchefa, ČR), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonová kyselina (MES; Sigma, ČR), glukosa a sacharosa (obě LachNer, ČR) a agar pro kultivaci rostlin (HiMedia, Indie). Semena byla sterilizována v ethanolu (LachNer, ČR) s Tritonem X100 (Sigma, ČR).

Při genotypizaci byla použita *Go Taq*® G2 Flexi DNA polymerasa od firmy Promega Corporation (USA). Jako standard pro elektroforézu byl použit GeneRuler™1kb Plus DNA Ladder z firmy Fermentas (Kanada). Na přípravu gelu pro elektroforézu byla použita agarosa od firmy Sigma, ČR.

Pro přípravu roztoků a pufrů byly využity chemikálie Tris (Duchefa, ČR), chloroform isoamylalkohol (24:1; Sigma, ČR), chlorid sodný (LachNer, ČR), EDTA, SDS (obojí Penta, ČR), kyselina mravenčí (Sigma, ČR), hydroxid amonný (Penta, ČR), kyselina dusičná, acetát amonný (Lachema, ČR), dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, ČR), hydrogenfosforečnan sodný (Lachema, ČR) a kyselina citronová (LachNer, ČR). Pro úpravu pH byla použita kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR) a hydroxid draselný (LachNer, ČR).

Koncentrace proteinů byla měřena pomocí Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad Laboratories, USA), jako standard pro vytvoření kalibrační křivky byl použit BSA od firmy Sigma, ČR.

Pro měření aktivity enzymu byly použity knock-outované linie *A. thaliana* (Tab. 4), které byly dodány z European Arabidopsis stock center (UK; linie SALK, SAIL, GK) a z Institut Jean Pierre Bourgin (Versailles Arabidopsis Stock center, Francie; linie FLAG).

Tab. 4 Knock-outované linie *A. thaliana*.

Gen	Název KO linie <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT4G29680	SALK-08916, SAIL-694C05, GK-078606
AT4G29690	SALK-040308C SALK-024541
AT4G29700	FLAG-390C03

4.2 Seznam použitých pufrů a roztoků

Růstová média:

½ MS agar:	2,15 g·dm ⁻³ MS s vitamíny 0,5 g·dm ⁻³ MES 10 g·dm ⁻³ sacharosa 10 g·dm ⁻³ agar pro kultivaci rostlin pH = 5,8 (upraveno 4 mol·dm ⁻³ KOH)
MS médium:	4,3 g·dm ⁻³ MS s vitamíny 0,5 g·dm ⁻³ MES 30 g·dm ⁻³ glukosa pH = 5,7 (upraveno 4 mol·dm ⁻³ KOH)

Izolace gDNA:

gDNA extrakční pufr:	200 mmol·dm ⁻³ Tris 250 mmol·dm ⁻³ NaCl 20 mmol·dm ⁻³ EDTA 0,5% SDS pH = 8,0 (upraveno 35% (w/w) HCl)
TE pufr:	10 mmol·dm ⁻³ Tris/HCl 1 mmol·dm ⁻³ EDTA pH = 8,0 (upraveno 35% (w/w) HCl)

Elektroforéza:

Agarosový gel:	1% (w/v) agarosa v 1x TAE pufru
TAE pufr:	70 mmol·dm ⁻³ Tris 1 mmol·dm ⁻³ kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) pH = 8,0 (upraveno kyselinou octovou)

Stanovení cytokininů:

Bielského pufr:	MeOH/H ₂ O/1 mol·dm ⁻³ HCOOH (15/4/1)
PBS (fosfátový pufr)	137 mmol·dm ⁻³ NaCl 2,7 mmol·dm ⁻³ KCl 10 mmol·dm ⁻³ Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 2 mmol·dm ⁻³ KH ₂ PO ₄

pH 7,4

Eluční roztok I (ESI): 0,35 mol·dm⁻³ NH₄OH

Eluční roztok II (ESII): 0,36 mol·dm⁻³ NH₄OH v 60% MeOH

Měření aktivity enzymu:

McIlvaineův pufr 0,2 mol·dm⁻³ Na₂HPO₄ titrovaný kyselinou citronovou na pH 7,5

4.3 Přístroje

Centrifuga stolní (Eppendorf, ČR)

Elektroforetická komůrka (Biometra, Německo)

Flowbox (Schoeller INSTRUMENT, ČR)

UFLC, Nexera (Shimadzu, Japonsko)

Inkubátor (Mettler, Německo)

UV/VIS spektrofotometr 8453 Agilent (HPST, Praha, ČR)

Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)

Termocykler T - personal (Biometra, Německo)

Termocykler T – gradient (Biometra, Německo)

Oscilační mlýnek MM 400 (Retsch, Praha, ČR)

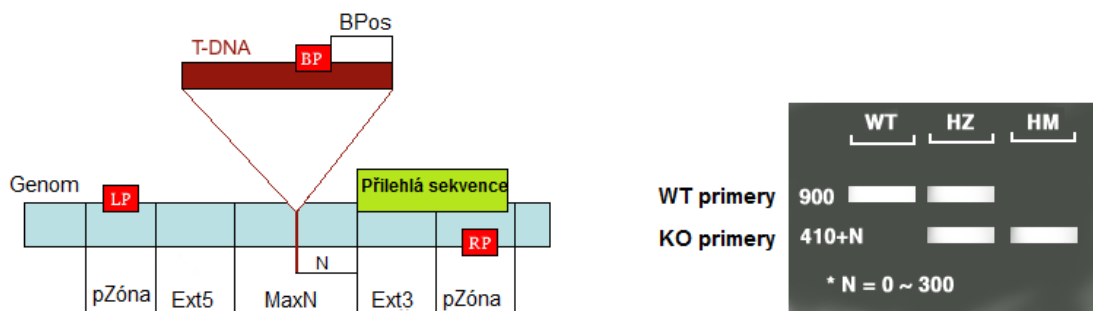
Lyofylizátor SPD 111V-23 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, USA)

4.4 Metody

4.4.1 Genotypizace

4.4.1.1 Princip selekce homozygotních linií

Selekce homozygotů je možno provést pomocí PCR a gelové elektroforézy. Pro každou linii je navržena sada primerů pro WT alelu a KO alelu, přičemž by měl vzniknout produkt o rozdílných velikostech. V příkladě, který je uveden na obr. 12, získáme s primery pro WT alelu (wild type = bez inzerce) produkt o velikosti 900 bází (od LP k RP), pouze v případě, že se jedná o WT nebo heterozygota. Pokud se bude jednat o homozygota (inzerce na obou chromozomech), nezískáme žádný signál.



Obr. 12 Princip selekce homozygotních linií. N – rozdíl mezi danou inzercí a přilehlou sekvencí. (obvykle 0 – 300 bází); MaxN – maximální rozdíl mezi skutečným místem inserce a sekvencí (300 bp); pZóna – místa nasedání primerů (100 bp); Ext5, Ext3 – místa mezi MaxN a pZónou, kde nemohou nasedat primery; LP a RP – levý a pravý primer; BP - T-DNA border primer; LB - levý primer T-DNA inserce; LB - levý primer T-DNA inserce; BPos – Vzdálenost od BP k místu inserce (upraveno podle <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Jestliže použijeme primery navržené pro KO alelu, získáme band o velikosti 410 + N bází (300 + N bází od RP k místu inserce, plus 110 bází od LB k levé hranici inserce) pro HM nebo HZ, nikoli pro WT.

Porovnáním těchto dvou reakcí, tedy PCR s WT primery a PCR s KO primery, můžeme zjistit, zda analyzovaná rostlina je WT, homozygot nebo heterozygot.

4.4.1.2 Izolace genomové DNA

Ke 2 - 4 listům umístěných do mikrozkušavek bylo přidáno 420 μ l gDNA extrakčního pufru se 150 μ l CIA (chloroform:isoamylalkohol, 24:1). Směs byla homogenizována pomocí wolframových kuliček v oscilačním mlýnku. Vzorek byl centrifugován po dobu 3 min při 21000 g. K supernatantu, který byl přenesen do nové mikrozkušavky, bylo přidáno 900 μ l 96% etanolu, obsah byl promíchán převrácením mikrozkušavky, inkubován 5 - 10 min při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn pipetou, pelet byl rozpuštěn v 200 μ l TE pufru. Dále bylo přidáno 50 μ l CIA, promícháno otočením mikrozkušavky. Následovala centrifugace 2 min při 21000 g. Supernatant byl přenesen do mikrozkušavky s 10 μ l 4 mol·dm⁻³ NaCl, bylo přidáno 360 μ l 96% ethanolu, promícháno, inkubováno 3 min, poté následovala centrifugace 8 min při 21000 g. Supernatant byl odstraněn, pelet byl rozpuštěn v 70% etanolu, roztok byl centrifugován 2 min, 21000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet rozpuštěn v 60 μ l TE.

4.4.1.3 PCR a gelová elektroforesa

Reakční směs pro PCR byla připravena podle tabulky 5, objem primerů se lišil v závislosti na dané linii (Tab. 7). PCR reakce byla nastavena podle tabulky 6, teplota nasedání primerů a doba elongace byla také pro každou linii jiná (Tab. 6, 7). Nejdříve byla vždy pro kontrolu reakce nastavena s primery pro aktin (ARAact), podle výsledků byla DNA vyředěna, příp. znovu vyizolována. Následně byla reakce nastavena s primery příslušnými pro danou linii (Tab. 8), a to jak pro WT alelu (přirozeně se vyskytující alelu), tak i pro KO alelu (umlčenou alelu).

Po ukončení PCR reakce byla reakční směs nanášena na 1% agarosový gel do elektroforetické komůrky, která byla napojena ke zdroji elektrického napětí (120 V). Gel byl vyfocen pomocí systému Gel Doc EZ System (Bio Rad, USA), obrázek byl následně vyhodnocen v programu Image Lab™ Software.

Tab. 5 Složení reakční směsi pro PCR.

Složka	Koncentrace	Objem	Výsledná koncentrace
<i>Go Taq</i> polymerasa		0,05 μl	
Green buffer	5 x	2,00 μl	1 x
MgCl ₂	25 mmol·dm ⁻³	1,00 μl	2,50 mmol·dm ⁻³
Primer	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,10 - 0,60 μl *	0,10 – 0,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *
dNTPs	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,20 μl	0,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
gDNA		1,00 μl	
Voda		do 10 μl	

*Množství se liší podle jednotlivých linií (Tab. 7).

Tab. 6 Nastavení PCR reakce.

	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	94	30 s	35 (30 pro aktin)
Nasednutí primerů	60 - 68*	30 s	
Elongace	72	1 - 2 min*	
Závěrečná elongace	72	5 min	1
Ochlazení	16	10 s	1

*Teplota, čas a počet cyklů závisí na dané linii (Tab. 7).

Tab. 7 Parametry nastavení PCR reakce pro jednotlivé linie *Arabidopsis thaliana*.

gen	linie	Název primeru	WT alela			KO alela			Počet cyklů		
			Objem použitých primerů	Teplota nasedání primerů	Doba elon-gace	Název primeru	Objem použitých primerů	Teplota nasedání primerů		Doba elon-gace	
AT4G29680	GK-078G06-NPP	GK-078G06_NPP_RP	0,4 µl	60°C	2 min	GK-078G06_NPP_RP	0,1 µl	60°C	1 min	35	
		GK-078G06_NPP_LP	0,6 µl			pAC	0,5 µl				
	GK-078G06	GK-078G06_RP	0,1 µl	60°C	2 min	GK-078G06_RP	0,5 µl	60°C	1 min	35	
		GK-078G06_LP	0,1 µl			pAC	0,3 µl				
	SALK_089106	SALK_089106_RP	0,3 µl	58°C	2 min	SALK_089106_R	0,3 µl	58°C	2 min	35	
		SALK_089106_LP	0,4 µl			LBb1.3	0,5 µl				
	SAIL 694 CO5	SAIL 694 CO5	SAIL 694 CO5 RP	0,3 µl	60°C	2 min	SAIL 694 CO5 RP	0,1 µl	60°C	1 min	35
			pDAP101_lb3	0,3 µl			GK-078G06_NPP_LP	0,5 µl			
	AT4G29690	SALK_024541	SALK_024541_RP	0,3 µl	62°C	2 min	SALK_024541_RP	0,3 µl	62°C	1 min	35
SALK_040308C_LP			0,4 µl			LBb1.3	0,3 µl				
SALK_040308C		SALK_024541_RP	0,3 µl	62°C	2 min	SALK_024541_RP	0,3 µl	62°C	1 min	35	
		SALK_040308C_LP	0,4 µl			LBb1.3	0,3 µl				
Aktin	ARAact	fw	0,2 µl	60°C	1 min					30	
		rev	0,2 µl								
Overexpresory	ZmZI	zacatek_fw	0,2 µl	68°C	1 min					35	
		konec_rev	0,2 µl								

Tab. 8 Sekvence použitých primerů.

Název primeru	Sekvence primeru
ARAact fw	5´-GCCATCCAAGCTGTTCTCTC-3´
ARAact rev	5´-GGTGGTGCAACGACCTTAAT-3´
SALK_024541 RP	5´-AGCTCAGGGAAAGTAGCCAAC-3´
SALK_024541 LP	5´-TCTTGATTCTCGAATTCGACG-3´
SALK_040308C RP	5´-TATAGTCCGGTGCTAGCGATG-3´
SALK_040308C LP	5´-TCTTGATTCTCGAATTCGACG-3´
SALK_089106 RP	5´-ATCAAATTTGAAGGCGATTTG-3´
SALK_089106 LP	5´-GCCTAGTAACGAAATCCCGAG-3´
SAIL 694 CO5 RP	5´-TGTGTGATTGTTCGAGAAGTGC-3´
SAIL 694 CO5 LP	5´-ACGTCGAATTCGAGAATCAAG-3´
FLAG 390 CO3 RP	5´-TTTTTCACAACTGCCATAACG-3´
FLAG 390 CO3 LP	5´-TGATCAAAATGGCTCAAGACC-3´
GK_078G06 RP	5´-CCTCCATCATCGCAGGTAAT-3´
GK_078G06 LP	5´-GCATCGGGTTCAACATCTTCC-3´
GK_078G06_NPP RP	5´-GCTGGGTATAGACCTGTGACG-3´
GK_078G06_NPP LP	5´-CACTGGGCTAGGCCCATAAA-3´
pDAP101_1b3	5´-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATAACAC-3´
LBb1,3	5´-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3´
Pac161_o8409	5´-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3´
ZmZI_zacatek_fw	5´-CCCCAACCCTACTCCATCGT-3´
ZmZI_konec_rev	5´-TCAGCTGGCGACACACCAT-3´

4.4.2 Analýza celkových cytokininů

Příprava rostlinného materiálu:

Z rostlin *Arabidopsis thaliana* byly sesbírány listy o hmotnosti přibližně 4 g. Listy byly zmrazeny v tekutém dusíku a poté vysušeny v lyofilizátoru.

Lyofilizované listy byly rozetřeny v třecí míse s tekutým dusíkem. Do mikrozkuhavky bylo naváženo 100 mg rozetřených listů, ke kterým byly přidány 2 skleněné kuličky a 1 ml Bielského pufu. Vzorky byly umístěny do oscilačního mlýnku na 3 min při 27 rps. Poté byly vzorky 5 min sonikovány a následně umístěny na třepačku na 45 min při 4°C. Následovala 15 min centrifugace při 21000 g, 4°C. Supernatant byl přenesen do 2 ml mikrozkuhavky, pelet byl re-extrahován stejným postupem dalším 1 ml Bielského pufu.

Purifikace cytokininů:

Pro 1. purifikaci byly použity kolonky Spe-ed SPE Cartridges, Octadecyl C18/18 (100 mg/ml; Applied Separations, USA). Kolonky byly nejdříve promyty 1 ml methanolu,

poté 2x 1 ml Bielského pufru. Po promytí byly na kolonky naneseny vzorky (2 ml) a promyty 1 ml Bielského pufru, které byly sbírány do skleněných zkumavek. Ty pak byly vysušeny v lyofilizátoru na objem menší než 750 μl (2 - 3 hod).

2. purifikace byla provedena s kolonkami Oasis® MCX 1cc (30 mg) Extraction cartridges (Waters, USA). Kolonky byly nejdříve promyty 2 x 1 ml methanolu, 2 x 1 ml destilované vody, 2x 1 ml 50% kyseliny dusičné, 2x 1 ml destilované vody, a 1 ml 1 mol·dm⁻³ kyseliny mravenčí. Vzorky byly smíchány s 2 ml 1 mol·dm⁻³ kyseliny mravenčí a sonikovány po dobu 5 min. Poté byly napipetovány na kolonky, zkumavky byly promyty 1 ml 1 mol·dm⁻³ kyseliny mravenčí, který byl potom také přenesen do kolonky a nakonec byla kolonka promyta ještě 1 ml 1 mol·dm⁻³ kyseliny mravenčí.

Po promytí byl na kolonku aplikován 1 ml elučního roztoku I a 2 ml elučního roztoku II. Eluát byl sbírán do skleněných zkumavek. Tyto zkumavky se 3 ml získaného vzorku byly znovu vysušeny v lyofilizátoru.

Preimunní kolonky (OlChemIm, ČR) byly promyty 3x 1 ml PBS. Odpařený vzorek byl zvortexován s 50 μl 70% ethanolu. Po rozpuštění bylo přidáno 450 μl PBS a opět promícháno. Takto připravený vzorek byl nanesen na kolonku, po protečení bylo přidáno dalšího 0,5 ml PBS. Poté byly kolonky zregenerovány (viz imunoafinitní čištění).

Imunoafinitní kolonky (OlChemIm, ČR) byly nejprve promyty 2x 3 ml PBS. Poté byl na kolonky opakovaně napipetován vzorek. Při pátém nanesení vzorku byla kolonka uzavřena, takže se v ní vzorek inkuboval. Po jednohodinové inkubaci byla kolonka otevřena. Vzorky byly po protečení ponechány na analýzu pro stanovení *O*-glykosidů. Kolonky byly promyty 3x 3 ml vody a následně byla provedena eluce 3x 1 ml methanolu. Eluát byl následně odpařen v lyofilizátoru do sucha.

Pro regeneraci byly kolonky promyty 9 ml destilované vody, 3 ml methanolu, 9 ml destilované vody a 6 ml PBS. Nakonec byly kolonky uzavřeny a naplněny roztokem PBS s 0,01% azidem sodným a byly uchovány při 4°C do dalšího použití.

Příprava vzorků pro HPLC:

K odpařenému vzorku bylo napipetováno 45 μl 10% methanolu, vzorky byly promíchány, dokud se pelet zcela nerozpustil a poté byly kvantitativně přeneseny do filtrů s póry o velikosti 0,2 μm (Costar Spin-X; Corning Inc., USA). Vzorky byly centrifugovány 10 min při 10000 g a 16°C, následně byly přeneseny do vialek pro HPLC.

Stanovení O-glykosidů:

Vzorky pro stanovení O-glykosidů získané z imunoafinitního čištění byly odpařeny do sucha, bylo přidáno 100 μl pufru (100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octan amonný, pH 5). Ke každému vzorku bylo přidáno 100 μl rozpuštěného enzymu β -glukosidasy (8 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$; Sigma-Aldrich, ČR). Poté byly vzorky umístěny do inkubátoru na 37°C, po 1 hod byly přemístěny na 10 min na 65°C. Vzorky byly kvantitativně přeneseny do mikrozkušavky, bylo přidáno 800 μl PBS. Následovala centrifugace 10 min při maximálních otáčkách, supernatant byl nanesen na imunokolonky. Následující postup byl stejný jako u imunoafinitního čištění, stejně tak příprava vzorků pro HPLC.

4.4.3 Měření aktivity enzymu

Příprava rostlinného materiálu

Semena byla vyseta do hlíny, po třech týdnech byly semenáčky přesazeny do truhlíků, kde byly pěstovány dalších 6 týdnů, než byly posbírány šešule.

Pro měření aktivity v semenáčcích byly rostliny *Arabidopsis* pěstovány v tekutém médiu. Semena byla vysterilizována a přenesena do Erlenmeyerovy baňky s MS médiem. Baňky byly na 3 dny umístěny do temna a chladu, poté byly přeneseny do skleníku na třepačku. Vzorky byly sbírány po 24 hod, 48 hod (pouze linie SALK 04) a po 10 dnech.

Příprava vzorků pro HPLC

Do mikrozkušavek bylo naváženo 100 mg šešulí nebo 10 denních semenáčků, 24 / 48 hod semenáčky byly naváženy po 10 mg. Spolu s wolframovou kuličkou bylo přidáno i dvojnásobné množství 50 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris/HCl, pH 8 (200 μl / 20 μl). Vzorky byly rozdrceny v oscilačním mlýnku (3 min, 25 rps). Poté byly mikrozkušavky umístěny na třepačku na 1 hodinu při 4°C.

Po uplynutí dané doby byly vzorky zcentrifugovány (15 min, 21000 g) a supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky. Do nových mikrozkušavek byl nejdříve rozpipetován enzym, poté byl přidán premix obsahující všechny ostatní komponenty (Tab. 9). Zkušavky byly promíchány na vortexu, stočeny na pikofuze a ihned umístěny do termobloku na 37°C, kde byly ponechány 1 hodinu. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 μl methanolu, promícháno otočením mikrozkušavky.

Tab. 9 Složení reakční směsi pro měření aktivity v šešulích / kořenech.

Složka	Objem
Enzym	10 / 5 μ l
1 M MgCl ₂	2 μ l
0,2 M DTT	1 μ l
10 mM FAD	1 μ l
McIlvaineův pufr	86 / 91 μ l
Celkový objem	100 μ l

Vzorky byly centrifugovány 10 min při 21000 g. Do nové mikrozkušavky bylo odebráno 45 μ l supernatantu, ke kterému bylo přidáno 155 μ l 15 mmol \cdot dm⁻³ mravenčanu, pH 4,5. Po 10 min inkubaci byly vzorky přeneseny do filtrů a stočeny v centrifuze (10000 g, 5 min). Nakonec byly vzorky napipetovány do vialek určených pro HPLC.

4.4.4 HPLC

HPLC analýza byla provedena na přístroji Nexera s UV/VIS detekcí (Shimadzu, Japonsko) na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 (RRHD 2,1 \times 50 mm 1,8-Micron; Agilent, USA). Mobilní fáze A byla 15 mmol \cdot dm⁻³ kyselina mravenčí, pH 4,5, mobilní fáze B byla 100% methanol (HPLC Super Gradient). Analýza na HPLC probíhala v methanolovém gradientu (Tab. 10) při průtoku 0,4 ml/min. Proces trval celkem 35 minut. Sledovaná vlnová délka byla 268 nm a 450 nm. Vyhodnocení bylo provedeno v programu LabSolutions 5.30.

4.4.5 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena metodou Bradfordové (Bradford, 1976) po linearizaci dle Ernsta (Ernst a Zor, 2010).

Tab. 10 Složení mobilní fáze v průběhu analýzy systémem HPLC-UV/VIS

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	100	0
2	95	5
23	60	40
24	50	50
25	5	95
28	5	95
30	95	5
35	100	0

4.4.6 Kořenové testy

Pracovalo se ve flowboxu. Semena byla přesypána do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky, bylo přidáno 800 μ l 70% ethanolu s 0,1% Tritonem X-100. Po 10 min třepání se nechaly semena usadit, ethanol byl odpipetován. K semenům bylo přidáno 800 μ l 70% ethanolu s 0,01% Tritonem X-100, několikrát promícháno, ethanol byl odpipetován. Tento postup byl opakován 3x. V posledním kroku byl ethanol nabrán i se semeny a přenesen na sterilní filtrační papír, kde se semena nechaly uschnout.

Semena byla vysázena na čtvercové Petriho misky s MS agarem do jedné řady, vždy po 10 semínkách. Celkem bylo vysázeno 35 semínek od každé linie.

Misky byly ponechány ve tmě a v chladu (4°C), po 3 dnech byly přemístěny do fytotronu. Misky byly postaveny vertikálně tak, aby kořínky rostly pouze na povrchu agaru. Po 3 dnech byly konce kořínků označeny fixem. Po týdnu od označení bylo provedeno vyhodnocení (další týden opakováno).

4.4.7 Testy klíčivosti

Semena *Arabidopsis* byla vysterilizována (viz kořenové testy) a vysázena na Petriho misky a do zeminy (sterilní i nesterilní semena). Misky byly ponechány 3 dny ve tmě a v chladu (4°C), poté byly přemístěny do fytotronu. Po týdnu bylo provedeno vyhodnocení (poměr vyklíčených / nevyklíčených rostlin).

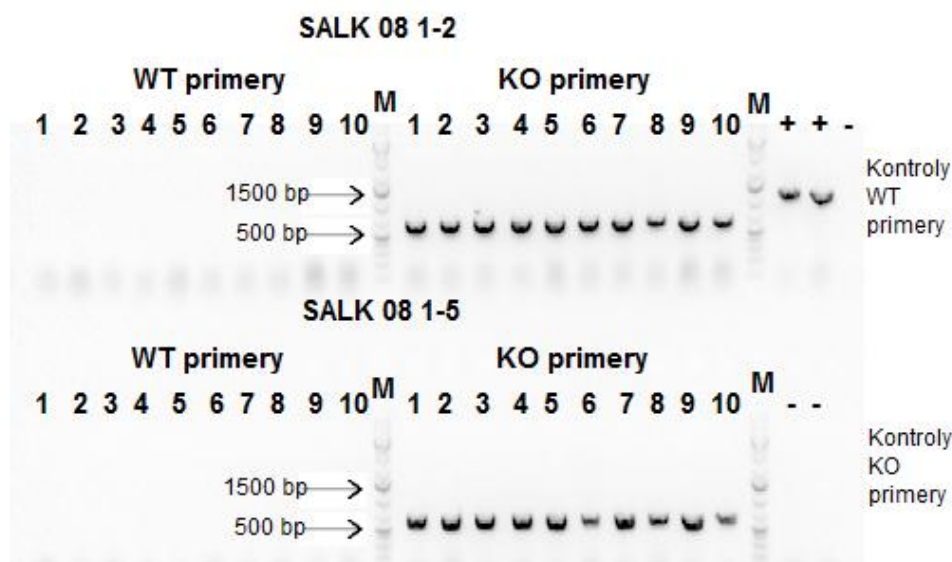
5 Výsledky

5.1 Genotypizace

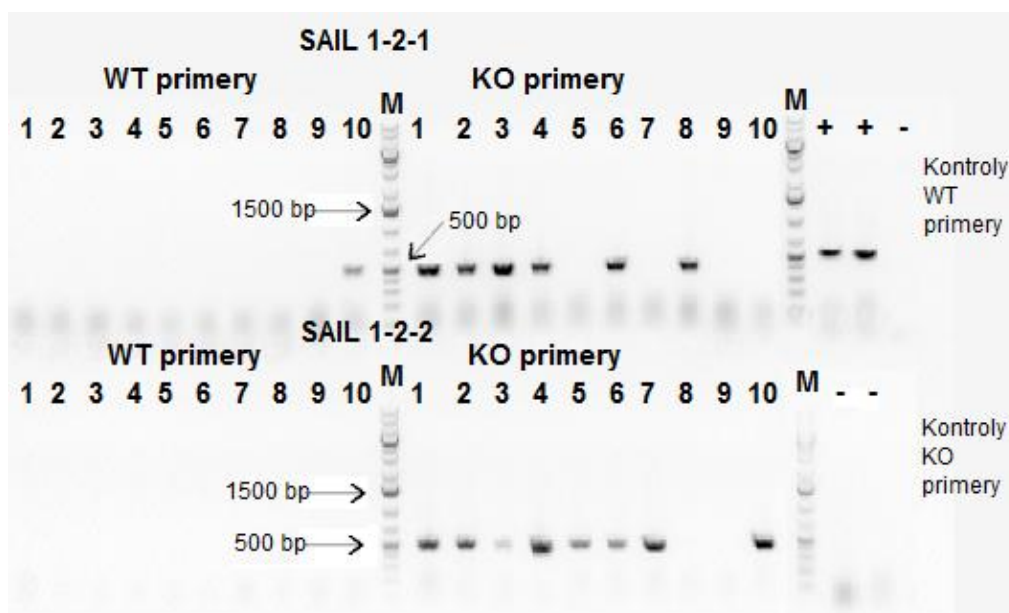
Dvou- až třítýdenní rostliny byly genotypizovány pomocí metody PCR. Nejdříve byla nastavena kontrolní reakce na aktin, poté až s primery příslušnými pro danou linii, a to vždy pro WT i KO alelu. Porovnáním těchto dvou reakcí bylo stanoveno, zda se jedná o homozygoty, heterozygoty, příp. WT (Obr. 13 - 15).

Konkrétním příkladem linie SALK 08 jsou SALK 08 1-2 a SALK 08 1-5. V obou případech se jedná o homozygoty (Obr. 13). S WT primery vyšly všechny reakce negativní, s výjimkou pozitivní kontroly (WT Ws pro linii FLAG, WT Col pro ostatní linie). Homozygotní rostliny byly nalezeny už u 3. generace, 4. generace byla vysazena a analyzována pro ověření.

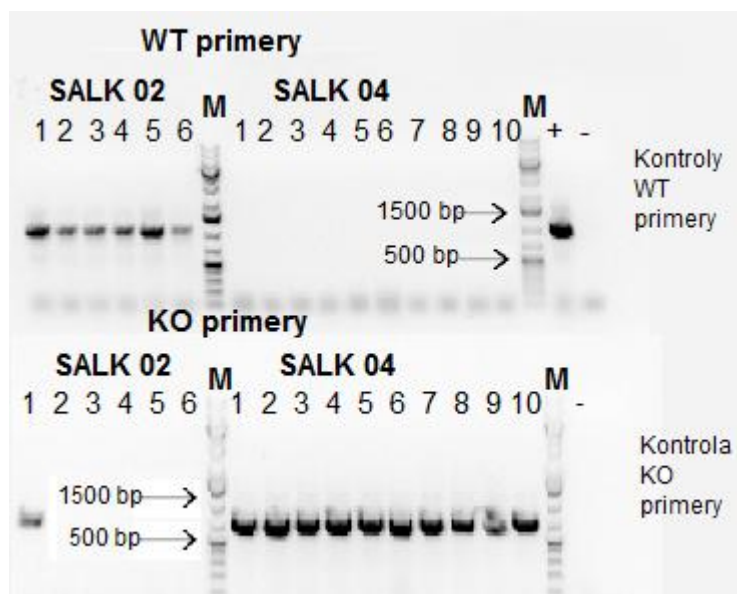
V případě SAIL 1-2-1-10 (Obr. 14) se jedná o WT, u rostlin 5, 7 a 9 není žádný signál (nevyšla ani kontrolní analýza s aktinem), je tedy pravděpodobné, že byla špatně vyizolována DNA. Zbytek jsou KO rostliny. Z linie SAIL 1-2-2 jsou všechny rostliny homozygotní, výjimkou jsou 8 a 9, u kterých rovněž nebyl žádný signál.



Obr. 13 Výsledek PCR a gelové elektroforézy linií SALK 08 1-2-(1-10) a SALK 08 1-5-(1-10) (4. generace). M – standard molekulových hmotností; + pozitivní kontrola; - negativní kontrola; 1 – 10 číslo konkrétní rostliny.



Obr. 14 Výsledek PCR a gelové elektroforézy linií SAIL 1-2-1-(1-10) a SAIL 1-2-2-(1-10) (5. generace). M – standard molekulových hmotností; + pozitivní kontrola; - negativní kontrola; 1 – 10 číslo konkrétní rostliny.



Obr. 15 Výsledek PCR a gelové elektroforézy linie SALK 02-(1-6; 2. generace) a SALK 04 3-2-(1-10; 4. generace). M – standard molekulových hmotností; + pozitivní kontrola; - negativní kontrola; 1 – 10 číslo konkrétní rostliny.



Obr. 16 Výsledek PCR a gelové elektroforézy overexpresorů OE 15-(1-20; 2. generace). M – standard molekulových hmotností; - negativní kontrola; 1 – 20 číslo konkrétní rostliny.

Na obr. 15 je srovnání linií SALK 02 a SALK 04 3-2. U linie SALK 02 byl nalezen pouze jeden heterozygot (SALK 02 1; Obr. 15). Oproti tomu v linii SALK 04 3-2 byly všechny rostliny homozygotní (homozygotní byla již rodičovská rostlina).

U overexpresorů bylo nutné ověřit, zda obsahují gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu nebo zda se jedná o WT (Obr. 16). Celkem bylo analyzováno asi 25 linií overexpresorů. Selektce se podařila už u první generace, u linie OE 15 byly WT rostliny pouze 4 z celkových 20 (1, 2, 4 a 9).

Podařilo se získat homozygoty u linií SALK 04, SALK 08, SAIL, FLAG a GK. Homozygoti byli získáni většinou ve 3. nebo 4. generaci. U linie SALK 02 byla selektce neúspěšná, ani po analýze několika desítek rostlin se nepodařilo vyizolovat žádného homozygota. Při poslední analýze byla získána pouze jedna heterozygotní rostlina.

5.2 Stanovení celkových cytokininů

Pro stanovení celkových cytokininů byly použity listy overexpresorů, konkrétně linií OE 15, OE 22 a OE 2-11, jako kontrolní vzorek byl použit WT Col. Bylo sledováno množství vzniklých cytokininů, konkrétně *trans*-zeatin-9-glukosidu (tZ9G), *trans*-zeatinu (tZ), N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adeninu (iPR), dihydrozeatin ribosidu (DZR) a *cis*-zeatin ribosidu (cZR). Poslední dva jmenované metabolity nebylo možné na chromatogramu za daných podmínek rozlišit, proto jsou v tabulce uváděny dohromady (Tab. 9).

Po ošetření β -glukosidasou byly vzorky opět přečištěny na afinitních kolonkách. Byly sledovány následující metabolity - *trans*-zeatin-9-glukosid-*O*-glukosid (tZ9GOG), *trans*-zeatin-*O*-glukosid (tZOG), N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin-*O*-glukosid (iPROG), dihydrozeatin ribosid-*O*-glukosid (DZROG) a *cis*-zeatin ribosid-*O*-glukosid (cZROG; Tab. 10).

Při obou analýzách se v grafu objevoval pik neznámého metabolitu, jenž se nepodařilo určit. Jelikož jeho velikost byla ve srovnání s ostatními metabolity nezanedbatelná a pik se objevoval u všech vzorků, je také zahrnut do výsledků. Podle retenčního času by se mohlo jednat o 3-glukosid, ale protože jsme neměli standard, nemohli jsme jednoznačně určit identitu tohoto metabolitu. V tabulce je uveden jako „Neznámý“ (Tab. 11, 12).

Tab. 11 Stanovení celkových cytokininů. Tabulka udává plochy píků daných metabolitů.

	Název linie	Neznámý	tZ9G	tZ	DZR / cZR	iPR
Průměr	WT Col	9687	8198	2051	13447	1378
	O/E 15	12824	9948	2874	12805	1349
	O/E 22	7613	6845	1270	11523	627
	O/E 2-11	8503	7595	1902	16131	1710
	WT Col	672	1273	283	3320	390
Průměrná odchyška	O/E 15	920	232	210	1551	157
	O/E 22	263	387	110	3227	279
	O/E 2-11	553	1001	598	195	794
	O/E 15/WT Col	0,123	0,133	0,070	0,820	0,929
T test	O/E 22/WT Col	0,021	0,227	0,025	0,670	0,151
	O/E 2-11/WT Col	0,220	0,684	0,847	0,297	0,749

Tab. 12 Stanovení O-glukosidů. Tabulka udává plochy píků daných metabolitů.

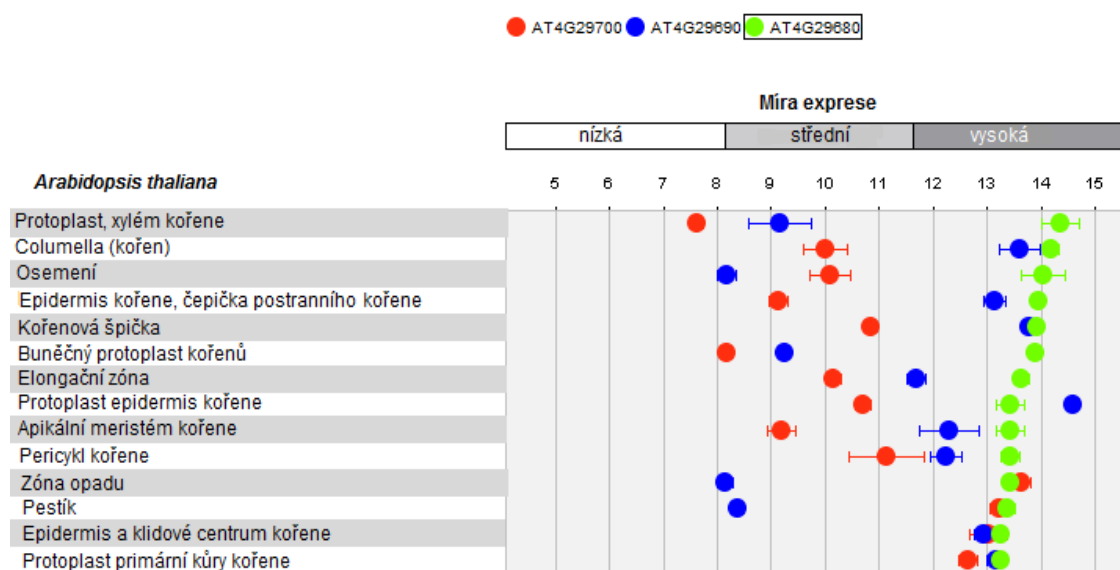
	Název linie	Neznámý OG	tZ9GOG	tZOG	DZROG /cZROG	iPOG
Průměr	WT Col	369	1131	4637	1364	466
	O/E 15	1066	1073	5374	1217	428
	O/E 22	510	810	4429	1327	845
	O/E 2-11	0	1027	4034	1367	580
	WT Col	369	290	460	31	466
Průměrná odchyška	O/E 15	35	38	227	164	38
	O/E 22	510	285	375	223	680
	O/E 2-11	0	85	28	160	1
	O/E 15/WT Col	0,045	0,777	0,140	0,533	0,898
T test	O/E 22/WT Col	0,832	0,449	0,709	0,896	0,678
	O/E 2-11/WT Col	0,183	0,640	0,162	0,987	0,704

Cytokinininy byly měřeny vždy ve dvou nezávislých vzorcích dané linie, reakce s WT Col byla nastavena se čtyřmi vzorky. V tabulkách jsou uvedeny již zprůměrované hodnoty i s odchylkami. T test byl proveden k porovnání, jak se výsledky měření u overexpresorů liší od výsledků měření u WT.

Porovnáním naměřených hodnot overexpresorů a WT nebyly zjištěny výrazné změny. Výjimku tvořil neznámý metabolit a tZ u linie OE 22, kde byly hodnoty snižené oproti WT Col. U linie OE 15 byla naopak zaznamenána vysoká hodnota neznámého OG. Ostatní výsledky ale odpovídají výsledkům kontrolních rostlin, enzym tedy zřejmě nemá významný vliv na množství celkových cytokininů.

5.3 Aktivita enzymu

Aktivita enzymu byla měřena v homozygotních rostlinách KO linií. Podle Genevestigatoru je nejvyšší exprese genu AT4G29700 v květech a šesulích, AT4G29690 se exprimuje především v kořenech, AT4G29680 jak v květech, tak i v kořenech (Obr. 17). Aktivita enzymu by měla být nejvyšší v době germinace, konkrétně po 24 – 48 hodinách (Obr. 18, 19).



Obr. 17 Míra exprese genů AT4G29700, AT4G29690, AT4G29680 v různých částech rostliny (vytvořeno programem Genevestigator).

Aktivita enzymu v šešulích byla měřena v liniích SALK 04, SALK 08, SAIL, GK a příslušných WT. Semena rostlin byla nasazena do zeminy, šešule byly sbírány asi 6 týdnů po vysazení. Od každé linie bylo změřeno 8 biologických replikátů (Tab. 13).

Aby mohla být změřena aktivita enzymu v kořenech, byla semena pěstována v tekutém MS médiu a aktivita byla měřena v celých semenáčcích. Aktivita byla měřena v liniích SALK 04, SALK 08, SAIL, FLAG a příslušných WT. Vzorky byly sbírány ve třech časových intervalech - 24 hodin (Tab. 14), 48 hodin (Tab. 15) a 10 dní (Tab. 16). Každá linie byla vysazena po trojicích. Pro měření po 48 hodinách byly použity pouze 2 vzorky linie SALK 04 a 2 vzorky WT Col.

Tab. 13 Specifická aktivita enzymu v šešulích.

Linie	SALK 04	SALK 08	SAIL	FLAG	GK	WT Col	WT Ws
Specifická aktivita (pkat·mg ⁻¹)	0,761	0,586	3,359	0,841	0,926	2,618	0,812
	1,405	0,434	2,437	1,088	2,037	1,934	1,009
	1,773	1,858	2,034	1,598	1,867	1,788	0,829
	1,652	1,483	1,656	1,378	2,812	1,504	0,736
	1,626	0,862	2,011	2,169	1,334	2,052	1,348
	1,208	0,841	1,702	1,232	2,080	2,044	1,187
	1,333	0,215	1,801	0,863	1,710	1,855	1,896
	1,618	0,511	1,786	1,133	1,453	1,940	1,472
Průměr	1,422	0,849	2,098	1,288	1,777	1,967	1,161
Odchylka	0,245	0,414	0,400	0,320	0,421	0,203	0,315
T test	0,004	0,000	0,578	0,553	0,428		

Tab. 14 Specifická aktivita enzymu v semenáčcích starých 24 hodin.

Linie	SALK 04	SALK 08	SAIL	FLAG	WT COL	WT Ws
Specifická aktivita (pkat·mg ⁻¹)	1,260	0,228	1,677	0,806	0,864	2,452
	1,073	0,121	0,673	1,212	0,677	1,097
	1,081	0,195	1,302	4,580	0,602	2,718
Průměr	1,138	0,182	1,217	2,199	0,714	2,089
Odchylka	0,081	0,040	0,363	1,587	0,100	0,661
T test	0,559	0,293	0,593	0,938		

Tab. 15 Specifická aktivita enzymu v semenáčcích starých 48 hodin.

Linie	WT Col	SALK 04
Specifická aktivita (pkat/mg)	0,496	0,853
Průměr	0,489	1,672
Odchylka	0,493	1,263
T test	0,004	0,410
		0,311

Tab. 16 Specifická aktivita enzymu v semenáčcích starých 10 dní.

Linie	SALK 04	SALK 08	SAIL	FLAG	WT COL	WT Ws
Specifická aktivita (pkat·mg ⁻¹)	0,457	0,235	0,276	1,224	0,617	0,219
	0,451	0,219	0,275	0,913	0,503	0,222
	-	0,326	0,282	1,177	0,353	0,235
Průměr	0,454	0,260	0,278	1,105	0,491	0,225
Odchylka	0,003	0,044	0,003	0,128	0,092	0,006
T test	0,673	0,077	0,108	0,012		

V tabulkách 13 - 16 jsou uvedeny specifické aktivity enzymu. Byla sledována přeměna FAD na FMN. Z naměřených hodnot byla vypočítána celková aktivita enzymu. Následně byla na spektrofotometru změřena koncentrace proteinů a aktivita byla přepočítána na specifickou.

V šesulích byly naměřeny nejvyšší aktivity. Výjimkou byla KO linie FLAG i s WT Ws, kde byla aktivita skoro 2x nižší než v 24 hodin starých semenáčcích.

Nejvyšší aktivita enzymu v semenáčcích byla změřena ve vzorcích starých 24 hodin. Ve vzorcích sbíraných po 48 hodinách byla specifická aktivita srovnatelná s hodnotami vzorků po 24 hodinách, u WT Col je hodnota mírně nižší. Po 10 dnech se aktivita snížila několikanásobně.

Linie SALK 08 vykazovala nejnižší aktivity ze všech linií při všech měřeních. V šesulích byla aktivita vyšší než v semenáčcích. V semenáčcích navíc nebyl pozorován rozdíl mezi 24 hodinovými a 10 denními semeny.

5.4 Kořenové testy

Bylo vysazeno 35 semen od každé linie WT Col, WT Ws, SALK 04, SALK 08, SAIL, FLAG, GK, OE 15, OE 22 a OE 2-11. Na každou misku bylo vysazeno v řadě 10 semen, vždy jedno semeno od každé linie. Semena byla vysázena v různém pořadí.

První vyhodnocení bylo provedeno týden od označení kořínků. Misky byly naskenovány a analyzovány v programu WinRHIZO. Program dokáže měřit délku a

plochu kořene, dokáže také spočítat počet postranních kořenů. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány (Tab. 17), navíc byl vypočítán počet postranních kořenů na 1 cm délky hlavního kořene.

U linií SALK 04, SALK 08 a SAIL nebyly oproti WT Col viditelné žádné velké změny. Linie FLAG měla oproti WT Ws delší kořen i více postranních kořenů. Ovšem poměr postranních kořenů na 1 cm délky byl stejný. Taktéž u overexpresorů a linie GK byly naměřeny vyšší hodnoty než tomu bylo u WT Col.

Měření bylo opakováno následující týden (Tab. 18). V tomto případě byly rozdíly mezi jednotlivými liniemi minimální. Jediným případem, kdy byly hodnoty mírně zvýšené, byla linie GK. Poměr postranních kořenů k délce kořene odpovídal hodnotám z prvního měření.

Tab. 17 Analýza kořenů po 1. týdnu.

	délka kořene (cm)		povrch kořene (cm ²)		postranní kořeny		postranní kořen /1 cm
	průměr	směr. odchylka	průměr	směr. odchylka	průměr	směr. odchylka	
WT Col	1,70	0,56	0,06	0,02	8	4	5
WT Ws	1,34	0,43	0,04	0,02	6	2	5
SALK 04	1,75	0,54	0,05	0,02	8	2	5
SALK 08	1,75	0,92	0,06	0,04	8	3	4
SAIL	1,84	0,49	0,05	0,02	6	2	3
FLAG	1,98	0,62	0,05	0,02	10	4	5
GK	2,77	0,63	0,09	0,02	10	5	4
OE 15	2,41	0,68	0,06	0,03	7	3	3
OE 22	2,32	0,50	0,08	0,02	8	3	4
OE 2-11	2,01	0,51	0,06	0,02	10	3	5

Tab. 18 Analýza kořenů po 2 týdnech.

	délka kořene		plocha kořene		postranní kořeny		postranní kořen /1 cm
	průměr	směr. odchylka	průměr	směr. odchylka	průměr	směr. odchylka	
WT Col	11,66	5,07	0,41	0,20	42	19	4
WT Ws	10,27	2,92	0,38	0,12	43	12	4
SALK 04	10,44	5,11	0,34	0,16	34	20	3
SALK 08	11,02	6,05	0,40	0,26	39	19	3
SAIL	11,25	4,74	0,38	0,19	48	24	4
FLAG	10,24	2,55	0,34	0,11	42	13	4
GK	14,00	4,14	0,48	0,18	47	16	3
OE 15	12,38	4,45	0,41	0,16	45	17	4
OE 22	11,72	4,31	0,41	0,18	40	16	3
OE 2-11	10,54	3,69	0,35	0,15	37	14	3

5.5 Test klíčivosti

Jelikož při kořenových testech byla pozorována snížená klíčivost semen u některých linií, byl proveden test na klíčivost.

Semena byla vysazena třemi různými způsoby. První skupinu tvořila vysterilizovaná semena, která byla nasazena do ½ MS agaru. Druhá skupina byla vysterilizovaná semena vysazená do zeminy a poslední skupina byla vysázena do zeminy bez předchozí sterilizace.

Způsoby vysazení byly voleny tak, aby se zjistilo, zda je klíčivost ovlivněna sterilizací nebo složením agaru.

Týden od vysazení byla spočítána vyklíčená a nevyklíčená semena. Bylo vypočítáno procento vyklíčených semen (Tab. 19). Z výsledků vyplývá, že semena klíčila nejlépe ve sterilních podmínkách v Petriho miskách s agarem. Naopak nejhůře vyklíčila nesterilní semena v zemině. Téměř všechny overexpresory a KO linie měly vyšší procento klíčivosti než WT rostliny. Výjimku tvořila linie SALK 04, kde vyklíčilo pouze 20 – 30 % semen. Linie SALK 08 měla hodnoty srovnatelné s WT Col. Výrazný pokles klíčivosti byl pozorován i u WT Ws v případě nesterilních semen. Vyrostlo pouhých 21 % semen, zatímco sterilních semen vyrostlo více než 60 %.

Tab. 19 Procenta vyklíčených semen.

	Sterilní semena (agar)	Sterilní semena (zemina)	Nesterilní semena (zemina)
WT Col	81,0	62,8	77,2
WT Ws	62,0	73,4	21,2
SALK 04	23,4	18,9	34,8
SALK 08	90,8	59,8	76,5
SAIL	98,5	86,4	90,9
FLAG	98,5	74,2	65,2
GK	97,7	87,9	85,6
OE 15	100,0	94,7	86,4
OE 22	99,2	88,6	75,0
OE 2-11	97,0	84,8	78,8

6 Diskuze

Jak již bylo zmíněno dříve, gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu se uplatňuje při neenzymatické přeměně *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin. Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověřit vliv umlčení homologních genů NPP *in planta*. Předpokládalo se snížení aktivity enzymu v místech jeho nejvyšší exprese, tedy v šesulích a kořenech, podle Genevestigatoru.

Také se ověřovalo, zda má snížení aktivity vliv na hladinu cytokininů. Změny hladiny cytokininů v určitých částech rostliny způsobují změny ve fyziologických funkcích, což by se mohlo projevit na fenotypu rostliny.

Byly sledovány změny v aktivitě enzymu a ve fenotypu celkem 5 KO linií: SALK 04, SALK 08, SAIL, FLAG a GK.

U linie SALK 04 byla naměřena nižší aktivita v šesulích než u WT Col. V semenáčcích byla aktivita naopak vyšší, po 10 dnech růstu byla aktivita srovnatelná s WT Col. Kořenové testy neprokázaly změny ve fenotypu. Kořeny dosahovaly stejné průměrné délky jako WT Col, počet postranních kořenů byl taktéž shodný. Oproti tomu klíčivost semen této linie byla snižena, a to jak u sterilních, tak i nesterilních semen. Vyklíčilo až o 50 % méně KO semen než WT.

Pro linii SALK 08 byla typická velmi nízká aktivita. Ta byla naměřena jak v šesulích, tak i v semenáčcích. Aktivita byla nejnižší ze všech testovaných linií. Avšak testy klíčivosti a kořenové testy neukázaly žádné změny oproti kontrolním rostlinám.

Měření aktivity v šesulích u linie SAIL poskytlo výsledky srovnatelné s kontrolními rostlinami. V semenáčcích byl sledován velký pokles v aktivitě 10 dnů starých rostlin oproti těm po 24 hodinách. Aktivita klesla více než 4x. Zatímco při prvním měření byla aktivita vyšší než u WT Col, u měření po 10 dnech tomu bylo naopak. Umlčení genu nemělo vliv na délku kořene ani počet postranních kořenů. Bylo sledováno pouze zvýšení klíčivosti semen oproti kontrolním rostlinám.

U linie FLAG byla aktivita enzymu v semenáčcích nejvyšší ze všech linií. Ačkoli po 24 hodinách byla aktivita srovnatelná s kontrolou WT Ws, po 10 dnech aktivita klesla na poloviční hodnotu, ale proti WT Ws byla stále zvýšená. V šesulích byla aktivita podobná jako u kontroly. U této linie byla pozorována jak zvýšená klíčivost, tak i mírně zvýšený růst kořene, než tomu bylo u kontrolních rostlin. Při druhém měření kořenů po 2 týdnech ale rozdíl nebyl již tak patrný.

Poslední KO linií byla linie GK. U této linie byla aktivita enzymu měřena pouze v šešulích. Výsledky byly mírně nižší než u WT Col. Při kořenových testech bylo zjištěno, že kořeny jsou poněkud delší, ovšem poměr postranních kořenů na 1 cm délky odpovídal výsledkům kontrolních rostlin. Klíčivost byla také vyšší oproti WT.

Jako poslední byly provedeny analýzy s overexpresory. Byly nastaveny reakce pro stanovení celkových cytokininů a jejich *O*-glukosidů. Výsledky ukázaly, že nadexprese enzymu nemá vliv na množství celkových cytokininů v rostlinách. Kořenové testy ukázaly, že délka kořene byla oproti kontrolním rostlinám o něco vyšší, ale po měření po 2 týdnech už rozdíly nebyly patrné. Taktéž byla prokázána vyšší klíčivost, sterilní semena dosahovala klíčivosti více než 85 %.

Bylo prokázáno, že aktivita enzymu se liší u jednotlivých KO linií a to jak v šešulích, tak i v semenáčcích. Nejvyšší aktivity enzymu byly naměřeny v šešulích. Potvrdilo se, že v semenáčcích byla aktivita nejvyšší v době germinace, tedy 24 – 48 hodin po vysazení. Specifické aktivity byly nižší než u kontrolních rostlin, změny v aktivitě enzymu ale neměly významný vliv na hladinu cytokininů v rostlinách, nebyly pozorovány ani žádné významné změny ve fenotypu.

Arabidopsis obsahuje 3 isoformy nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesteras. Umlčením genu bylo dosaženo snížení aktivity oproti kontrolním rostlinám. Je pravděpodobné, že přípravou několikanásobného knock-outa by bylo možné sledovat výraznější změny v rostlinách, které by se mohly projevit i změnou fenotypu, jelikož se CK uplatňují jako důležité regulační faktory v rostlině. Pozitivně ovlivňují vývoj listů a negativně růst kořenů. Nedostatek cytokininů vede ke zpomalení růstu listů. Bylo zjištěno, že nedostatek cytokininů u transgenních rostlin *Arabidopsis* a tabáku vede ke zvýšenému vývoji kořenového systému, produkuje se více postranních kořenů a naopak je inhibován růst nadzemní části rostliny (Werner *et al.*, 2001; 2003).

7 Závěr

Teoretická část této diplomové práce byla věnována charakteristice cytokininů, jejich biosyntéze, metabolismu a degradaci. Druhá část se zabývala enzymy skupiny nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesteras, jejich charakteristice a výskytu.

V experimentální části byly pomocí PCR a gelové elektroforézy vyselektováni homozygoti linií SALK 04, SALK 08, SAIL, FLAG a GK. Z šešulí a semenáčků homozygotních rostlin byl vyextrahován enzym nukleotidpyrofosfatas/fosfodiesterasa, jehož aktivita byla měřena na HPLC. Po změření proteinů metodou Bradfordové byla celková aktivita přepočítána na specifickou. Výsledky byly porovnány s příslušnými kontrolními rostlinami. Dále byla změřena hladina celkových cytokininů v overexpresorech.

Abychom zjistili, zda umlčení genu má vliv na fenotyp rostliny, byly provedeny kořenové testy a testy klíčivosti. U některých linií byl zaznamenán mírný nárůst kořenů oproti kontrolním rostlinám, taktéž byly zaznamenány změny v klíčivosti.

8 Literatura

- Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**, 5994-5998.
- Åstot C., Dolezal 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.
- Baková M. (2013) *Příprava rekombinantní kukuřičné nukleotidpyrofosfatasy za účelem ověření její participace na metabolismu cytokininů*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká Republika.
- Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T. a Brand L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**, 4776-4780.
- Bassil N. V., Mok D. W. S., Mok M. C. (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*. **102**, 867-872.
- Blackwell J. R., Horgan R. (1993) Cloned *Agrobacterium tumefaciens* ipt1 gene product, DMAPP: AMP isopentenyl transferase. *Phytochemistry*. **34**, 1477–1481.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-54.
- 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.
- Deissler H., Lottspeich F., Rajewsky M. F. (1995) Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130^{RB13-6} reveals relationship to human and murine PC-1. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 9849–9855.
- Duan R. D., Bergman T., Xu N., Wu J., Cheng Y., Duan J. X., Nelander S., Palmberg C., Nilsson, A. (2003) Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 38528–38536.
- Emery R. J. N., Leport L., Barton J. E., Turner N. C., Atkins C. A. (1998) *Cis*-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology*. **117**, 1515–1523.
- Emery R. J. N., Ma Q., Atkins C. A. (2000) The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiology*. **123**, 1593–1604.
- Entsch B., Letham D. S. (1979) Enzymic glycosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Science Letters*. **14**, 205-212.
- Ernst O. a Zor T. (2010) Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments*. **38**, 1-7.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*. **62**, 2431–2452.
- Frébortová J., Fraajie MW., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu KD., English JT., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones electron acceptors. *Biochemical Journal*. **380**, 121–130.
- Funakoshi I., Kato H., Horie K., Yano T., Hori Y., Kobayashi H., Inoue T., Suzuki H., Fukui S., Tsukahara M. (1992): Molecular cloning of cDNAs for human fibroblast nucleotide pyrophosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **295**, 180–187.

- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P. I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*. **62**, 2827-2840.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry*. **268**, 450–461.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*. **26**, 255–267.
- Gaudinová A., Dobrev P. I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Fridecký D., Motyka V. (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*. **24**, 188-200.
- Giganti A., Rodriguez M., Fould B., Moulharat N., Coge F., Chomarat P. (2008) Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 7776–7789.
- Gijsbers, R., Ceulemans H., Stalmans W., Bollen M. (2001): Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 1361–1368.
- Goding J. W., Grobber B., Slegers H. (2003): Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et biophysica acta* **1638**, 1-19.
- Goding J. W., Terkeltaub R., Maurice M., Deterre P., Sali A., Belli S. I. (1998): Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunological Reviews* **161**, 11–26.
- Goldfine I. D., Maddux B. A., Youngren J. F., Reaven G., Accili D., Trischitta V. (2008): The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities. *Endocrine Reviews* **29**(1), 62-75.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. **49**, 161-169.
- Grupe A., Alleman J., Goldfine I. D., Sadick M., Stewart T. A. (1995) Inhibition of insulin receptor phosphorylation by PC-1 is not mediated by the hydrolysis of adenosine triphosphate or the generation of adenosine. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 22085–22088.
- Hashimoto T., Okudaira S., Igarashi K., Hama K., Yatomi Y., Aoki J. (2012) Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATXdelta, with a four-amino acid deletion. *Journal of Biochemistry*, **151**, 89–97.
- Hecht S., Eisenreich W., Adam P., Amslinger S., Kis K., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F. (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, 14837–14842.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J., Wareing P. F. (1975) A New Cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008

- Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ (2004) *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 47822-47832.
- Houben A.J., van Wijk X.M., van Meeteren L.A., van Zeijl L., van de Westerlo E.M., Hausmann J. (2013) The polybasic insertion in autotaxin alpha confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 510–519.
- Hwang I., Sakakibara H. (2006) Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiologia Plantarum*. **126**, 528–538.
- Johnson K., Vaingankar S., Chen Y., Moffa A., Goldring M. B., Sano K., Jin-Hua P., Sali A., Goding J., Terkeltaub R. (1999) Differential mechanisms of inorganic pyrophosphate production by plasma cell membrane glycoprotein-1 and B10 in chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism* **42**, 1986–1997.
- Joye I. J., Beliën T., Brijs K., Proost P., Soetaert W., Delcour J. A. (2010): Characterization of the first wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase resembling mammalian counterparts. *Journal of Cereal Science* **51**, 326–336.
- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*. **42**, 677–685.
- Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*. **116**, 233-239.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 14049–14054.
- Kögl F. a Kostermans D. G. F. R. (1934) Hetero-Auxin als Stoffwechselprodukt Niederer Pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. **228**, 113-121;
- 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., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **21**, 3152–3169.
- Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences*. **8**, 569–573.
- Letham D. S. (1994) Cytokinins as phytohormones—sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: *Cytokinins—Chemistry, activity, and function* (Mok, D. W. S.; Mok, M. C.). Boca Raton, FL: CRC Press; 57–80.
- Lichtenthaler H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **50**, 47–65
- Lindner A. C., Lang D., Seifert M., Podlešáková K., Novák O, Strnad M., Reski R., von Schwanberg K. (2014) Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. **65**, 2533–2543.

- Liu S., Umezu-Goto M., Murph M., Lu Y., Liu W., Zhang F. (2009) Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* **15**, 539–550.
- Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989) An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiology*. **90**, 1630-1635.
- Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999a) Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase of *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**, 284-289.
- Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999b) A gene encoding the cytokinin enzyme *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*. **120**, 553-557.
- Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E., Mok D. W. S. (2001) A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, 5922-5926.
- Mauk C. S., Langille A. R. (1978) Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L: *cis*-zeatin riboside in the potato plant: its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. *Plant Physiology*. **62**, 438–442.
- Medda R., Padiglia A., Lorrai A., Murgia B., Agrò A. F., Castagnola M., Floris G. (2000) Purification and properties of a nucleotide pyrophosphatase from lentil seedlings. *Journal of Protein Chemistry* **19**, 209-214.
- Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of American Chemical Society*. **77**, 1392–1392.
- Mok M. C., Martin R. C., Mok W. S. (2000) Cytokinin: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. **36**, 102-107.
- Nanjo Y., Oka H., Ikarashi N., Kaneko K., Kitajima A., Mitsui T., Munoz FJ., Rodriguez-Lopez M., Baroja-Fernandez E., Pozueta-Romero J., (2006) Rice plastidial *N*-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-Golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant cell*. **18**, 2582-2592.
- Narita M., Goji J., Nakamura H., Sano K. (1994) Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 28235–28242.
- Rohmer M (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565–574.
- Oda Y., Kuo M-D., Huang S. S., Huang J. S. (1991): The plasma cell membrane glycoprotein, PC-1, is a threonine-specific protein kinase stimulated by acidic fibroblast growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 16791–16795.
- Pačes V, Werstiuk E, Hall R. H. (1971) Conversion of N6-(D2-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*. **48**, 775–778.
- Pintus F., Spano D., Bellelli A., Angelucci F., Floris G., Medda R. (2009): Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Euphorbia characias* latex: purification and characterization. *Plant Science* **177**, 636-642.
- Quesnelle P. E., Emery R. J. N. (2007) *Cis*-cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*. **85**, 91–103.
- Sakagami H., Aoki J., Natori Y., Nishikawa K., Kakehi Y., Natori Y., Arai H. (2005): Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide

- pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 23084–23093.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*. **57**, 431–449.
- Sakamoto T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inukai Y., Sato Y., Matsuoka M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology*. **142**, 54–62.
- SALK Institute for Biological Studies Home Page: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> (20.4.2015).
- Salvucci M. E., Craftsbrandner S. J., (1995): Purification and properties of a unique nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I that accumulates in soybean leaves in response to fruit removal. *Plant Physiology* **108**, 1269–1276.
- Soderberg T., Poulter C. D. (2000) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate: tRNA dimethylallyltransferase: essential elements for recognition of tRNA substrates within the anticodon stem-loop. *Biochemistry* **39**, 6546–6553.
- Spanò D., Pintus F., Pes R., Medda R., Floris G, (2011) Purification and characterisation of a soluble nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruits. *Food research international*, **44**, 2264–2270.
- Stefan C., Jansen S., Bollen M. (2005): NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 542–550.
- Stefan C., Jansen S., Bollen M. (2006): Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signalling*. **2**, 361–370.
- Stracke M. L., Krutzsch H. C., Unsworth E. J., Arestad A., Cioce V., Schiffmann E. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 2524–2529.
- Sun, J., Niu, Q. W., Tarkowski, P., Zheng, B., Tarkowska, D., Sandberg, G., Chua, N. H., Zuo, J. (2003). The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiology*. **131**, 167–176.
- Takagi M., Yokota T., Murofushi N., Ota Y., Takahashi N. (1985) Fluctuation of endogenous cytokinin contents in rice during its life cycle quantification of cytokinins by selected ion monitoring using deuterium-labelled internal standards. *Agricultural and Biological Chemistry*. **49**, 3271–3277.
- Takahashi T., Old L. J., Boyse E. A. (1970): Surface alloantigens of plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* **131**, 1325–1341.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 26405–26410.
- Takei K., Dekishima Y., Eguchi T., Yamaya T., Sakakibara H. (2003). A new method for enzymatic preparation of isopentenyladenine-type and trans-zeatin-type cytokinins with radioisotope labeling. *Journal of Plant Research*. **116**, 259–263.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 41866–41872.
- Tokumura A., Majima E., Kariya Y., Tominaga K., Kogure K., Yasuda K. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 39436–39442.

- Veach Y. K., Martin R. C., Mok D. W. S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M. C. (2003) O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology*. **131**, 1374–1380.
- Vreman H. J., Skoog F. (1972) Cytokinins in *Pisum* transfer ribonucleic acid. *Plant Physiology*. **49**, 848–51.
- Vreman H. J., Thomas R., Corse J. (1978) Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology*. **61**, 296–306.
- Vyroubalová Š., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology*. **151**, 433-447.
- Went F. W. (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais*. **25**, 1-116.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, 10487-10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smts R., Onckelen H.V., Schmülling T. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alternations indicating opposite functions of cytokinins in the regulativ of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. **15**, 2532-2550.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K., Schmülling T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*. **8**, 371–81.
- Whitty C. D., Hall R. H. (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry*. **52**, 787–799.
- Yevdakova N. A., Motyka V., Malbeck J., Trávníčková A., Novák O., Strnad M., von Schwartzenberg K. (2008) Evidence for importance of tRNA-dependent cytokinin biosynthetic pathway in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulation*. **27**, 271-281.
- Yevdakova N. A., von Schwartzenberg K. (2007) Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*. **226**, 683-695.
- Zimmermann H., Beaudoin A. R., Bollen M., Goding J. W., Guidotti G., Kirley T.L., Robson S. C., Sano K. (2000): Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. In: *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases*. (Vanduffel, L. a Lemmens, R.), Eds., Shaker Publishing B. V., Maastricht, The Netherlands, pp. 1–8.
- Zimmermann H., Zebisch, M., Strater N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signaling*. **8**, 437-502.

9 Seznam použitých zkratek

Ade	adenin
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
Ap _n A	diadenosin polyfosfát
ATP	adnosintrifosfát
BA	benzyladenin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CIA	chloroform:isoamylkohol
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
cZRMP	<i>cis</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
cZROG	<i>cis</i> -zeatin ribosid- <i>O</i> -glukosid
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DZ	dihydrozeatin
DZR	dihydrozeatin ribosid
DZRMP	dihydrozeatin ribosid 5'-monofosfát
DZROG	dihydrozeatin ribosid- <i>O</i> -glukosid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELNPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa z latexu <i>Euphorbia characias</i> L.
FAD	flavinadenindinukleotid
GPC	glycerofosforylcholin
HM	homozygot
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HZ	heterozygot
iP	<i>N</i> ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin
iPDP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPMP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iPR	isopentenyladenosin ribosid
iPRMP	isopentenyladenosin ribosid 5'-monofosfát
iPROG	<i>N</i> ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin- <i>O</i> -glukosid

iPRTP	isopentenyladenosin ribosid 5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
iPTP	isopentenyladenosin 5'-trifosfát
KO	knock-outovaná rostlina (umlčení genu)
LOG	enzym Lonely Guy
LPC	lysofosfatidylcholin
MAV	mevalonátová dráha
memT	methoxy- derivát <i>meta</i> -topolinu
meoT	methoxy- derivát <i>ortho</i> -topolinu
MEP	methylerythritolfosfátová dráha
mT	<i>meta</i> -topolin
NAD [±]	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukována forma
NPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa
OG	<i>O</i> -glukosid
ONPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa z opuncie (<i>Opuntia ficus indica</i>)
oT	<i>ortho</i> -topolin
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce
pNPPC	<i>p</i> -nitrofenylfosforylcholin
pNP-TMP	<i>p</i> -nitrofenyl-thymidinmonofosfát
PP _i	difosfát
SM	sfingomyelin
SPC	sfingosylfosforylcholin
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TaNPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa z pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.)
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPT	tRNA isopentenyltransferasa
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZ9GOG	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid- <i>O</i> -glukosid
tZOG	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZRDP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-difosfát
tZRMP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát

tZRTP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-trifosfát
UDP	uridindifosfát
WT	kontrolní rostlina