UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Vývoj a optimalizace metody pro studium metabolismu purinových a pyrimidinových derivátů v *Physcomitrella patens*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Ondřej Kotland**
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Kateřina Podlešáková**
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

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

V Olomouci dne 23. 4. 2012 ……

Ondřej Kotland

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce Mgr. Kateřině Podlešákové a Mgr. Ondřeji Novákovi Ph.D. za jejich rady a odborné vedení, RNDr. Davidu Friedeckému Ph.D. z fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutí isotopově značených standardů, Doc. RNDr. Petru Tarkowskému Ph.D. za rady a za zapůjčení kolony BetaMax Neutral a celému kolektivu LRR za vstřícnost a ochotu pomoci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Ondřej Kotland
Název práce	Vývoj a optimalizace metody pro studium metabolismu purinových a pyrimidinových derivátů v *Physcomitrella patens*
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Podlešáková
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací nástroje pro studium metabolismu purinových a pyrimidinových nukleosidů v rostlinných pletivech. Teoretická část je věnována rešerši na téma metabolismu těchto látek v rostlinách a různým metodám jejich stanovení. V experimentální části jsme vyvinuli metodu stanovení purinů a pyrimidinů metodou UHPLC-MS/MS včetně izolace těchto látek z rostlinného extraktu pomocí SPE na směsném anexu. Touto metodou jsme následně kvantifikovali purinové a pyrimidinové báze a nukleosidy v buňkách „*wild type*“ a mutantů nukleosidas ze suspenzní kultury *Physcomitrella patens*. Zjistili jsme, že v *P. patens* je nejdůležitější nukleosidasou PpNSH1, která efektivně hydrolyzuje jak purinové, tak i pyrimidinové nukleosidy.
Klíčová slova	UHPLC-MS/MS, SPE, puriny, pyrimidiny, recyklace, nukleosidasa, *Physcomitrella patens*
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Ondřej Kotland
Title	Development and optimization of the method for study of purine and pyrimidine metabolism in *Physcomitrella patens*
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Kateřina Podlešáková
The year of presentation	2012
Abstract	The thesis deals with development and optimization of the method for purine and pyrimidine bases and their nucleosides quantification in plant tissues. The theoretical part summarizes the current knowledge of plant metabolism and up-to-date quantification methods of these compounds. In the experimental part, we have developed a pre-LC SPE purification and a novel UHPLC-MS/MS quantification method for plant purines and pyrimidines. Afterwards we have applied the method for quantification of these compounds in the cells of wild-type and nucleosidase mutants *Physcomitrella patens*. Based on the quantification, it has been revealed, that PpNSH1 is the most important nucleosidase in *P. patens*, that effectively hydrolyses both purine and pyrimidine nucleosides.
Keywords	UHPLC-MS/MS, SPE, purines, pyrimidines, salvage, nukleosidase, *Physcomitrella patens*
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. Cíle práce 8
2. Metabolismus purinů a pyrimidinů v rostlinách 10
   2.1. *De novo* biosyntéza 11
      2.1.1. *De novo* biosyntéza purinů 11
      2.1.2. *De novo* biosyntéza pyrimidinů 13
   2.2. Katabolismus 15
      2.2.1. Katabolismus purinů 15
      2.2.2. Katabolismus pyrimidinů 16
   2.3. Recyklace nukleotidů 18
      2.3.1. Recyklace purinů 18
      2.3.2. Recyklace pyrimidinů 19
   2.4 Řízení metabolismu purinů 19
3. Přístupy k analýze purinů 22
   3.1. Elektroforetické metody 22
   3.2. Chromatografické metody 24
4. Materiál a metody 27
   4.1. Biologický materiál 27
   4.2. Přístroje 27
   4.3. Materiál 27
   4.4. Chemikálie 28
   4.5. Příprava roztoků 29
   4.6. Metody a pracovní postupy 30
      4.6.1. Optimalizace CE-UV stanovení 30
      4.6.2. Vývoj UHPLC separace 31
      4.6.3. Vývoj MS/MS detekce 32
      4.6.4. Validace UHPLC-MS/MS metody 33
      4.6.5. Optimalizace podmínek přípravy vzorku 33
      4.6.6. Stanovení obsahu purinů a pyrimidinů v buňkách suspenzní kultury *Physcomitrella patens* 36
5. Výsledky 38
   5.1. Optimalizace podmínek CE-UV kvantifikace 38
   5.2. Optimalizace podmínek chromatografické separace 41
   5.3. Optimalizace podmínek hmotnostní detekce 45
   5.4. Validace UHPLC-MS/MS metody 49
   5.5. Optimalizace podmínek přípravy vzorku - SPE 50

5.6. Stanovení obsahu purinů a pyrimidinů v buňkách suspenzní kultury *Physcomitrella patens* 52

6. Diskuse 54

6.1. Vývoj CE metody 54

6.2. Vývoj UHPLC-MS/MS metody 54

6.3. Stanovení purinů a pyrimidinů v *P. patens* 56

7. Závěr 59

8. Seznam použitých zkratek 60

9. Seznam použité literatury 63

1. CÍLE PRÁCE

1. Vyvinout a validovat metodu stanovení adeninu, guaninu, hypoxanthinu, xanthinu, uracilu a jejich nukleosidů v rostlinných pletivech
2. Sledovat hladiny purinů ve „*wild-type*“ a *ko*-mutantech nukleosidas rostlin *Physcomitrella patens*

TEORETICKÁ ČÁST

2. METABOLISMUS PURINŮ A PYRIMIDINŮ V ROSTLINÁCH

Nukleotidy hrají zásadní roli při skladování a využívání genetické informace jako stavební bloky jaderné DNA, jejích transkriptů a mRNA, ve formě tRNA a rRNA pak i při syntéze proteinů. Jsou taktéž součástí koenzymů (NAD, FAD, SAM) a v rostlinách a bakteriích také prekurzory vitamínů skupiny B – riboflavinu, thiaminu a k. listové (Herz et al., 2000; Hanson and Gregory, 2002). Při respiraci a fotosyntéze se produkují velká množství ATP jakožto univerzálního přenašeče energie do dalších metabolických dějů. ATP se také účastní fixace anorganického dusíku (Smith and Atkins, 2002), fosforu (Raghothama, 1999) a síry (Vauclare et al., 2002) do organických sloučenin. Při proteosyntéze se setkáváme s AMP-aktivovanými aminokyselinami, při syntéze škrobu, celulosy a dalších polysacharidů pak s ADP- či UDP- aktivovanými monosacharidy. Cyklické nukleotidy pak v buněčné signalizaci často zastávají roli druhých poslů. Jednotlivé nukleotidy se také mohou stát prekurzory při syntéze sekundárních metabolitů (např. kofein, viz Ashihara and Crozier, 1999) či fytohormonů cytokininů (Taya et al., 1978; Astot et al., 2000; Schoor and Moffatt, 2004).

Koncentrace různých nukleotidů, nukleosidů a bází v rostlinné buňce jsou značně odlišné, nejvíce jsou, vzhledem k jejich důležitější roli v energetickém a sacharidovém metabolismu, zastoupeny nukleotidy adeninu a uracilu (Wagner and Backer, 1992). Celkový pool nukleotidů v buňce je silně kompartmetizován (Stitt et al., 1989) a udržován specifickými přenašeči (Reiser et al., 2004; Fiore et al., 1998).

Metabolismus nukleotidů a nukleových bází je evolučně starý a vysoce konzervovaný komplex metabolických drah, který má ve všech živých organismech limitující význam. Nukleotidy vznikají *de novo* z jednoduchých molekul, nebo jsou recyklovány z již existujících nukleových kyselin, nukleosidů či bází. Mohou být také degradovány na jednoduché molekuly a poskytnout tak do buněčného poolu stavební kameny (PO_4^{3-}, N, C) pro syntézu jiných sloučenin. Ačkoliv jsou reakce zahrnuté v syntéze, katabolismu a recyklaci purinů popsány již relativně dlouho, o jejich regulaci je známo jen málo. Teprve v poslední době se díky nástrojům genetiky a molekulární biologie objevují práce, které popisují buněčné regulace enzymů těchto metabolických drah (Stasolla et al., 2003).

Původní výzkumy metabolismu nukleotidů byly prováděny s mikroby či zvířaty, coby modelovými organismy (Buchanan and Hartman, 1959; Rebora et al., 2001; Zalkin and Dixon, 1992). Je však známo, že metabolismus nukleotidů u rostlin vykazuje, co do možných reakcí, kontrolních mechanismů i subcelulární lokalizace enzymů, jisté rozdíly od živočišného (Buchanan and Hartman, 1959; Rebora et al., 2001; Zalkin and Dixon, 1992; Zrenner et al., 2006). Poznatky o odlišnostech purinového metabolismu v rostlinných druzích byly z největší

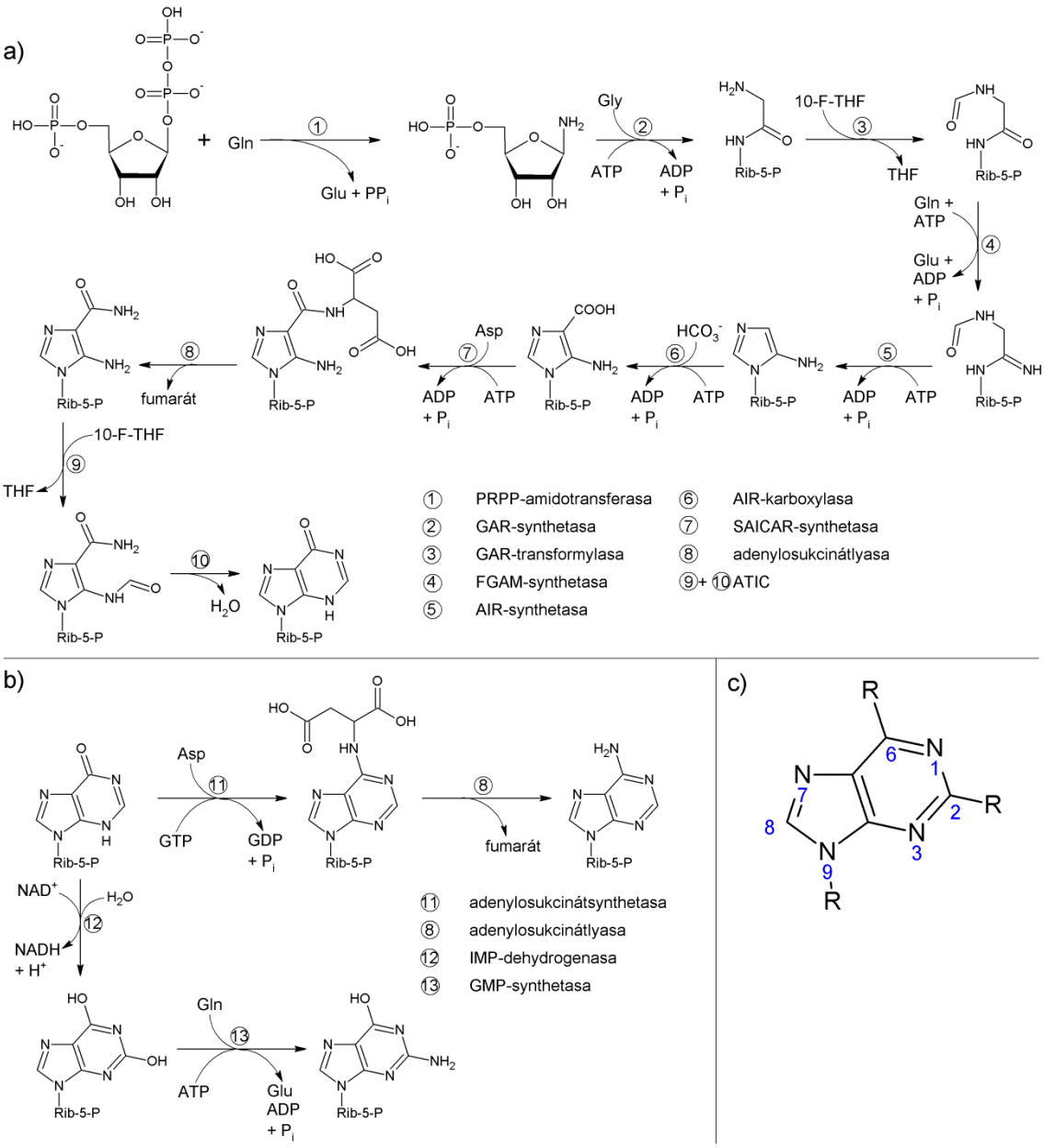
části získány studiem mutantů Arabidopsis, méně pak některých bobovitých (Smith et al., 1998) nebo lilkovitých rostlin (Riewe et al., 2008).

2.1. *De novo* biosyntéza

2.1.1. *De novo* biosyntéza purinů

De novo syntéza purinů probíhá u rostlin podobně jako u živočichů v 10 enzymově katalyzovaných reakcích z 5-fosforibosyl-1-difosfátu (PRPP), aminokyselin glutaminu (Gln), glycinu (Gly) a aspartátu (Asp), 10-formyl-tetrahydrofolátu (10F-THF) a CO_2 za spotřeby 5 ATP na syntézu 1 AMP nebo 7 ATP na 1 GMP. Začíná přenosem amidové skupiny Gln na PRPP za vzniku fosforibosylaminu (PRA) katalyzovaným PRPP-amidotransferasou (EC 2.4.2.14). Vytvořením amidové vazby na molekulu Gly za spotřeby ATP a katalýzy GAR-synthetasou (EC 6.3.4.13) pak vzniká glycinamidoribonukleotid (GAR), který je následně za účasti 10F-THF formylován pomocí GAR-transformylasy (EC 2.1.2.2) za vzniku formylglycinamid-ribonukleotidu (FGAR). Následuje další ATP-poháněný přenos amidoskupiny Gln katalyzovaný formylglycinamidinribonukleotid-synthetasou (FGAM-synthetasa, EC 6.3.5.3) následovaný uzavřením cyklu za spotřeby ATP. Tak za katalýzy AIR-synthetasou (EC 6.3.3.1) vzniká 5-aminoimidazol-ribonukleotid (AIR). V dalším kroku je AIR karboxylován molekulou CO_2 za katalýzy AIR-karboxylasou (EC 4.1.1.21) na 4-karboxyaminoimidazol-ribonukleotid (CAIR). Přikondenzováním aspartátu za využití dalšího ATP vzniká N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid (SAICAR). Tento krok je katalyzován SAICAR-synthetasou (EC 6.3.2.6). Za katalýzy adenylosukcinátlyasou (EC 4.3.2.2) se odštěpuje fumarát a vzniká 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid. Poslední uhlík purinového skeletu je přenesen z 10F-THF za vzniku 5-formaminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotidu (FAICAR), který následně podléhá dehydratační cyklizaci za vzniku inosin-monofosfátu (IMP). Oba poslední kroky jsou katalyzovány jediným bifunkčním enzymem - AICAR-transformylasou / IMP-cyklohydrolasou (ATIC, EC 2.1.2.3 a 3.5.4.10). Schéma biosyntézy IMP je uvedeno na obr. 1 a.

Z IMP pak vznikají další purinové nukleotidy - adenosinmonofosfát (AMP) a přes xanthosinmonofosfát (XMP) i guanosinmonofosfát (GMP). AMP vzniká GTP-poháněnou substitucí C6-hydroxyskupiny IMP aminoskupinou Asp za vzniku adenylosukcinátu. Tato reakce je katalyzována adenylosukcinátsynthetasou (EC 6.3.4.4). Následně je pomocí adenylosukcinátlyasy (EC 4.3.2.2) odštěpen fumarát a vzniká AMP. XMP vzniká oxidací IMP na C2 účinkem IMP-dehydrogenasy (EC 1.1.1.205), která jako akceptor H^- používá NAD^+. Z něj poté účinkem GMP-synthetasy (EC 6.3.5.2), která za spotřeby ATP přenáší amidovou skupinu Gln na C2 XMP vzniká GMP. Pro schematický nákres biosyntézy jednotlivých nukleotidů viz obr. 1 b.



Obrázek 1: Schéma reakcí *de novo* syntézy purinových nukleotidů v rostlinách.

a) syntéza purinového skeletu
b) syntéza AMP, XMP a GMP z IMP
c) číslování purinového skeletu

De novo biosyntéza purinů je u rostlin pravděpodobně lokalizována v plastidech. Geny všech deseti enzymů syntézy IMP obsahují N-terminální transitní sekvence pro přenos do plastidů. Experimentálně byla pak lokalizace v chloroplastech dokázána pro PRPP-amidostransferasu z *Arabidopsis thaliana* (Hung et al., 2004). Existují ovšem důkazy, že například v některých bobovitých rostlinách alespoň část syntézy IMP probíhá kromě plastidů i v mitochondriích (Atkins et al., 1997). Například pro AIR-synthetasu z *Vicia unguiculata* byla prokázána lokalizace v obou organelách (Smith et al., 1998). Plastidové transitní sekvence byly

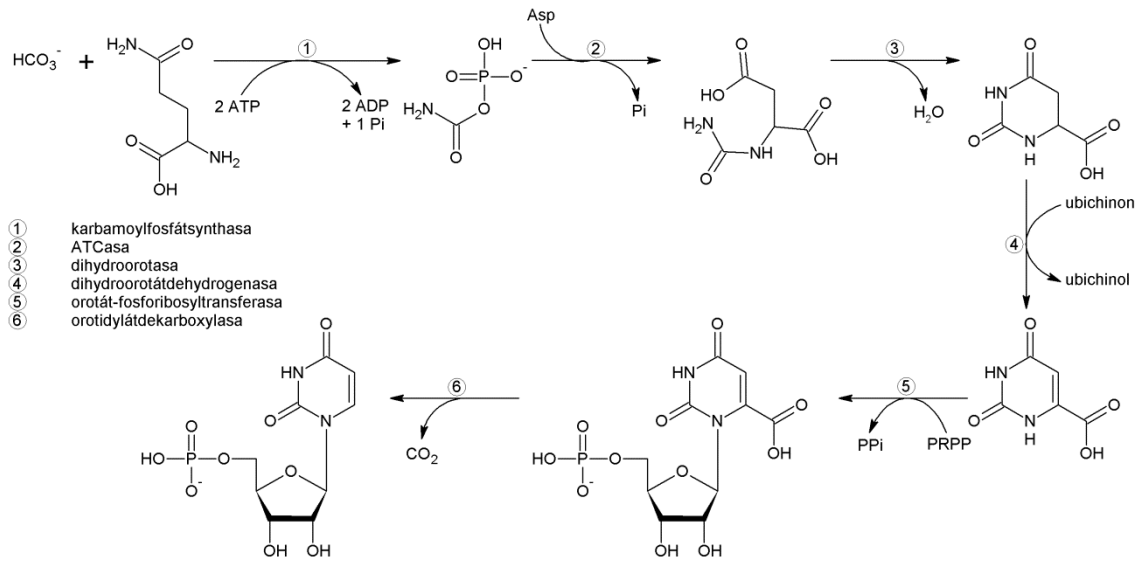
prokázány v různých rostlinách i u enzymů syntézy AMP (van der Graaff et al., 2004). Adeninové nukleotidy jsou následně exportovány do cytosolu specializovaným přenašečem (Leroch et al., 2005). Naproti tomu u enzymů syntézy GMP žádné transitní sekvence nalezeny nebyly a předpokládá se proto, že syntéza GMP probíhá v cytosolu (Cao and Schubert, 2001; van der Graaff et al., 2004). Tomu by také napovídaly výsledky pokusů s ^{14}C značeným hypoxanthinem (Stasolla and Thorpe, 2004). Přenašeč, který by transportoval IMP z plastidů do cytosolu však dosud popsán nebyl.

Genové analýzy ukázaly, že exprese *de novo* biosyntetické dráhy je nejsilnější v mitoticky aktivních pletivech (Senecoff et al., 1996; van der Graaff et al., 2004). Předpokládá se proto, že *de novo* syntéza je intenzivní pouze v dělících se buňkách, kde je velká poptávka po nových nukleotidech, zatímco ve stálých pletivech je využívána jen minoritně a většinu potřebných nukleotidů zajišťují dráhy recyklační (Zrenner et al., 2006).

2.1.2. *De novo* biosyntéza pyrimidinů

De novo biosyntéza pyrimidinů neboli orotátová dráha je vysoce evolučně konzervovaná metabolická dráha, která probíhá ve všech organismech v šesti stejných enzymových krocích za tvorby UMP z karbamoylfosfátu, Asp a PRPP. Karbamoylfosfát vzniká za spotřeby dvou ATP z HCO_3^- a amoniaku nebo amidové skupiny glutaminu účinkem karbamoylfosfátsynthetasy (EC 6.3.5.5). V dalším kroku, který katalyzuje aspartáttranskarbamoylasa (ATCasa, EC 2.1.3.2) dochází ke konjugaci karbamoylfosfátu s aspartátem za vzniku karbamoylaspartátu. Ten je dále cyklizován na pyrimidinový kruh dihydroorotátu dihydroorotasou (EC 3.5.2.3). Dihydroorotát je poté oxidován dihydroorotátdehydrogenasou (EC 1.3.5.2) na orotát. K orotátu je následně připojen PRPP za vzniku orotidin-5‘-fosfátu. Tato reakce je katalyzována orotát-fosforibosyltransferasou (EC 2.4.2.10). Orotidin-5‘-fosfát je pak účinkem orotidylátdekarboxylasy (EC 4.1.1.23) dekarboxylován za vzniku UMP. Přehledné schéma *de novo* biosyntézy UMP je na obr. 2.

Ačkoliv *de novo* syntéza pyrimidinů je evolučně konzervovaná co do jednotlivých reakcí, molekulární uspořádání enzymů této dráhy je mezi bakteriemi, savci a rostlinami odlišné. U bakterií je každý enzym této dráhy samostatným proteinem. U savců jsou karbamoylfosfátsynthetasa, ATCasa a dihydroorotasa sdruženy do jediného trifunkčního proteinu nazývaného podle prvních písmen názvů jednotlivých enzymů CAD (Iwahana et al., 1996). Stejně tak poslední dva kroky (orotát-fosforibosyltransferasa a orotidylátdekarboxylasa) jsou u savců realizovány různými doménami jediného bifunkčního enzymu nazývaného UMP-synthasa. Rostliny mají UMP-synthasu, ale ne CAD protein; karbamoylfosfátsynthetasa, ATCasa a dihydroorotasa jsou samostatné proteiny (Walther et al., 1984; Doremus, 1986).



Obrázek 2: Schematický nákres reakcí *de novo* syntézy pyrimidinů.

Zatímco ostatní organismy mají 2 typy karbamoylfosfátsynthetasy, které jako zdroj NH_3 používají přímo amoniak nebo glutamin, rostliny mají pouze jedinou. Ta je ovšem složena ze dvou podjednotek kódovaných dvěma různými geny. Malá podjednotka vykazuje glutamin-amidotransferasovou aktivitu a uvolňuje amidický dusík Gln. Velká podjednotka uvolněný amoniak zachycuje a katalyzuje samotnou syntézu karbamoylfosfátu (Giermann et al., 2002).

Enzymy *de novo* syntézy pyrimidinů jsou lokalizovány v obou endosymbiotických organelách. Karbamoylfosfátsynthetasa, ATCasa, dihydroorotasa a UMP-synthasa se nachází ve stromatu chloroplastů, zatímco dihydroorotátdehydrogenasa je vázána na vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány (Doremus and Jagendorf, 1985). Z toho je zřejmé, že v biosyntéze pyrimidinů jsou nutné přenašeče, které umožňují přechod dihydroorotátu z chloroplastů do cytosolu (resp. do mezimembránového prostoru mitochondrií) a naopak transport orotátu zpět do chloroplastu. Žádný takový přenašeč však dosud nebyl popsán (Zrenner et al., 2006).

Každý z enzymů *de novo* syntézy pyrimidinů kóduje většinou pouze jediný gen (Giermann et al., 2002). Pravděpodobně proto nejsou známi mutanti biosyntézy pyrimidinů, takováto mutace je totiž zřejmě letální. Výjimku tvoří UMP-synthasa z rýže (*Oryza sativa*) a ATCasa z hrachu (*Pisum sativum*), které jsou kódovány třemi geny (Zrenner et al., 2006). Kontrola *de novo* syntézy na úrovni transkripce se proto u rostlin omezuje na celkové zvýšení exprese v mitoticky aktivních pletivech a naopak útlum v pletivech stálých. Nicméně i ve stálých pletivech *de novo* syntéza probíhá, pravděpodobně pro doplnění pyrimidinových nukleotidů využívaných v metabolismu sacharidů (např. stavba buněčné stěny nebo syntéza sacharosy; Giermann et al., 2002).

Při regulaci *de novo* syntézy pyrimidinů se ve významné míře uplatňuje allosterická regulace některých enzymů, především karbamoylfosfátsynthetasy a ATCasy. První z enzymů je allostericky aktivován PRPP (Ong and Jackson, 1972) a naopak inhibován UMP (Kanamori et al., 1980); tato inhibice může být zrušena ornithinem, což zamezuje vyčerpání karbamoylfosfátu v případě současné syntézy argininu (O'Neal and Naylor, 1976). ATCasa je aktivována ATP a inhibována UMP.

2.2. Katabolismus

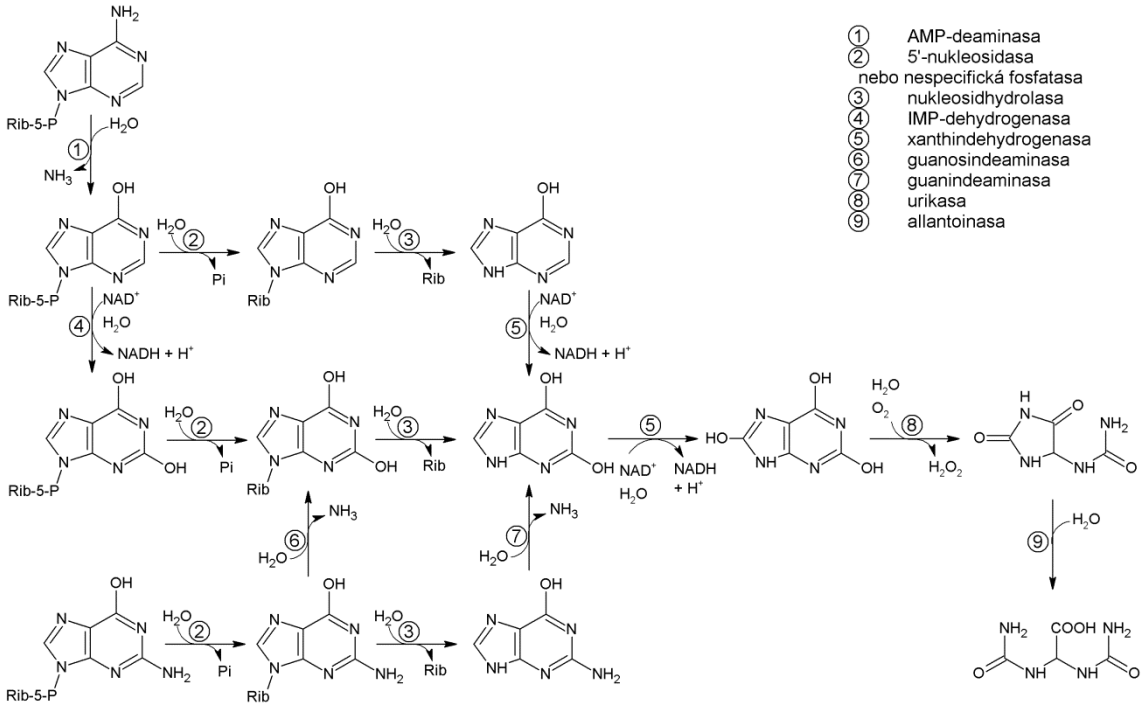
Oproti zvířatům, rostliny musí s dusíkem hospodařit podstatně úsporněji. Mají totiž k dispozici pouze tolik tohoto biogenního prvku, kolik se ho vyskytuje na jejich stanovišti. Zatímco zvířata dusíkaté odpadní produkty exkretují, rostliny se je snaží v co největší míře recyklovat. Proto jsou nukleové báze a jejich deriváty ve většině rostlin degradovány až na CO_2 a NH_3, který je vzápětí opět fixován.

2.2.1. Katabolismus purinů

Oxidace purinů na kyselinu močovou probíhá pravděpodobně v cytosolu, neboť v genech kódujících jednotlivé enzymy této dráhy nebyly nalezeny žádné transitní sekvence (Hesberg et al., 2004; Yesbergenova et al., 2005). Enzymy dalšího metabolismu kyseliny močové jsou pak, alespoň v případě bobovitých rostlin, lokalizovány v endoplasmatickém retikulu a peroxisomech, což bylo dokázáno jak biochemicky (Hanks et al., 1981), tak byly i nalezeny příslušné N-terminální transportní sekvence v jejich genech (Yang and Han, 2004).

AMP je v prvním kroku deaminován na IMP účinkem AMP-deaminasy (EC 3.5.4.6). IMP je poté buď oxidován na XMP pomocí IMP-dehydrogenasy (EC 1.1.1.205), nebo defosforylován na inosin (ino) pomocí nespecifických fosfatas (EC 3.1.3.31) či 5‘-nukleotidas (EC 3.1.3.5). Ino je následně hydrolyzován Ino/Guo-nukleosidasou (EC 3.2.2.2) na hypoxanthin (hyp) a poté oxidován na xanthin (xan) xan-dehydrogenasou (XDH, EC 1.17.1.4). Rychlost degradace adeninu (ade) je řízena AMP-deaminasou, neboť rostliny neobsahují ade- ani adenosindeaminasu (Moffatt et al., 2000). Naproti tomu guanosindeaminasa v rostlinách nalezena byla (Ashihara et al., 1997), proto GMP je nejprve defosforylován na guanosin (guo) a následně buď deaminován na xanthosin (xao) guo-deaminasou (EC 3.5.4.15), nebo hydrolyzován na guanin (gua). Gua je poté deaminován na xan gua-deaminasou (EC 3.5.4.3; (Ashihara et al., 1997). Společným degradačním produktem všech purinů předtím, než dojde k rozštěpení heterocyklu (a výchozí sloučeninou syntézy purinových alkaloidů) je tedy xan (Stasolla et al., 2003). Ten je následně účinkem XDH oxidován na kyselinu močovou. Kyselinu močovou pak urikasa (EC 1.7.3.3) štěpí na allantoin, který je dále oxidován na kyselinu allantoovou allantoinasou (EC 3.5.2.5). V bobovitých rostlinách jsou allantoin a kyselina

allantoová důležitými transportními a skladovacími formami dusíku (Smith and Atkins, 2002). Allantoová kyselina je poté převedena přes ureidoglykolát nebo ureidoglycin (z nějž vzniká ureidoglykolát) až na konečné produkty CO_2, NH_3 a glyoxylát. CO_2 a NH_3 poté mohou být znovu fixovány (Stasolla et al., 2003). Přehledné schéma degradace purinů na kyselinu allantoovou je v obr. 3.



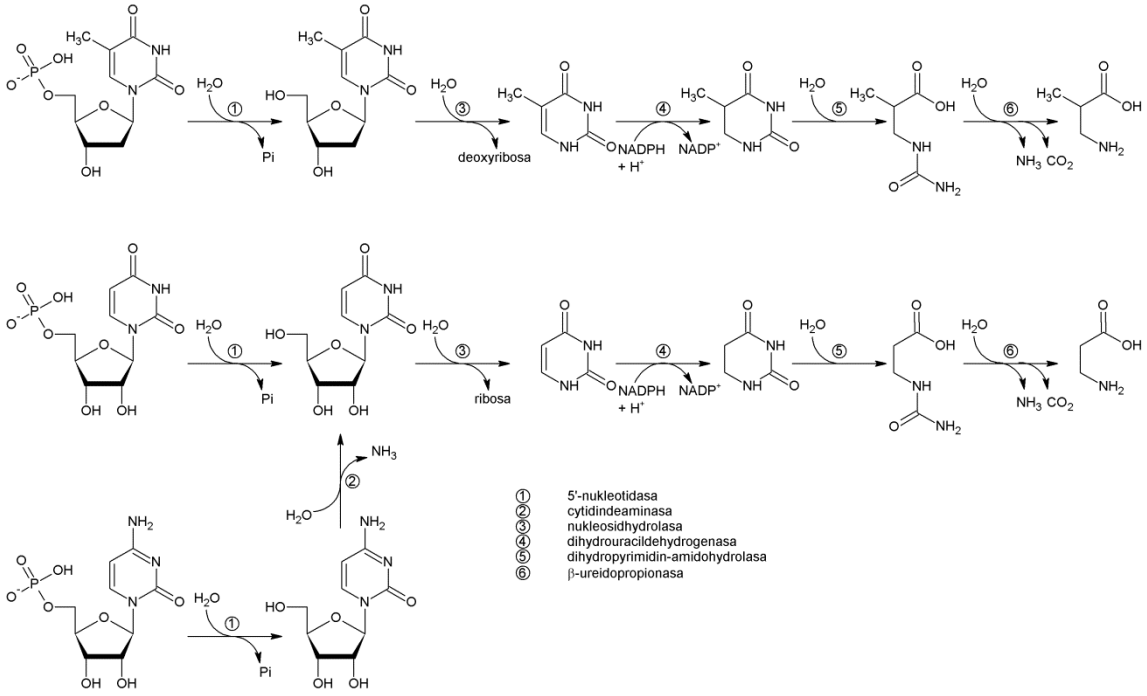
Obrázek 3: Schematický nákres reakcí katabolismu purinů.

Rychlost degradace purinů je řízena aktivitou XDH. Je to NAD^+-dependentní metalo-flavoenzym, který ke své aktivitě vyžaduje přítomnost FAD a Mo-kofaktoru. V Arabidopsis existuje tento enzym ve dvou isoformách *AtXDH1* a *AtXDH2*, které jsou exprimovány rozdílně (Hesberg et al., 2004; Yesbergenova et al., 2005). *AtXDH2* je exprimována konstitutivně a jedná se tedy pravděpodobně o provozní (*housekeeping*) enzym. Naproti tomu exprese *AtXDH1*, u které se předpokládá důležitější role v metabolismu hyp a xan, je indukována zvýšenou koncentrací solí, suchem a kyselinou abscisovou (ABA). Díky zvýšené expresi ve stresových podmínkách a produkci reaktivních forem kyslíku se předpokládá její účast v odpovědi rostlin na stres (Hesberg et al., 2004; Yesbergenova et al., 2005; Zarepour et al., 2010).

2.2.2. Katabolismus pyrimidinů

Většina reakcí katabolismu pyrimidinů se podobá obráceným reakcím *de novo* biosyntézy. Od té je ale katabolismus oddělen prostorově, neboť probíhá v cytosolu. V první fázi jsou pyrimidinové nukleotidy (stejně jako purinové) defosforylovány na odpovídající nukleosidy pyrimidin-specifickou 5'-nukleotidasou (EC 3.1.3.5). Cytidin je následně deaminován na uridin (uri) cytidindeaminasou (EC 3.5.4.5). Deoxythymidin a uri jsou

hydrolyzovány některou z nukleosidas (EC 3.2.2.x). Takto uvolněný thymin a uracil (ura) poté podléhají redukci dihydrouracildehydrogenasou (EC 1.3.1.2) za účasti NADPH za vzniku 5,6-dihydrothyminu resp. 5,6-dihydrouracilu. Redukovaný pyrimidinový kruh těchto sloučenin je následně štěpen dihydropyrimidin-amidohydrolasou (EC 3.5.2.2) za vzniku 3-ureidoisobutyrátu resp. 3-ureidopropionátu. Ty jsou deaminovány a dekarboxylovány β-ureidopropionasou (EC 3.5.1.6) za vzniku 2-methyl-β-alaninu resp. β-alaninu. Schematický přehled reakcí katabolismu pyrimidinů lze nalézt v obr. 4.



Obrázek 4: Schematický nákres reakcí katabolismu pyrimidinů.

Vzhledem k tomu, že dihydrouracildehydrogenasa, dihydropyrimidin-amidohydrolasa i β-ureidopropionasa jsou v Arabidopsis kódovány pouze jediným genem, transkripční regulace této dráhy, podobně jako u *de novo* syntézy, téměř neprobíhá. Exprese enzymů katabolismu pyrimidinů je v průběhu ontogeneze přibližně konstantní, v senescentních pletivech pak stoupá (Zrenner et al., 2006). Regulace této dráhy proto probíhá pravděpodobně podobně jako v případě *de novo* syntézy díky subcelulární distribuci enzymů a allosterickým regulacím. Dihydrouracildehydrogenasa je, stejně jako analogická dihydroorotátdehydrogenasa, lokalizována v plastidech, dihydropyrimidin-amidohydrolasa v organelách sekreční dráhy a β-ureidopropionasa v cytosolu (Zrenner et al., 2009).

Na rozdíl od *de novo* syntézy, v genech enzymů katabolické dráhy pyrimidinů je známo několik *ko*-mutantů Arabidopsis. Nejsou-li pyrimidiny jediným zdrojem dusíku, nevykazují tito mutanti pozorovatelné změny fenotypu. Z toho vyplývá, že katabolismus pyrimidinů není pro rostlinu za normálních podmínek příliš důležitý (Zrenner et al., 2009).

2.3. Recyklace nukleotidů

Na rozdíl od *de novo* biosyntézy, která spotřebovává energii pěti nebo sedmi ATP na produkci jediného AMP nebo GMP, recyklace použitých nukleotidů není energeticky příliš náročná a spotřebovává pouze jediné ATP. Enzymy recyklační dráhy obnovují nukleotidový pool buňky pomocí interkonverzí jednotlivých bází, nukleosidů a nukleotidů vznikajících při buněčném metabolismu (odbourávání RNA a nukleotidů, syntéza methioninu). Zatímco *de novo* syntéza je proces evolučně relativně konzervovaný, recyklační dráhy vykazují výraznější mezidruhovou variabilitu (Katahira and Ashihara, 2002; Kafer et al., 2004).

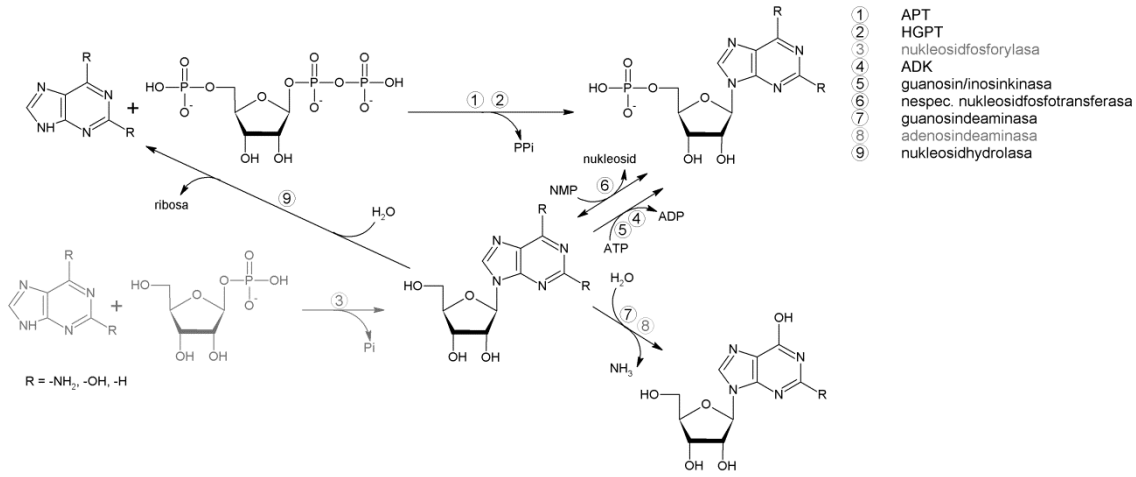
2.3.1. Recyklace purinů

Ade může být za přítomnosti PRPP přeměněn přímo na AMP za katalýzy adenin-fosforibosyltransferasou (APT, EC 2.4.2.7). V Arabidopsis bylo nalezeno celkem 5 genů tohoto enzymu (*At1g27450*, *At1g80050*, *At4g22570*, *At4g12440* a *At5g11160*), z nichž první tři (APT 1-3) byly v rostlině prokázány jako funkční enzymy. Vzhledem k rozdílné expresi izoforem v různých rostlinných orgánech a rozdílům v substrátové specifitě je možné, že se podílejí na reversibilní inaktivaci cytokininů (Allen et al., 2002). Stejně tak gua či hyp mohou být převedeny na GMP nebo IMP hyp/gua-fosforibosyltransferasou (HGPT, EC 2.4.2.8). Z bází a ribosa-1-fosfátu výjimečně mohou být syntetizovány i nukleosidy účinkem fosforylasy purinových nukleotidů (EC 2.4.2.1). Aktivita těchto enzymů je však v rostlinách (na rozdíl od živočichů) velmi malá (Moffatt et al., 2000; Ashihara and Crozier, 1999; Wagner and Backer, 1992), proto vznik nukleosidů z bází nehraje v recyklaci purinů významnou roli. Podstatně významnější úlohu v rostlinném metabolismu nukleotidů zastávají nukleosidhydrolasy, které katalyzují naopak hydrolýzu N-glykosidické vazby nukleosidů za uvolnění bází. O těchto enzymech pojednává kapitola 2.4. Přehledné schéma recyklačních drah v rostlinách lze nalézt na obr. 5.

Ado, guo a ino mohou být na příslušné nukleotidy jednoduše fosforylovány adenosinkinasou (ADK, EC 2.7.1.20) či guo/ino-kinasou (EC 2.7.1.73) za spotřeby jednoho ATP. Druhý jmenovaný enzym se však nevyskytuje ve všech rostlinných druzích (Katahira and Ashihara, 2002; Moffatt et al., 2002; Koyama et al., 2003; Deng and Ashihara, 2010). Dalším enzymem, který fosforyluje nukleosidy, je nespecifická nukleosid-fosfotransferasa (EC 2.7.1.77), která jako donor fosfátu používá jakýkoli jiný nukleosidmonofosfát. Guo a ado by mohly být též oxidativně deaminovány na ino a xao, ale zatímco guo-deaminasa (EC 3.5.4.15) byla v rostlinách experimentálně potvrzena, existence rostlinné ado-deaminasy (EC 3.5.4.4) je předmětem diskuse (Zrenner et al., 2006; Katahira and Ashihara, 2002). Aktivita tohoto enzymu v rostlinách všeobecně nebyla jednoznačně prokázána, nicméně v genomu

Arabidopsis existuje její pravděpodobný gen (*At4g04880*), jehož exprese byla i ověřena (Schoor and Moffatt, 2004).

U všech enzymů recyklační dráhy se předpokládá cytosolární lokalizace. V jejich genech nebyly nalezeny žádné transportní sekvence a některé z enzymů byly v cytosolu prokázány pomocí značených protilátek (Allen et al., 2002; Moffatt et al., 2000).



Obrázek 5: Schéma možných reakcí při recyklaci purinů

2.3.2. Recyklace pyrimidinů

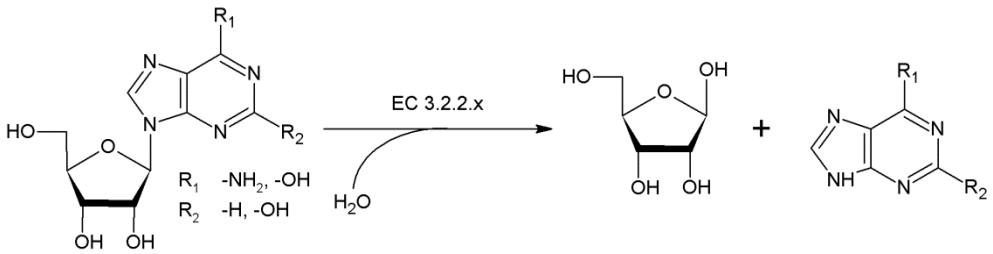
Pyrimidinové, stejně jako purinové, nukleosidy mohou být přímo fosforylovány na odpovídající nukleotidy příslušnými kinasami (uri/cytidinkinasa EC 2.7.1.48 a thymidinkinasa EC 2.7.1.21). Pro thymidinkinasu jsou v Arabidopsis popsány dva geny a bylo potvrzeno, že jsou oba transkribovány (Schmid et al., 2005); její enzymová aktivita však dosud prokázána nebyla.

Z pyrimidinů může být jediný ura převeden přímo na UMP ura-fosforibosyltransferasou (EC 2.4.2.9), ta má však v rostlinách podstatně nižší aktivitu než nukleosidkinasy (Ashihara et al., 2000). Rodina ura-fosforibosyltransferas v Arabidopsis sestává z několika členů, které jsou lokalizovány v cytosolu nebo v plastidech (Schmid et al., 2005), proto se předpokládá, že recyklace pyrimidinů probíhá v těchto dvou organelách.

2.4 Řízení metabolismu purinů

Poměr katabolismu (a tím i *de novo* syntézy) a recyklace nukleotidů je v rostlinách řízen aktivitou nukleosidhydrolas (NSH, EC 3.2.2.x, obr. 6), které štěpí nukleosidy na volnou bázi a ribosu (Jung et al., 2009) a tím umožňují vstup bází do katabolických reakcí. Tyto enzymy jsou dobře popsány v bakteriích, parazitických prvocích a kvasinkách, kde byly určeny i krystalové struktury (Degano et al., 1996; Versees et al., 2001). V rostlinách byly charakterizovány teprve relativně nedávno (Campos et al., 2005; Jung et al., 2009; Jung et al.,

2011). Poznávacím znakem nukleosidas je aspartátový cluster sekvence DXDXXXDD, který se nachází poblíž N-konce polypeptidového řetězce a tvoří aktivní centrum těchto enzymů (Versees and Steyaert, 2003).



Obrázek 6: Schéma hydrolýzy nukleosidů katalyzované nukleosidasami.

V Arabidopsis je známo celkem 5 nukleosidas (AtNSH 1-5) s různou substrátovou specifitou a lokalizací. AtNSH1 se nachází v cytosolu xylému kořenů a jejími nejlepšími substráty jsou uri, xao, ino a ado (Jung et al., 2011). Kromě nich však dokáže štěpit i isopentenyladenosin (iPR), proto je možné, že se také podílí na aktivaci cytokininů (Jung et al., 2009; Chen and Kristopeit, 1981), podobně jako LOG, který štěpí monofosfáty (Kurakawa et al., 2007). K_M pro cytokininové ribosidy je však výrazně vyšší, než jejich fyziologická koncentrace (K_M pro iPR je 0,44 mM; Jung et al., 2009), proto zapojení nukleosidas při jejich aktivaci není příliš pravděpodobné (Riegler et al., 2011).

Aktivita cytosolární AtNSH1 je v rostlinách Arabidopsis nejvyšší a je proto považována za hlavní provozní enzym pro štěpení jak pyrimidinových, tak i purinových nukleosidů (Jung et al., 2011). AtNSH2, která je lokalizovaná taktéž v cytosolu, vykazuje silnou substrátovou specifitu pro ino (Jung et al., 2011). Je exprimována v pozdně senescentních pletivech (van der Graaff et al., 2006), kde pravděpodobně podporuje aktivitu AtNSH1 (Jung et al., 2011). AtNSH3 obsahuje oproti předchozím dvěma isoformám dvě nukleosidasové domény se silnou substrátovou specifitou pro ado a ino (Jung et al., 2011). Je pravděpodobně jedinou nukleosidhydrolasou lokalizovanou v apoplastu, kde se nejspíše podílí na odbourání extracelulárního ATP a tím se účastní rostlinné odpovědi na poranění nebo napadení patogenem (Jung et al., 2011). Funkce ani exprese AtNSH4 a 5 *in vivo* nebyly dosud popsány (Jung et al., 2011). Vzhledem k relativně široké substrátové specifitě popsaných nukleosidas se předpokládá, že svoje substráty rozpoznávají přes ribosu (Versees and Steyaert, 2003).

Physcomitrella patens je jedním z nejlépe charakterizovaných druhů mechů. Podstatnou část svého krátkého životního cyklu se vyskytuje v haploidní formě gametofytu a opravy DNA probíhají velmi často homologní rekombinací. Proto je *P. patens* často využívána jako modelový organismus nižších rostlin v reversně-genetických a evolučních studiích a v poslední době také v rostlinných biotechnologiích (molekulární farmaření). Genom *P. patens* má

přibližně 480 Mbp v 27 chromozomech a byl kompletně osekvencován v roce 2006 (Rensing et al., 2008).

V *P. patens* jsou známy celkem 3 NSH (PpNSH 1-3). Řetězec PpNSH1 má 334 aminokyselin (36,08 kDa) a ve fyziologických podmínkách tvoří homodimery, PpNSH2 má 329 aminokyselin (35,46 kDa) a PpNSH3 má 349 aminokyselin (37,67 kDa) (Turčinov, 2011). Všechny tři isoformy jsou lokalizovány v cytosolu (Turčinov, 2011). PpNSH1 je nejaktivnějším enzymem se specifitou pro puriny (K_M = 82 μM pro ino, 101 μM pro ado a 166 μM pro guo), její afinita pro uri je výrazně nižší (K_M = 1,49 mM). Co do substrátové specifity, vykazuje tedy jistou podobnost s AtNSH2 a 3 (Turčinov, 2011). PpNSH2 je naproti tomu specifická pro uri (K_M = 1,02 mM), pro purinové nukleosidy nebyla zjištěna žádná aktivita (Turčinov, 2011). Naproti tomu popsané AtNSH mají K_M i pro nejlepší substráty v řádu mM, ačkoli fyziologická koncentrace nukleosidů v rostlinných pletivech je v řádu nM. Gen PpNSH3 se prozatím nepodařilo heterologně exprimovat a *ko*-mutant nevykazuje žádné fenotypové změny vůči WT, proto se předpokládá, že alespoň ve stadiu sporofytu nemá tato isoforma výraznou fyziologickou úlohu (Turčinov, 2011).

3. PŘÍSTUPY K ANALÝZE PURINŮ

V analýze purinů se díky jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem používají především chromatografické a elektroforetické techniky. Historicky jsou s analýzou spjaty především papírová chromatografie (Hotchkiss, 1948), kapalinová chromatografie na iontoměničích (Cohn, 1949) a pro svou experimentální (a v dřívějších dobách i časovou) nenáročnost také chromatografie na tenké vrstvě (Drach and Novack, 1973). HPLC byla poprvé použita pro separaci nukleotidů na anexu již v roce 1967 (Horvath et al., 1967), následovalo použití katexu pro analýzu nukleosidů a bází (Horvath and Lipsky, 1969). Z technik elektroforetických je to historicky především papírová elektroforéza (Adams and Nakatani, 1968), v současnosti pak téměř všechny techniky elektroforézy kapilární.

3.1. Elektroforetické metody

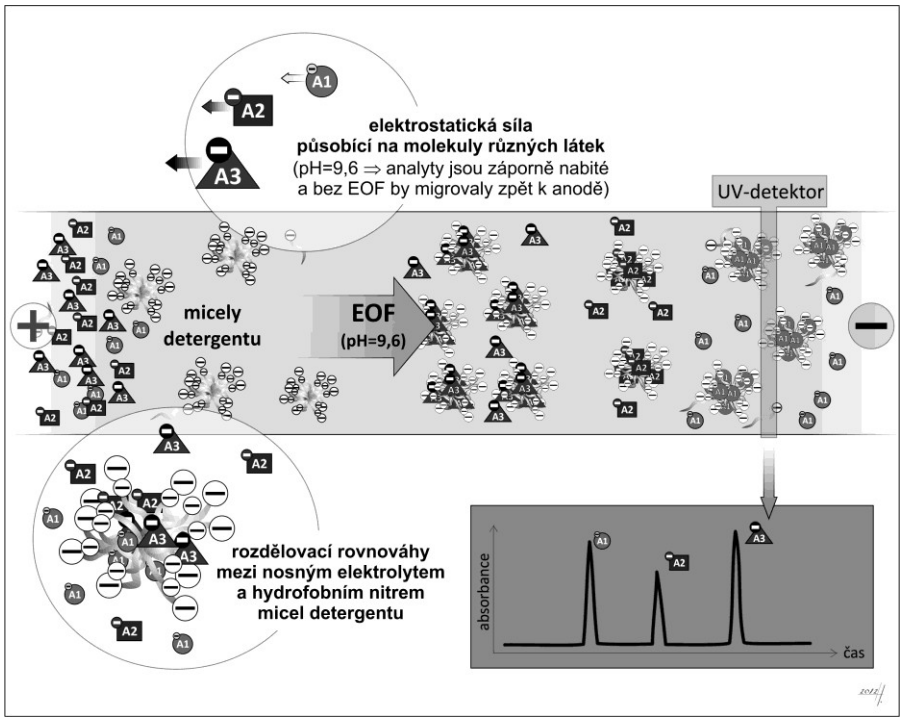
V analýze nukleových kyselin a jejich komponent (nukleotidů, nukleosidů i bází) bývá dnes metodou první volby kapilární elektroforéza (CE). To je dáno vysokou polaritou těchto látek a jejich acidobazickým chováním (protonace volných elektronových párů na některém z heterocyklických dusíků). V nabitém stavu pak tyto molekuly snadno migrují v elektrickém poli. V klinické praxi se kapilárně elektroforetických metod (vedle chromatografie na anexech či reversních fázích a hmotnostní spektrometrie) používá rutinně např. při novorozeneckém *screeningu* dědičných metabolických poruch (Adam et al., 1999; Prezelj et al., 2000; Gross et al., 1995).

Při CE stanovení derivátů nukleových bází se používá různých technik – prostá CZE (např. Haunschmidt et al., 2008), ITP (Bruchelt et al., 1993), nebo MEKC (Adam et al., 1999). Často se pracuje v nepokrytých kapilárách s BGE o vysokém pH (> 9) při normální polaritě, což maximalizuje elektroosmotický tok (EOF) a zlepšuje separaci jednotlivých purinových a pyrimidinových derivátů, které mají při vysokém pH (částečný) záporný náboj a snaží se tedy migrovat „proti proudu“ EOF. Mají ale příliš malou mobilitu a jsou proto strhávány EOF směrem k detektoru a separovány efektivněji, než na základě pouhého rozdílu v mobilitách jednotlivých derivátů.

Jak již bylo řečeno, nejčastěji jsou nukleové báze a nukleosidy separovány v silně alkalickém BGE. Z toho také vyplývá volba složení BGE. Nejčastěji se používají pufry uhličitanové (Geldart and Brown, 1999), fosfátové (Lin et al., 1997), nebo borátové (Adam et al., 1999). Uhličitanové pufry mají několik výhod – nejsou toxické, poskytují velmi stabilní EOF a, je-li jako protiiont použit amonný kation, jsou i volatilní a tedy MS-kompatibilní (Geldart and Brown, 1999). Borátové pufry naproti tomu mají nižší vodivost, což umožňuje použití větších separačních napětí a tím zkrácení doby analýzy.

Nejčastějším způsobem detekce nukleových bází a nukleosidů je spektrofotometrie v UV oblasti, nejčastěji při 254 nm. UV-detekce není ovšem v kapilární elektroforéze příliš citlivá – je limitována délkou optické dráhy, která je dána vnitřním průměrem použité kapiláry, nejčastěji tedy 50 nebo 75 µm. Z tohoto důvodu bývají detekční limity při UV-stanovení nejčastěji v řádu jednotek µmol . dm^{-3} (Adam et al., 1999; Adam et al., 2002; Klampfl et al., 2002). Vyšší citlivost i selektivitu má potom detekce amperometrická, která ovšem nebývá obvyklým příslušenstvím CE přístrojů. Jako pracovní se často používá elektroda grafitová, platinová nebo měděná, která se udržuje na potenciálu kolem +0,9 V vůči kalomelové referenční elektrodě. Vyšší napětí sice ještě zvyšují citlivost detekce, snižují však její selektivitu a mají za následek vyšší šum základní linie (Chen et al., 2002).

My jsme v této práci zvolili separaci technikou micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), která umožňuje separovat i látky nenabité (nebo nabité pouze slabě) za přispění nepolárního vnitřního prostoru micel detergentu. V uspořádání s normální polaritou a alkalickým nosným elektrolytem (v našem případě pH = 9,6) je elektroosmotický tok velmi silný a unáší zóny jednotlivých analytů směrem k detektoru i přes to, že tyto jsou elektrostatickými silami taženy směrem od detektoru a tím pádem brzděny. Rozdělovací rovnováha mezi nosným elektrolytem a hydrofobním nitrem micel detergentu pak činí separaci ještě efektivnější. Celá situace je schematicky znázorněna v obr. 7.



Obrázek 7: Schematický nákres principu stanovení bází a nukleosidů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Autorem obrázku je H. Kotlandová.

3.2. Chromatografické metody

V současné době se k chromatografické separaci purinů v klinické praxi nejčastěji používá vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému reversních fází (Ito et al., 2000), která je dnes asi nejrozšířenější a nejdostupnější chromatografickou metodou. Výhodou této metody jsou, zejména při použití kapilárních kolon, velmi nízké detekční limity (ve srovnání s CE při použití stejné detekční techniky) a relativně velký dynamický rozsah. Naopak dříve oblíbená chromatografie na iontoměničích byla spíše zatlačena do pozadí, pravděpodobně zejména z důvodu stále oblíbenějšího použití detekce hmotnostním spektrometrem, se kterým není použití gradientu iontové síly při eluci z ionexu příliš kompatibilní.

Chromatografická separace purinů na reversní fázi je nicméně provázena problémy s nízkou retencí analytů na koloně, což je důsledkem jejich vysoké polarity a obsahu disociabilních skupin. Z toho důvodu je při separaci purinů kritickým faktorem pH mobilní fáze. Nejbazičtější z našich analytů, ade, má $pK_b = 4,17$, naopak nejkyselejší xan má $pK_a = 7,44$.

Paradoxem je, že nukleosidy mají obecně vyšší retenci než jejich báze, ačkoliv jsou více rozpustné ve vodě (a tedy polárnější). Za tímto jevem stojí pravděpodobně vertikální „*stacking*“ jednotlivých nukleových bází ve vodných rozpouštědlech. Síla tohoto jevu je různá pro každou látku a stoupá v řadě pyrimidin < purin < nukleosid < deoxynukleosid. Sloučeniny s nejmenším „*stackingem*“ jsou nejméně hydrofobní a mají proto nejkratší retenční časy (Brown and Grushka, 1980).

Při separaci nukleových bází a nukleosidů se často uplatňují jako mobilní fáze mravenčanové nebo octanové pufry o pH kolem 5 (Ito et al., 2000). Při tomto pH jsou totiž puriny nejméně protonovány a nejvíce se tak projevují jejich hydrofobní vlastnosti. Proto jsou na kolonách s reversní fází zadržovány a separovány. Časté ovšem je i použití mobilní fáze o pH výrazně kyselejším, většinou kolem 2,5. To má své opodstatnění, je-li důraz na separaci kyslíkatých derivátů (hyp, xan a pyrimidinů), jejichž pK_b je posunuto více do kyselé oblasti. Při diagnostice dědičných poruch metabolismu nukleotidů se purinové a pyrimidinové deriváty separují na reversní fázi s pokrytými silanolovými skupinami v mobilní fázi složené z octanu amonného a kyseliny mravenčí o pH 2,8 (Hartmann et al., 2006). Extrémním příkladem pak může být práce L. Monsera, která se zabývá HPLC stanovením čerstvosti plodů moře a používá jako mobilní fázi fosfátový pufr s přídavkem kyseliny trichloroctové o pH 2,0 (Monser, 2004). Při takto nízkému pH mobilní fáze ovšem nelze použít běžné oktadecylové stacionární fáze, proto je v této práci použita kolona s náplní porézního grafitu.

Jedním z praktických důsledků slabé retence nukleosidů a bází na reversních fázích je i nutnost pro jejich separaci používat dlouhé kolony (většinou 250 mm). V důsledku toho se analýzy úměrně prodlužují a snižuje se tak rychlost prostupu vzorku. Díky potřebě zrychlovat

analýzy se v současné době stávají stále populárnější kolony, v nichž klasický oktadecylový sorbent nese chemickou modifikaci, která mu umožňuje větší retenci polárních analytů. Takovou modifikací bývá nejčastěji pokrytí volných silanolových skupin polárními rezidui („*polar end-capping*“) nebo vnesení takovéto polární skupiny přímo do oktadecylového (nebo případně jiného) řetězce reversní fáze („*embedded polar group*“). Takovýchto kolon se používá nejčastěji tam, kde je zapotřebí velkého prostupu vzorků, tedy například v metabolomických studiích (např. Lu et al., 2006)

S jistými výhodami by pravděpodobně bylo možno nukleové báze a nukleosidy separovat technikou chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC), která se v poslední době stává stále více populární. Mezi výhody této techniky patří separace velmi polárních analytů v prostředí o vysokém obsahu organické složky mobilní fáze, což při detekci hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem snižuje limity detekce a zvyšuje reprodukcibilitu stanovení. Zároveň však dochází k rozšiřování a chvostování píků v porovnání s chromatografií na reversní fázi (Hemstrom and Irgum, 2006). Dosud jsme zaznamenali pouze jedinou práci, ve které je využita HILIC chromatografie při stanovení nukleotidů, nukleosidů a nukleových bází (Mora et al., 2010).

K detekci nukleových bází po chromatografii se nejčastěji používá klasické UV detekce, většinou při 254 nm (Monser, 2004; Safranow and Machoy, 2005; Fan et al., 2007; Kaneko et al., 2009). Velmi citlivý je detektor fluorescenční, puriny však samy nefluoreskují. Proto je před analýzou nutné je derivatizovat, což komplikuje přípravu vzorku a je nutno počítat s tím, že derivatizace neprobíhá kvantitativně, což snižuje přesnost měření. Na druhé straně ovšem fluorescenční značka zvyšuje retenci na reversní fázi a tím usnadňuje analýzu (Katayama et al., 2001).

Velmi oblíbeným detektorem je pro svou univerzálnost, specifičnost a v poslední době i snadnou dostupnost hmotnostní spektrometr (MS), nejčastěji s ionizací elektrosprejem (ESI). Lze jej dnes již celkem snadno *on-line* spojit s kapalinovým chromatografem a poskytuje kromě informace kvantitativní i informaci kvalitativní (m/z iontu nebo, v případě tandemových přístrojů, fragmentační spektrum). To je zvláště výhodné, pokud všechny analyty nejsou dokonale chromatograficky separovány (Ito et al., 2000; Lu et al., 2006). Další výhodou je možnost použití izotopově značených interních standardů, což zpřesňuje stanovení a zvětšuje jeho dynamický rozsah. Jistou nevýhodou je pak omezení výběru pufrů pouze na ty, které jsou těkavé, tedy většinou amonné soli kyselin mravenčí ($pK_a = 3,75$), octové ($pK_a = 4,76$) nebo méně často uhličité ($pK_{a1} = 6,35$) a relativně vysoká pořizovací cena.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Biologický materiál

prýty *Arabidopsis thaliana* (Col.)

Physcomitrella patens (WT, *single-ko*-mutanti PpNSH1, 2 a 3), lyofilizované vzorky odebrané po 21-denní kultivaci suspenzní kultury; poskytnuto laboratoří prof. von Schwartzenberga z Universität Hamburg

4.2. Přístroje

sestava kapilární elektroforézy Agilent CE G1600; Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA

sestava UPLC-MS/MS Quatro *micro*™ - Acquity™ Ultra Performance LC (Binary solvent manager, Sample manager) s hmotnostním detektorem Micromass Quatro Micro™; Waters; Milford, MA, USA

sestava UPLC-MS/MS Xevo™ – Acquity™ Ultra Performance LC (Binary solvent manager, Sample manager, 2996 PDA detector) s hmotnostním detektorem Xevo™ TQ MS; Waters; Milford, MA, USA

pH metr Oakton® pH 700 Benchtop Meter; Cole-Parmer; Vernon Hills, IL, USA

Sulpeco 5-8063 filtrační nálevka + 5-8070 odsávací zábrusová baňka + 0,45 μm x 47 mm filtry Nylon 66; Sulpeco; Bellefonte, PA, USA

ultrazvuková lázeň Transsonic 310; Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co.; Singen, D

Milli-Q Simplicity 185; Millipore Corp.; Billerica, MA, USA

centrifuga AvantiTM 30; Beckman; Brea, CA, USA

dusíková odparka TurboVap® LV; Caliper Life Sciences; Hopkinton, MA, USA

vakuová odparka Acid resistant CentriVap vacuum concentrator; Labconco Corp.; Kansas City, MO, USA

termoblok Grant BTD; Camlab; Cambridge, UK

laboratorní váhy ER-182A; A&D Weighing; San Jose, CA, USA

4.3. Materiál

křemenná kapilára napokrytá, Simplus Capillaries 75/375 μm; MicroSolv Technology Corp.; Eatontown, NJ, USA

chromatografická kolona BetaMax Neutral; 250 x 4,6 mm (5 µm); Phenomenex; Torrance, CA, USA

chromatografická kolona Pinnacle DB IBD; 100 x 2,1 mm (1,9 µm); Restek; Bellefonte, PA, USA

LUT syringe filters 25 mm / 0,22 µm; Labicom; Olomouc

PVPP sorbent; Fluka; Milwaukee, WI, USA

SPE kolony:

Bond Elut C18, 30 mg / 3 ml; Varian; Agilent Technologies.; Palo Alto, CA, USA

Oasis HLB, 200 mg / 6 ml; Waters; Milford, MA, USA

Bond Elut SCX, 100 mg / 1 ml; Varian; Agilent Technologies.; Palo Alto, CA, USA

Oasis MCX, 30 mg / 1 ml; Waters; Milford, MA, USA

Oasis MAX, 30 mg / 1 ml; Waters; Milford, MA, USA

Sep-Pak® Classic C18 500 mg; Waters; Milford, MA, USA

4.4. Chemikálie

amoniak, 25% roztok p. a.; Lach-Ner

EtOH 96%, kvasný denaturovaný 5 % MeOH; moravský lihovar Kojetín

glycin pro ELFO, ≥ 99 %; Roth

H_3BO_3, p. a.; Lachema Brno

chloroform, p. a.; Penta

kyselina mravenčí, p. a.; Merck

kyselina octová, p. a.; Sigma

kyselina trichloroctová, ≥ 99 % (titration); Sigma

MeOH, gradient grade for liquid chromatography; Merck

NaOH, ≥ 98 %; Lach-Ner

octan sodný trihydrát, p.a.; Lachema Brno

SDS, electrophoresis purity (catalog No: 161-0302; Bio-Rad; Hercules, CA, USA)

standardy bází a nukleosidů:

Adenin, ≥ 99 % (HPLC); Fluka

Adenosin, ≥ 99 %; Sigma

Guanin puriss., ≥ 99 % (HPLC); Fluka

Guanosin, ≥ 98 %; Sigma

Hypoxanthin, ≥ 99 %; Sigma

Inosin, ≥ 99 %; Sigma

Uracil, ≥ 99 %; Sigma

Uridin, ≥ 99 %; Sigma

Xanthin BioUltra, ≥ 99 %; Sigma

Xanthosin dihydrát, ≥ 99 %; Sigma

4.5. Příprava roztoků

- BGE1 – 60 mM H_3BO_3, pH = 9,6 (50% NaOH), 80 mM SDS
  - příprava BGE: Připravili jsme si zásobní roztok H_3BO_3 o koncentraci 300 mM (rozpuštěním 927,5 mg krystalické H_3BO_3 v redestilované vodě a doplněním do celkového objemu 50 ml v odměrné baňce) a zásobní roztok SDS o koncentraci 400 mM (5,7676 g na 50 ml). Na 50 ml BGE jsme do kádinky odpipetovali 10 ml 300 mM H_3BO_3, přidali 28 ml redestilované vody a na pH metru nastavili pH na 9,6 pomocí 50% NaOH. Tento roztok jsme poté převedli do 50 ml odměrné baňky, přidali 10 ml zás. roztoku SDS o koncentraci 400 mM a doplnili redestilovanou vodou.
- BGE2 – 60 mM H_3BO_3, pH = 9,6 (50% NaOH), 60 mM SDS
  - příprava BGE analogicky, pouze zás. roztok SDS se přidává v objemu 7,5 ml
- BGE3 – 60 mM H_3BO_3, 60 mM glycin, pH=9,6 (50% NaOH), 60 mM SDS
  - příprava BGE analogicky – smíchali jsme 10 ml 300 mM roztoku H_3BO_3 s 10 ml 300 mM roztoku glycinu (1,1261 g na 50 ml), přidali 20 ml H_2O, upravili pH na 9,6 (50% NaOH), přidali 7,5 ml zás. roztoku SDS a doplnili objem do 50 ml
- MF1 – 20 mM NH_4Ac o pH = 4,7 (A) + MeOH (B)
  - příprava MF1 A: Do kádinky s přibližně 400 ml redestilované vody jsme napipetovali 578 µl kyseliny octové a na nakalibrovaném pH metru upravili pH na 4,7 pomocí 25% roztoku amoniaku. Roztok jsme převedli do 500 ml odměrné baňky a doplnili redestilovanou vodou. Poté jsme pufr přefiltrovali na 0,45 µm filtru (Sulpeco) a přelili do zásobní lahve.

- MF2 – 20 mM NH_4Ac o pH = 5,8 (= A) + MeOH (= B)
    - příprava analogicky jako MF1
- MF3 – 0,1% kyselina mravenčí (FA; A) + MeOH (B)
- MIX5 – ekvimolární koncentrace všech 10 analytů v 0,1% kyselině mravenčí s přídavkem 2.10^{-5} M $^{15}N_2$ Xan
    - příprava kalibrační řady: z 50 µl zásobního roztoku o koncentraci $1,111 . 10^{-4}$ M každého z deseti studených standardů jsme odpipetovali 5 µl a přidali 45 µl 0,1% FA, opět odebrali 5 µl… K takto připravené koncentrační řadě jsme pak přidali vždy 5 µl roztoku $^{15}N_2$ Xan o koncentraci 2.10^{-4} M
- Bieleski roztok – směs MeOH / chloroform / H_2O / FA v objemovém poměru 12 / 3 / 4 / 1
- SCX ekvilibrační roztok – 2% FA v 50% MeOH
- SCX eluční roztok – směs 4 M amoniaku s MeOH v objemovém poměru 2:3
    - na 50 ml roztoku jsme přidali 5,45 ml 25% amoniaku ke 30 ml MeOH a v odměrné baňce doplnili H_2O (14,55 ml)
- 10 mM octan amonný, pH = 4,7
    - Do přibližně 45 ml H_2O jsme přidali 28,9 µl kyseliny octové, na pH-metru titrovali 25% amoniakem do pH = 4,7 a poté v odměrné baňce doplnili H_2O do objemu 50 ml
- 25 mM mravenčan amonný, pH = 3,8
    - Do přibližně 45 ml H_2O jsme přidali 57,5 µl kyseliny mravenčí a na pH-metru titrovali 25% amoniakem do pH = 3,8. Následně jsme roztok v odměrné baňce doplnili destilovanou vodou na objem 50 ml.
- 0,1 M octan amonný, pH = 5,6
    - Do přibližně 230 ml destilované vody jsme napipetovali 2,888 ml ledové kyseliny octové a na pH-metru titrovali 25% amoniakem na pH 5,6. Poté jsme roztok v odměrné baňce doplnili destilovanou vodou do objemu 250 ml.

4.6. Metody a pracovní postupy

4.6.1. Optimalizace CE-UV stanovení

Pokusy byly prováděny na CE sestavě Agilent s UV-ViS detektorem. Používali jsme nepokrytou křemennou kapiláru o vnitřním průměru 75 µm (vnější průměr 375 µm) a efektivní délce 56,5 cm (celková délka 65 cm) a pracovali jsme při teplotě 20°C. UV detekce probíhala při λ = 254 nm (ref. 330 nm) s frekvencí 5 Hz. Nástřik směsi všech deseti analytů o koncentraci 10^{-4}M byl prováděn hydrodynamicky 50 mbar/3 s. Složení nosného elektrolytu (BGE) se v průběhu vývoje metody měnilo.

Při prvním pokusu o separaci jsme vycházeli z podobných podmínek, jaké byly publikovány v práci (Adam et al., 1999), která se zabývá novorozeneckým *screeningem* dědičných metabolických chorob, tedy BGE1 (viz kapitola 4.5.) a napětí 30 kV. Při těchto podmínkách však docházelo ke koeluci některých analytů (viz obr. 10 v kap. 5.1.).

Proto jsme se rozhodli snížit napětí na 20 kV. Tím sice došlo k rozdělení některých píků, ne však všech (viz obr. 11). Snížili jsme tedy koncentraci SDS v BGE na 60 mM (BGE2; viz obr. 12). Přidáním 60 mM glycinu ($pK_a = 9{,}778$) jako druhého pufrovacího systému pak vznikl BGE3, při jehož použití jsme dosáhli separace všech analytů na základní linii (obr.13).

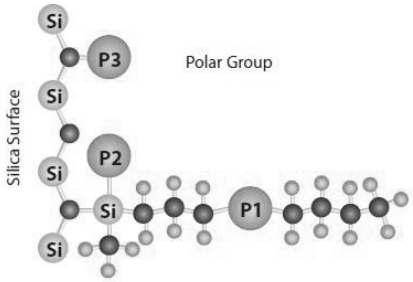
Přiřazení píků analytům probíhalo kombinovaným nástřikem 50 mbar/1s směsi všech deseti standardů o koncentraci 10^{-4} M a 50 mbar/3s každého jednotlivého standardu o koncentraci 10^{-4} M. Ředěním směsi standardů o koncentraci 10^{-4} M jsme pak získali koncentrační řadu (koncentrace 1.10^{-6} M; 5.10^{-6} M; 1.10^{-5} M; 2.10^{-5} M; 4.10^{-5} M; 6.10^{-5} M; 8.10^{-5} M a 1.10^{-4} M) použitou při zjištění stability retenčních časů, rozsahu linearity (signál/šum = 10 až počátek slévání sousedních píků), přesnosti a správnosti.

4.6.2. Vývoj UHPLC separace

V prvním pokusu jsme použili kolonu BetaMax Neutral od firmy Phenomenex, což je kolona s klasickým C18 sorbentem, ovšem s vysokým pokrytím (29%). To umožňuje separaci i velmi polárních analytů. Mobilní fáze byla MF1, tedy octan amonný o pH=4,7 (A) + MeOH (B), eluce probíhala isokraticky 97/3 A/B. Nastřikovali jsme 5 µl směsi standardů o koncentraci 10^{-4} M (tedy 0,5 nmol/nástřik).

Ve druhém pokusu byla použita stejná kolona, ovšem v kombinaci s MF2, která měla pH = 5,8, což je pH, při kterém by měly všechny analyty mít co nejmenší celkový náboj a tím pádem co nejvyšší retenční faktor *k* (Monser, 2004) (přesné pH=5,8 získáno výpočtem s použitím známých hodnot disociačních konstant, resp. pK, jednotlivých standardů). Ani v tomto uspořádání však separace nebyla dostatečná, proto jsme se rozhodli změnit kolonu.

Abychom zvýšili retenci analytů, rozhodli jsme se použít kolonu Pinnacle DB IBD od firmy Restek, což je kolona s reversní fází modifikovanou polárními substituenty k separacím polárních sloučenin (viz obr. 8).



Obrázek 8: Náčrtek sorbentu Pinnacle DB IBD. Jedná se o reversní fázi s polárními skupinami, které jsou vložené uvnitř alkylového řetězce (P1), tvoří samostatný postranní řetězec (P2) nebo polární pokrytí silanolové páteře sorbentu (P3). Obrázek převzat z katalogu společnosti Restek.

Mobilní fáze (MF2) byla 20 mM octan amonný o pH=5,8 (A) v kombinaci s methanolem (B), eluce probíhala isokraticky 97 % A : 3 % B. Jednotlivé standardy jsme naředili MF2 na koncentraci 10^{-4} M a postupně nastřikovali na ekvilibrovanou kolonu.

Protože předchozí pokusy o separaci nefungovaly, rozhodli jsme se změnit pH mobilní fáze do kyselé oblasti na 2,8 (MF3), podobně jako v pracích (Lu et al., 2006; Hartmann et al., 2006; Kaneko et al., 2009). Protože jsme v reálných extraktech předpokládali kontaminanty, použili jsme v tomto případě eluci gradientovou (viz tabulka 1), ačkoli všechny standardy se eluují již v úvodní isokratické fázi.

Tabulka 1: Průběh gradientové eluce použité na koloně Pinnacle IBD s MF3

průtok = 0,25 ml/min		
čas (min)	% A (0,1% FA)	% B (MeOH)
0	97	3
4	97	3
5	5	95
8	5	95
9	97	3
11	97	3

4.6.3. Vývoj MS/MS detekce

Současně s vývojem chromatografické separace jsme vyvíjeli i MS detekci. Nástřikem jednotlivých standardů v režimu *full scan* jsme změřili přesné m/z kvasimolekulárních iontů ($[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$), v režimu *daughter scan* poté jejich fragmentaci. Dominantní přechody byly poté použity při další optimalizaci kapilárního napětí, napětí na vstupní štěrbině a kolizních energií.

Ve třech po sobě jdoucích sériích nástřiků jsme poté zoptimalizovali napětí na vstupní štěrbině, napětí na kapiláře a kolizní energie pro jednotlivé analyty. Nastřikovali jsme vždy 5 µl směsi standardů o koncentraci 10^{-4} M a porovnávali plochy jednotlivých píků. Napětí na vstupní štěrbině bylo optimalizováno v rozmezí 10 – 40 V v krocích po 2 V, kapilární napětí v rozmezí 0,25 - 2 kV v krocích po 0,25 kV, kolizní energie v rozmezí 4 – 30 eV v krocích po 2 eV, viz tabulky 3, 4 a 5.

4.6.4. Validace UHPLC-MS/MS metody

Fungující UHPLC-MS/MS metodu jsme následně validovali na obou UPLC-MS/MS sestavách používaných v naší laboratoři - QuatroMicro i Xevo.

Opakovaným nástřikem 5 µl směsi studených standardů o koncentraci 10^{-4} M (0,5 nmol/nástřik) jsme zjistili jednodenní a mezidenní opakovatelnost retenčních časů. Poté jsme si připravili směs standardů MIX5 o stoupající koncentraci 10^{-11} – 10^{-4} M (50 amol – 0,5 nmol na nástřik) každého standardu s přídavkem vždy 2.10^{-5} M (100 pmol na nástřik) izotopově značeného standardu $^{15}N_2$ Xan. Tyto směsi jsme následně opakovaně nastřikovali a plochy píků jednotlivých standardů vynášeli do grafu jako log R proti log c, kde c je známá koncentrace studeného standardu a

$$R = \frac{P_{stud.std.}}{P_{\text{int}.std}} \cdot c_{\text{int}.std}$$

kde: R je odezva

$P_{stud\ std.}$ je plocha píku studeného standardu,

$P_{int.\ std.}$ je plocha píku interního standardu a

$c_{int.\ std}$ je známá koncentrace interního standardu

Dvojitě logaritmické vynesení je totiž při rozpětí kalibrace přes několik řádů přesnější než lineární. Na vynesených výsledcích jsme následně provedli regresi a zjistili tak kalibrační rovnice a korelační koeficienty pro jednotlivé látky. Přesnost a správnost jsme poté vyhodnocovali jako RSD ploch při opakovaném nástřiku, respektive průměrnou relativní chybu (% bias) při stanovení známé koncentrace (tabulky 7 a 8).

4.6.5. Optimalizace podmínek přípravy vzorku

Protože rostlinná biologická matrice je velmi složitá a obsahuje mnoho látek, které by potenciálně mohly kontaminovat LC kolonu nebo interferovat se stanovením purinových derivátů, bylo nutné vzorky před měřením přečistit. Pro svou reprodukovatelnost a snadnost použití je dnes velmi oblíbeným způsobem přípravy vzorku extrakce na pevné fázi (SPE). My jsme v této práci testovali šest různých SPE sorbentů (C18, HLB, SCX, MCX, PVPP a MAX).

Výchozím materiálem pro optimalizaci extrakci byly vždy prýty *A. thaliana* homogenizované v třecí misce tloučkem za chlazení kapalným dusíkem na jemný prach. Z něho jsme odvážili 0,1 g (v případě PVPP 0,25 g), a extrahovali příslušným činidlem. Po extrakci byly vzorky přečištěny na SPE kolonkách, kdy jsme do skleněných zkumavek jímali všechny frakce (*flow through*, *wash1*, *wash2* a *elution*). Následně byl obsah všech zkumavek do sucha odpařen na dusíkové nebo vakuové rotační odparce a odparek rozpuštěn v 60 µl 0,1% FA nebo TCA. Ve všech frakcích byl poté stanoven obsah hledaných analytů. Stanovení probíhalo vždy v šesti replikátech, z nichž ve třech bylo před extrakcí přidáno 60 µl směsi studených standardů

o koncentraci 10^{-4} M. Účinnost dané purifikační metody byla poté vyhodnocena jako návratnost metody. Návratnost SPE metody jsme poté zjistili jako:

$$návratnost = \frac{P_{sp} - P_n}{P_{std}}$$

kde: P_{sp} je plocha analytu ve vzorku se spikem
P_n je plocha ve vzorku bez spiku
P_{std} je plocha standardu

Jako první jsme testovali použití běžné reversní fáze (C18, Varian), na které by se podle výsledků získaných při vývoji LC metody purinové deriváty téměř neměly zadržovat a proto by se měly vyskytovat ve *flow through* frakci. K 0,1 g rostlinného homogenátu jsme přidali 1 ml 10 mM octanu amonného o pH = 4,7, zahřáli na 95°C po dobu 3 min a extrahovali 3 hod za mírného míchání při 4°C. Kolonky (o objemu 1 ml) byly nejprve kondicionovány 2 ml čistého MeOH a poté ekvilibrovány 4 ml 10 mM octanu amonného. Následně byl na kolonky nanesen centrifugovaný extrakt (5 min, 10000 x g) extrakt, *flow through* byl jímán do připravené zkumavky. Kolonky byly poté promyty ještě 2 ml 10 mM octanu amonného (*wash 1*), 2 ml H_2O (*wash 2*) a 2 ml 80% MeOH s 2% kyselinou octovou (*elution*). Všechny frakce byly jímány do skleněných zkumavek a v nich následně odpařeny do sucha na dusíkové odparce. Po odpaření jsme sušinu rozpustili v 60 µl 0,1% FA (vortex, ultrazvuk), přenesli do vialek a pomocí UHPLC-MS/MS stanovovali obsah jednotlivých derivátů.

V dalším pokusu jsme se pokoušeli o přečištění purinových derivátů na Oasis HLB kolonkách. HLB sorbent je kopolymer divinylbenzenu s vinylpyrrolidinonem (viz obr. 9), který zajišťuje větší retenci polárních sloučenin. Pokus jsme realizovali opět ve dvou triplikátech bez a se spikem 60 µl směsi standardů o koncentraci 10^{-4} M. K 0,1 g rostlinného homogenátu jsme přidali 1 ml destilované vody, zahřáli na 95°C po dobu 3 min a extrahovali při 4°C 3 hod za mírného míchání. HLB kolonky jsme kondicionovali 6 ml MeOH a ekvilibrovali 6 ml H_2O. Poté jsme nanesli supernatant centrifugovaného extraktu (10000 x g / 5 min) a *flow through* jímali do připravené zkumavky. Kolonky jsme promyli 6 ml 5% MeOH (*wash1*) a 6 ml 25% MeOH (*wash2*). Následně jsme kolonky eluovali 6 ml 2% amoniaku v 35% MeOH. Všechny frakce jsme jímali do připravených zkumavek a následně do sucha odpařili na dusíkové odparce. Po odpaření jsme sušinu rozpustili v 60 µl 0,1% FA (vortex, ultrazvuk), přenesli do vialek a na UHPLC-MS/MS měřili obsah purinových a pyrimidinových derivátů.

Dalším sorbentem, který jsme testovali, byl silný katex (SCX, Varian). Nukleové báze se snadno ionizují a v kyselých roztocích proto mohou vystupovat jako kationty. 0,1 g homogenátu prýtů *A. thaliana* jsme extrahovali 3 hod při 4°C do 1 ml Bieleského roztoku za mírného míchání. SCX kolonky jsme kondicionovali 5 ml MeOH a následně ekvilibrovali 5 ml SCX ekvilibračního roztoku. Nanesli jsme supernatant extraktu zbaveného pevných částic (centrifugace 5 min, 10000 x g). Do skleněných zkumavek jsme jímali *flow through* frakci. Poté

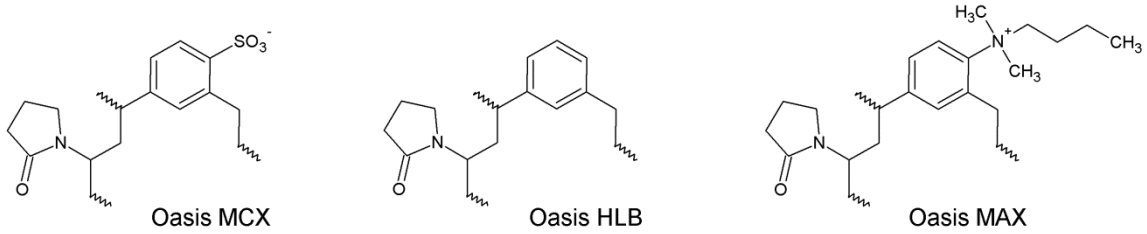
jsme kolonky promyli 5 ml Bieleského roztoku (*wash 1*) a 5 ml MeOH (*wash2*). Obě frakce jsme jímali do skleněných zkumavek. Následně jsme kolonky eluovali 5 ml SCX elučního roztoku a eluát jímali. Všechny frakce jsme poté do sucha odpařili na vakuové rotační odparce a sušinu rozpustili v 60 µl 0,1% TCA. Tyto vzorky jsme poté přenesli do vialek a měřili v nich obsah jednotlivých látek pomocí UHPLC-MS/MS.

Směsný katex Oasis MCX je, podobně jako Oasis HLB, kopolymer divinylbenzenu s vinylpyrrolidinonem, ovšem navíc je zde substituce sulfoskupinami, což sorbentu zajišťuje vlastnosti katexu (struktura sorbentu viz obr. 9). K 0,1 g homogenátu prýtů *A. thaliana* jsme přidali 1 ml 25 mM mravenčanu amonného o pH = 3,8 (AF), zahřáli na 95°C po dobu 3 min a extrahovali za mírného míchání při teplotě 4°C 3 hod. Kolonky Oasis MCX jsme nejprve kondicionovali 3 ml MeOH a následně ekvilibrovali 3 ml 25 mM AF o pH = 3,8. Extrakt jsme centrifugovali 5 min při 10000 x g, abychom odstranili pevné částice a supernatant poté nanesli na ekvilibrovanou MCX kolonku. *Flow through* jsme jímali do skleněné zkumavky. Následně jsme kolonku promyli 3 ml 25 mM AF o pH = 3,8 (*wash1*) a 0,1% FA v MeOH (*wash2*). Poté jsme kolonku eluovali 5% amoniakem v 80% MeOH. Všechny frakce jsme jímali do skleněných zkumavek, do sucha odpařili na vakuové rotační odparce a sušinu rozpustili v 60 µl 0,1% FA. Po rozpuštění jsme vzorky přenesli do vialek a pomocí UHPLC-MS/MS stanovovali obsah purinových a pyrimidinových derivátů.

Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) je sorbent užívaný m. j. i k extrakci krátkých nukleotidových řetězců díky tvorbě vodíkových můstků pyrrolidonových zbytků s nukleovými bázemi. K 0,25 g homogenátu *A. thaliana* jsme přidali 1 ml Bieleského roztoku a extrahovali přes noc při 4°C za mírného míchání. Následně jsme extrakt centrifugovali 5 min při 10000 x g, supernatant odpipetovali do čisté zkumavky, přidali 600 µl vody, důkladně promíchali a centrifugovali dalších 10 min při 10000 x g. K přibližně 1 g práškového PVPP jsme přidali 50 ml 0,1 octanu amonného o pH = 5,6 a důkladně promíchali. Po 20 min jsme směs dekantovali a přidali 50 ml čerstvého pufru; totéž jsme zopakovali ještě dvakrát (tedy celkem 4x). Do prázdné SPE kolonky jsme vložili fritu a na ni pipetou s uříznutou špičkou nanesli tolik nabotnalého PVPP, aby sorbent po usazení vytvořil přibližně centimetr vysoký sloupec. Na takto připravené PVPP kolonky jsme poté nanášeli horní vodnou fázi extraktu a do skleněné zkumavky jímali *flow through*. Ten jsme zředili 1:1 96% ethanolem a nanesli na 500 mg C18 kolonku (Sep-Pak) kondicionovanou 96% ethanolem a ekvilibrovanou 50% ethanolem. Opět jsme jímali *flow through*, ten jsme do sucha odpařili na dusíkové odparce a sušinu rozpustili v 60 µl 0,1% FA pro UHPLC-MS/MS analýzu.

Oasis MAX je dalším derivátem sorbentu HLB. Jedná se o směsný anex substituovaný kvarterními aminoskupinami (struktura viz obr. 9). K 0,1 g homogenátu prýtů *A. thaliana* jsme

přidali 1 ml 5% amoniaku, zahřáli na 95°C po dobu 3 min a extrahovali při 4°C a za mírného míchání 3 hod. Poté jsme extrakt centrifugovali 5 min při 10000 g, abychom odstranili pevné částice. Oasis MAX kolonky jsme nejprve kondicionovali 2 ml MeOH a ekvilibrovali 2 ml 5% amoniaku. Následně jsme nanesli extrakt (supernatant) a *flow through* frakci jímali do skleněné zkumavky. Kolonky jsme promyli 5% amoniakem (*wash1*) a 2% tetrabutylammonium-hydroxidem v MeOH (*wash2*). Následně jsme kolonky eluovali 2% FA v MeOH. Všechny frakce jsme jímali do skleněných zkumavek, odpařili do sucha na vakuové odparce a odparek rozpustili v 60 µl 0,1% TCA. Vzorky jsme přenesli do vialek a měřili obsah purinů a pyrimidinů pomocí UHPLC-MS/MS.



Obrázek 9: Struktura sorbentů Oasis používaných při SPE.

4.6.6. Stanovení obsahu purinů a pyrimidinů v buňkách suspenzní kultury *Physcomitrella patens*

Vyvinutou metodu stanovení hladin purinů a pyrimidinů v rostlinném pletivu jsme použili ke kvantifikaci těchto látek v buňkách suspenzní kultury mechu čepenky odstálé *Physcomitrella patens*.

Suspenzní kultury *P. patens* byly kultivovány v laboratoři prof. von Schwartzenberga na univerzitě v Hamburku. Kultivace probíhala v klimakomoře při 25°C za podmínek dlouhého dne (16 hod světlo 50 µmol . m^{-2} . s^{-1}, 8 hod tma) v tekutém A'BCDTV mediu (podle Wang et al., 1980). Vzorky byly sbírány po 21 dnech kultivace. Odebraná buněčná suspenze byla přefiltrována přes 100 µm a 50 µm filtry (Wilson-filters, Abingdon, UK), buňky byly zváženy a následně lyofilizovány při -20°C. Lyofilizát byl poté doručen poštou do Olomouce.

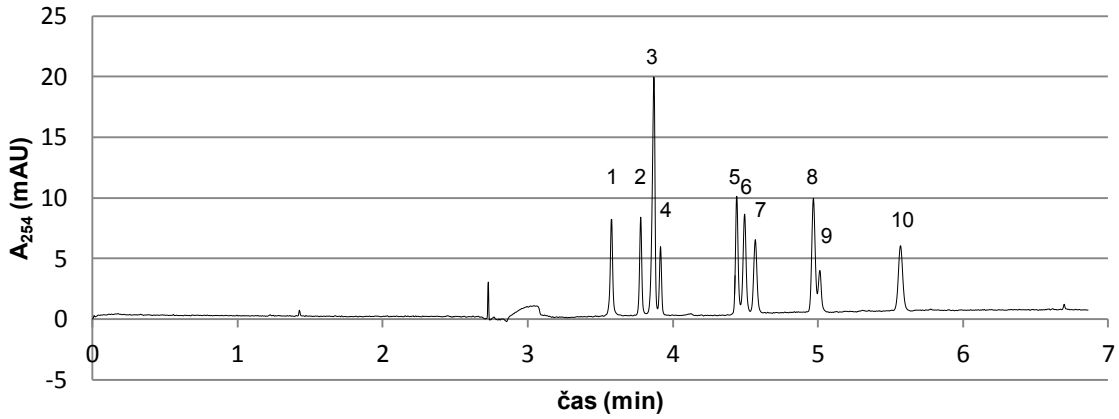
Z lyofilizátu jsme odvážili přibližně přesně 7 mg (což podle uvedené váhy před a po lyofilizaci odpovídá asi 100 mg čerstvé váhy), přidali 800 µl vychlazené redestilované vody, wolfram-karbidovou kuličku a homogenizovali v kulovém mlýnku (27 Hz, 3 min). Poté jsme homogenát zahřívali v termobloku při 95°C 3 min (denaturace proteinů), zchladili na ledu a přidali 200 µl 25% amoniaku. Další postup extrakce a purifikace probíhal tak, jak je popsán v předchozí kapitole, pouze odparek nebyl rozpuštěn v čisté 0,1% TCA, ale ve směsi 6 µl 2 . 10^{-4} M $^{15}N_2$-xan a 54 µl 0,1% TCA.

Stanovení jednotlivých látek probíhalo jednak ve „*wild type*“ (WT) *P. patens*, jednak v *single*-mutantech, kde byl knockoutován gen pro PpNSH1 (PpNSH1-*ko*), PpNSH2 (PpNSH2-*ko*) nebo PpNSH3 (PpNSH3-*ko*). Stanovení probíhalo pro WT i mutanty ve čtyřech nezávislých biologických opakováních (4 kultivace WT a po 4 PpNSHx-*ko*), v každém z nich ve třech replikátech (tedy celkem 48 vzorků). Každý vzorek byl nastříknut třikrát, získané tři hodnoty R (viz kap. 4.6.4.) byly zprůměrovány a z nich vypočteny hladiny jednotlivých analytů v každém vzorku a jejich směrodatná odchylka. Zprůměrováním hladin v jednotlivých replikátech a biologických opakováních jsme pak získali koncentrace jednotlivých látek ve WT a mutantech.

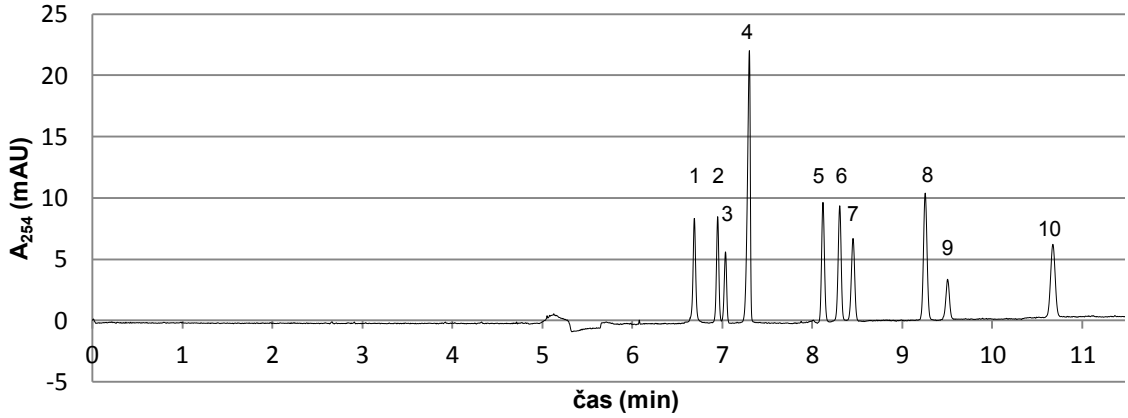
5. VÝSLEDKY

5.1. Optimalizace podmínek CE-UV kvantifikace

Naší snahou bylo dosáhnout dokonalé separace všech deseti analytů technikou micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s UV detekcí. Při použití napětí 30 kV však docházelo k neúplné separaci píků 2-4, 5-7 a 8-9 (viz obr. 10). Proto jsme se rozhodli snížit napětí na 20 kV, čímž došlo ke zlepšení separace, nicméně píky 2-3 stále nebyly dokonale separovány (obr. 11).

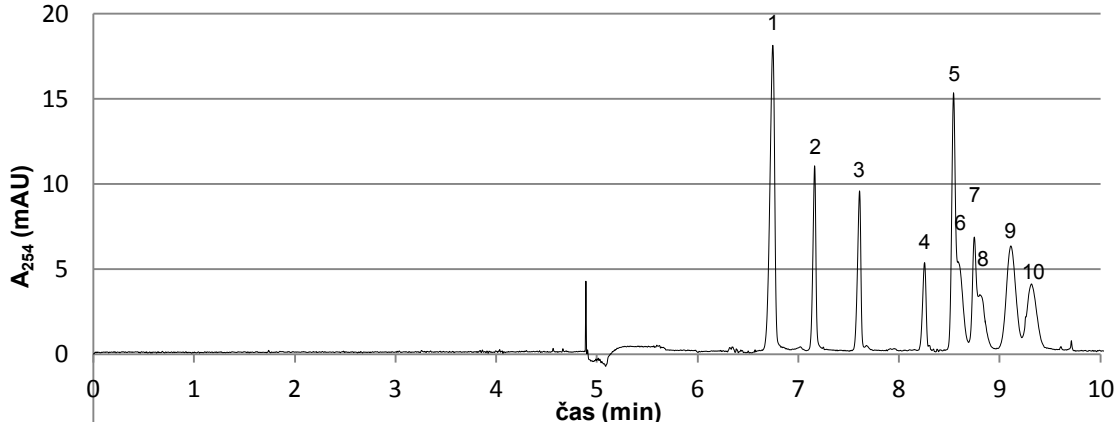


Obrázek 10: Elektroferogram směsi všech deseti analytů o koncentraci 10^{-4} M při použití BGE1 a napětí 30 kV.



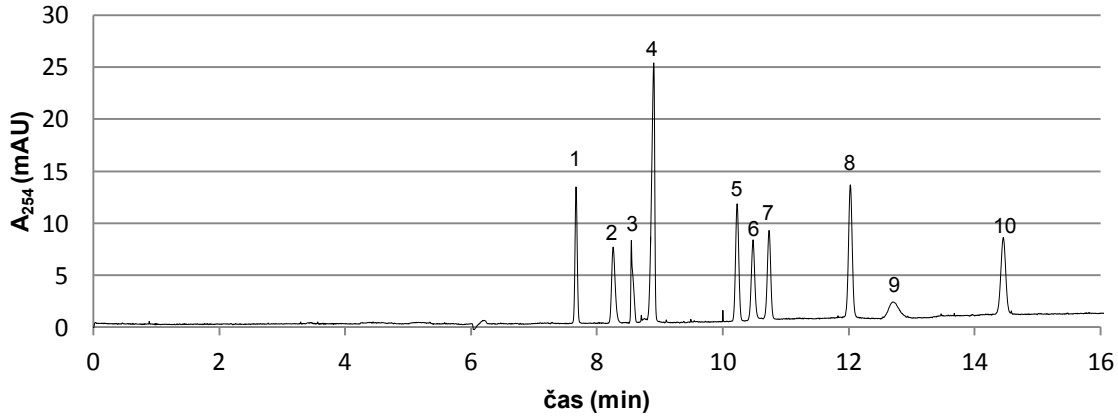
Obrázek 11: Elektroferogram směsi všech deseti analytů o koncentraci 10^{-4} M při použití BGE1 a napětí 20 kV.

Při použití BGE2 došlo k dokonalé separaci dříve migrujících analytů (s nižšími mobilitami), nicméně později migrující analyty (vyšší mobility) byly separovány hůře (obr. 12).



Obrázek 12: Elektroferogram směsi všech deseti analytů o koncentraci 10^{-4} M při použití BGE2 a napětí 20 kV.

Použitím BGE3 jsme dosáhli úplné separace všech deseti analytů (obr. 13).



Obrázek 13: Elektroferogram směsi všech deseti analytů o koncentraci 10^{-4} M při použití BGE3 a napětí 20 kV.

Přídavkem jednotlivých standardů jsme definitivně přiřadili píky analytům, kterým náleží (tabulka 2). Opakovaným nástřikem směsi standardů o koncentraci 1 – 100 μmol . dm^{-3} jsme pak určili opakovatelnost retenčních časů, kalibrační přímku a přesnost a správnost metody (tabulka 2).

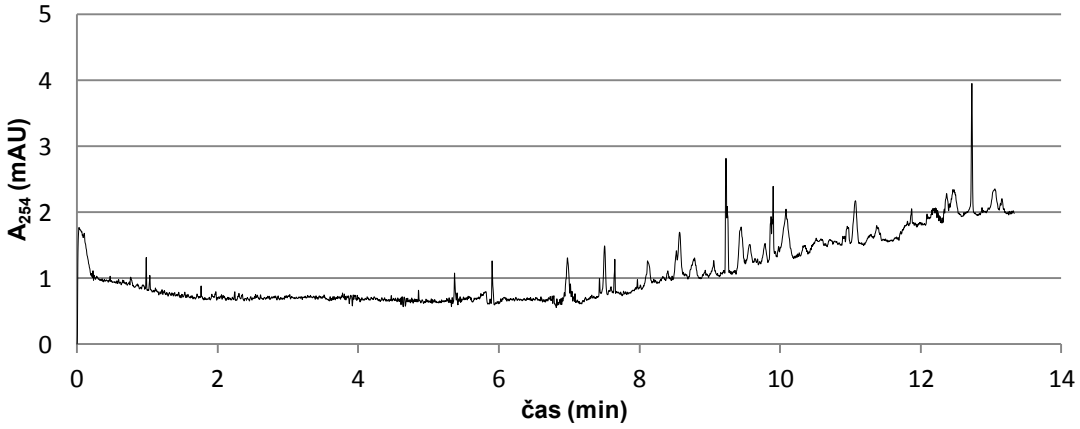
Tabulka 2: Přiřazení píků analytům a analytické údaje pro CE stanovení.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

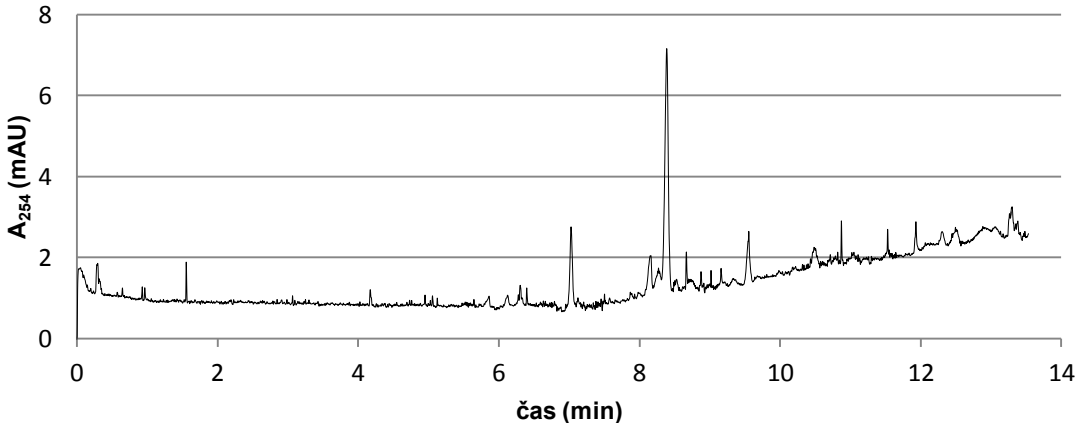
pík	látka	migrační čas (min)	SD	RSD	rozsah linearity (µmol/l)	kalibrační rovnice*	R^2	přesnost (% RSD)	správnost (% bias)
1	ade	7,7	0,022	0,28%	5 - 80	y = 1048443,9877x + 1,0312	0,9992	3,46%	-2,75%
2	gua	8,29	0,028	0,34%	5 - 80	y = 1310529,9759x + 5,7643	0,9971	4,95%	22,70%
3	ura	8,61	0,054	0,62%	5 - 80	y = 223290,6551x + 0,4828	0,9992	5,54%	-2,52%
4	ado	8,89	0,012	0,14%	5 - 100	y = 2312120,5792x + 1,5319	0,9994	4,20%	-1,00%
5	hyp	10,28	0,045	0,44%	5 - 80	y = 1588177,0935x + 1,7307	0,9995	3,79%	-1,27%
6	guo	10,52	0,031	0,29%	5 - 100	y = 346510,1962x + 3,2235	0,9915	11,23%	-8,80%
7	uri	10,78	0,033	0,31%	5 - 100	y = 1351321,4619x - 0,5431	0,9990	2,46%	0,92%
8	ino	12,07	0,037	0,30%	5 - 100	y = 2016474,5185x + 1,8360	0,9992	3,92%	-1,50%
9	xan	12,65	0,045	0,36%	5 - 80	y = 940727,9826x + 0,4597	0,9983	5,34%	3,47%
10	xao	14,42	0,033	0,23%	5 - 80	y = 1397602,1130x - 0,2530	0,9985	3,82%	0,62%

*) y je plocha píku, x je koncentrace v mol/l

Následně jsme se pokusili báze a nukleosidy kvantifikovat v hrubém extraktu z 0,1 g rostlinného materiálu a v extraktu po SPE na MAX kolonkách (obr. 14 a 15; purifikační protokol viz kapitola 4.6.5.).



Obrázek 14: Elektroferogram hrubého extraktu při použití BGE3 a napětí 20 kV.

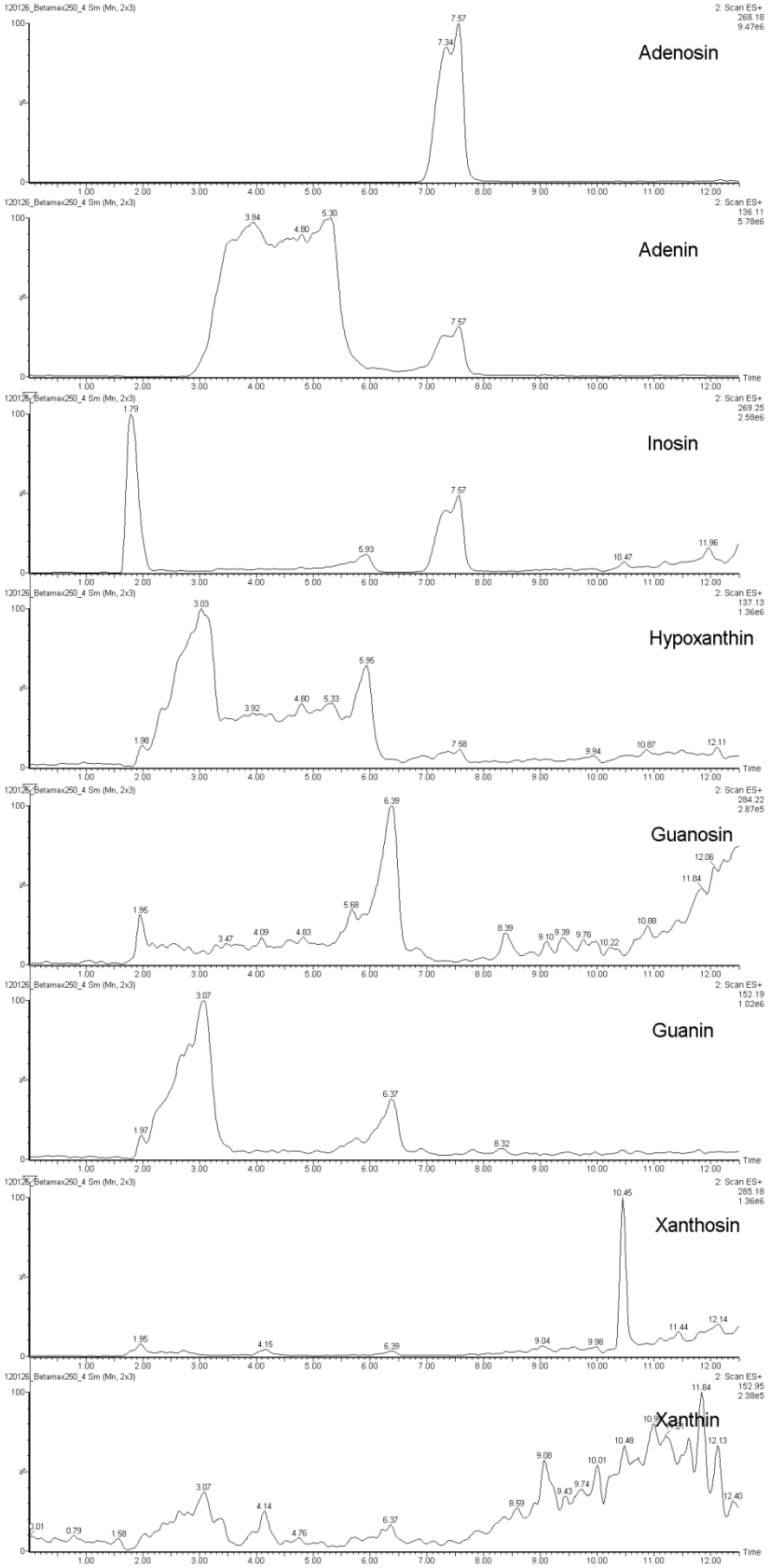


Obrázek 15: Elektroferogram extraktu po SPE na MAX kolonce při použití BGE3 a napětí 20 kV.

Zjistili jsme ovšem, že v rostlinném materiálu je koncentrace analytů příliš nízká pro prostou UV detekci (optická dráha je pouze 75 μm) a bylo by nutno použít citlivější detekční metodu, ideálně hmotnostní spektrometrii (MS). Spojení CE s MS je ale technicky dosti náročné a nepříliš spolehlivé, obzvláště při spojování přístrojů různých výrobců (T. Berés a O. Novák, osobní konzultace), proto jsme se rozhodli celou analýzu realizovat na systému UHPLC-MS/MS.

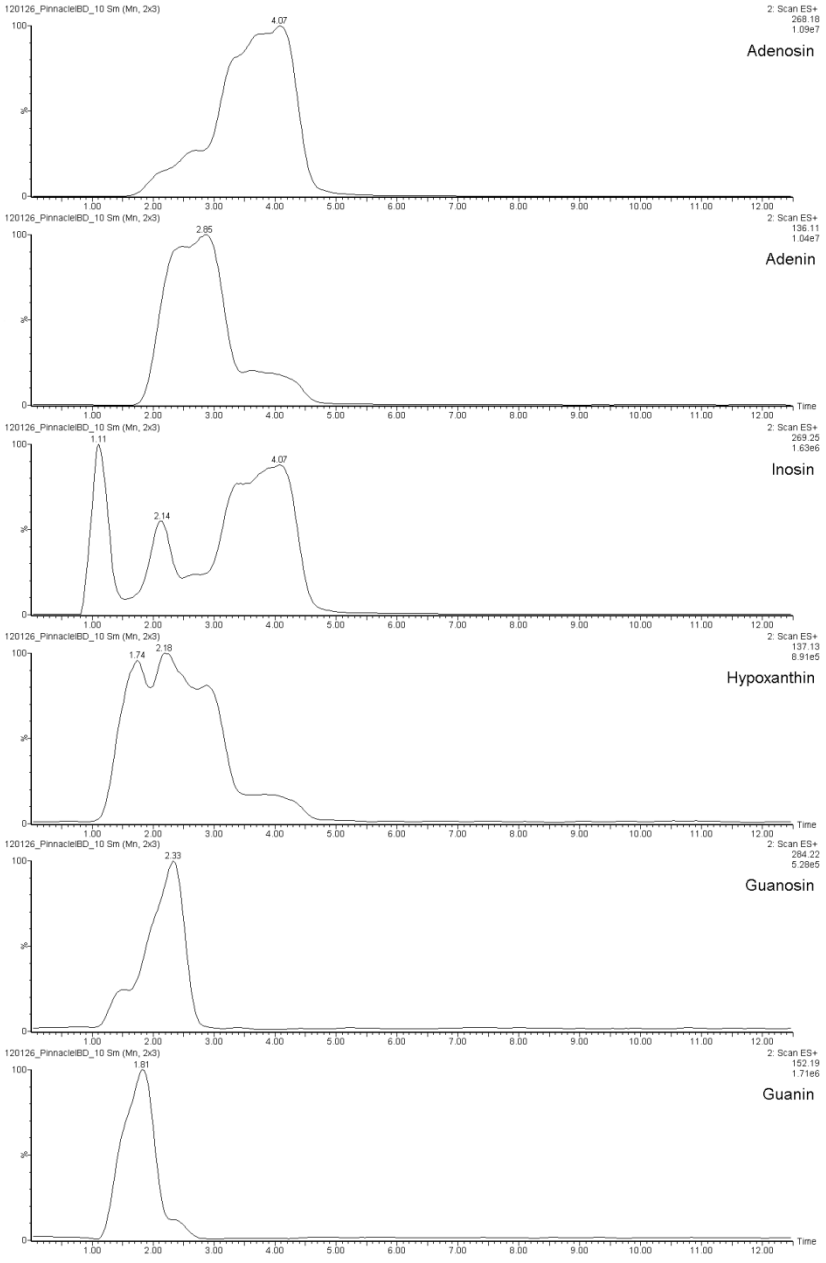
5.2. Optimalizace podmínek chromatografické separace

V prvním pokusu jsme použili na koloně s oktadecylovou reversní fází (BetaMax neutral) MF1 o pH = 4,7. V tomto uspořádání se všechny analyty eluovaly těsně za mrtvým objemem kolony bez jakékoli separace. Po zvýšení pH mobilní fáze na 5,8, což je hodnota získaná zprůměrováním pK_a xan (7,41) jako nejkyselejšího analytu a pK_b ade (4,17) jako analytu nejbazičtějšího došlo k silnější retenci. Při tomto pH by měly mít všechny analyty nejvyšší retenční faktor *k* (Monser, 2004). Ani v tomto uspořádání ale nedocházelo téměř k žádné separaci a píky byly natolik rozmyté, že nebylo možné jednoznačně určit retenční časy (viz obr. 16).

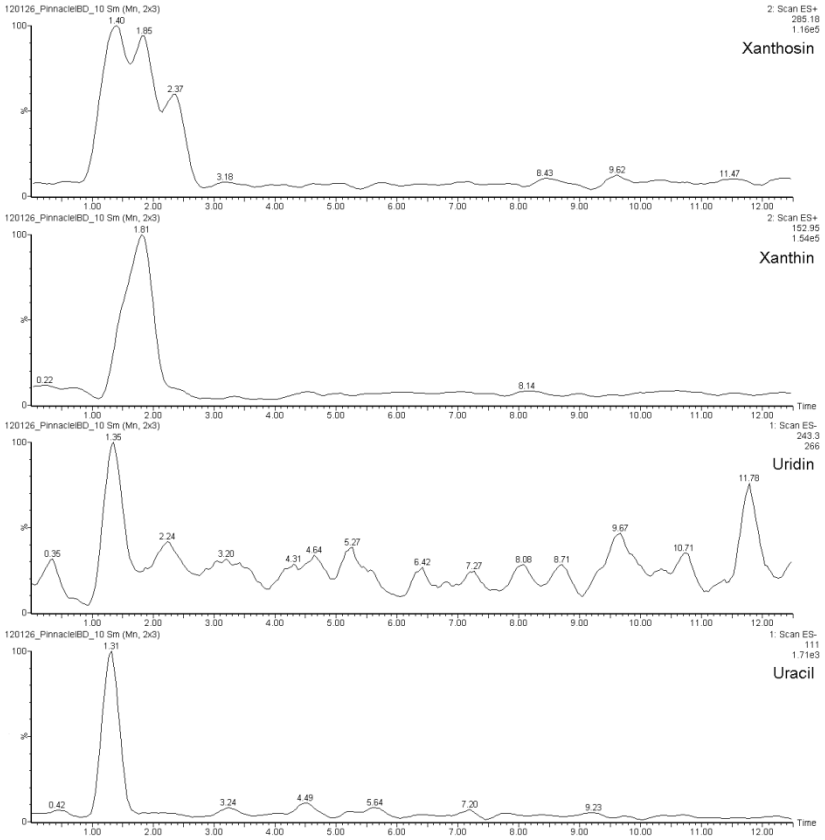


Obrázek 16: Iontové chromatogramy osmi analytů při použití kolony BetaMax a MF2 (pH = 5,8).

Při použití kolony Pinnacle DB IBD s MF2 docházelo ke koeluci téměř všech analytů (viz obr. 17). Při použití hmotnostní detekce sice není nutná úplná separace všech látek, nicméně je třeba odseparovat vždy bázi od jejího nukleosidu (protože nukleosid se již v iontovém zdroji částečně fragmentuje a přispívá tak k ploše píku báze) a také od analytů, které se ve své molekulové hmotnosti liší o jednotku (protože lehčí iont pak přispívá k ploše píku těžšího iontu jednak díky izotopickému příspěvku, jednak díky nízkému rozlišení přístroje).

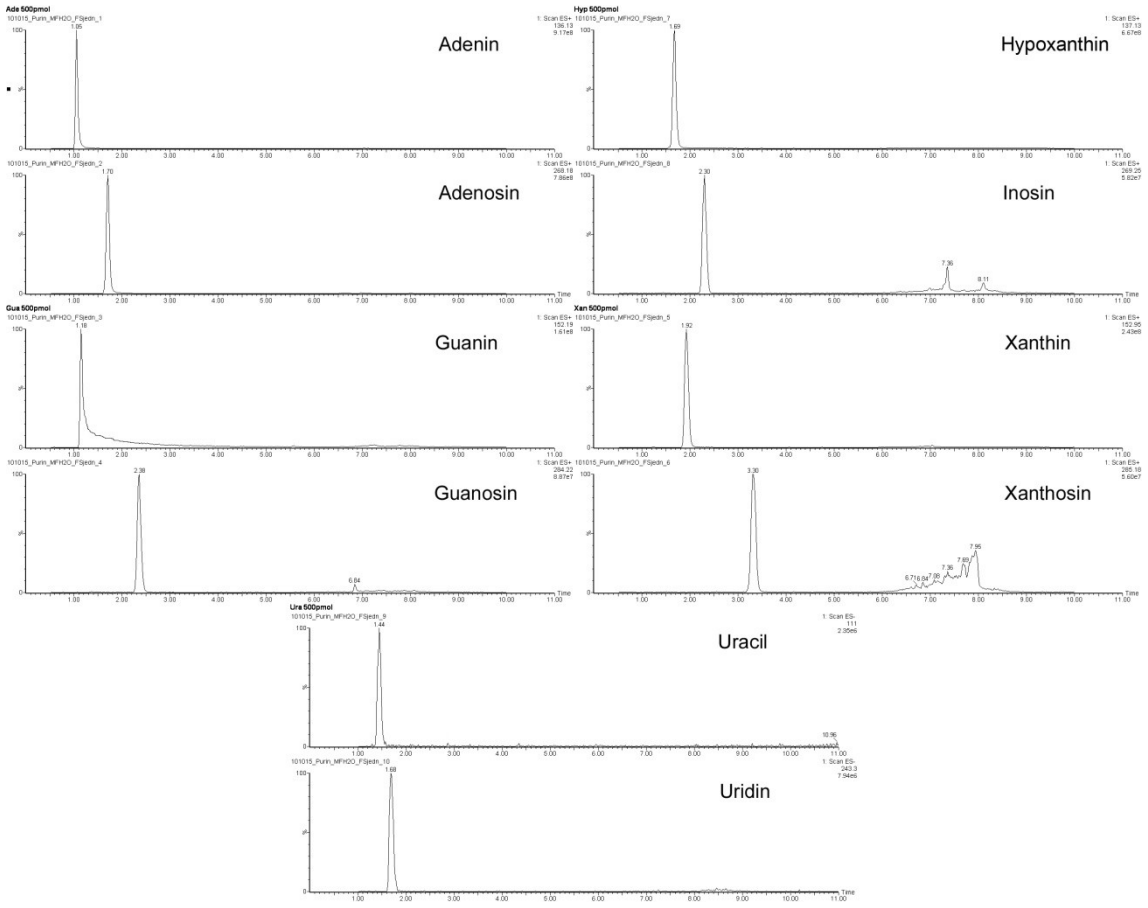


Obrázek 17a: Iontové chromatogramy všech deseti analytů při použití kolony Pinnacle DB IBD a MF2 (pH = 5,8).



Obrázek 17b: Iontové chromatogramy všech deseti analytů při použití kolony Pinnacle DB IBD a MF2 (pH = 5,8).

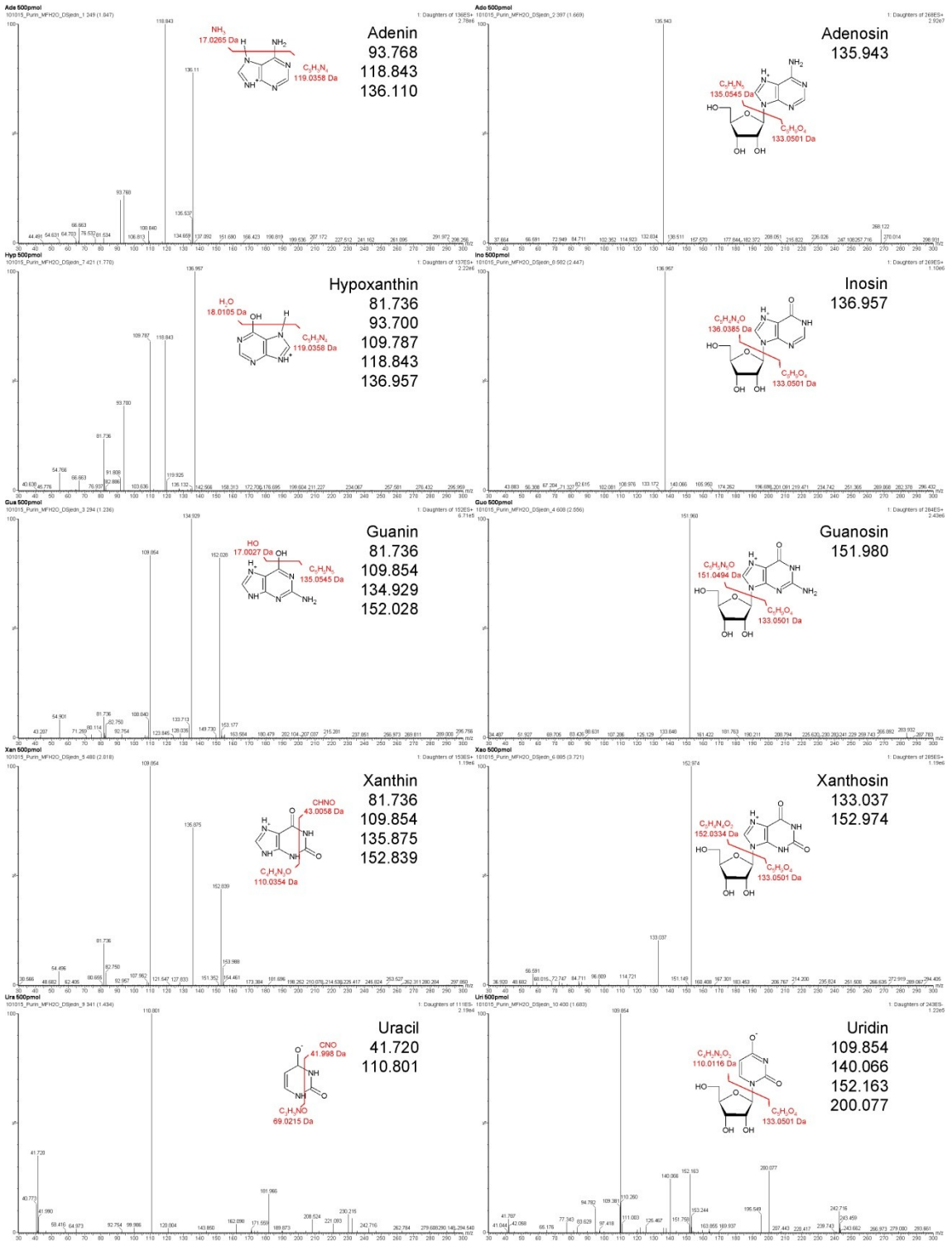
Při použití MF3 sice dochází k částečné koeluci některých látek (ade a gua, hyp, ado a xan, ino a guo), všechny kritické páry se ale separují, takže při použití hmotnostní detekce je možné kvantifikovat všech deset analytů (obr. 18). Podobné uspořádání (kolona s polárními funkčními skupinami a MF o nízkém pH) bylo použito například v metabolomické studii zabývající se stanovením dusíkatých metabolitů v bakteriální buňce (Lu et al., 2006).



Obrázek 18: Iontové chromatogramy jednotlivých standardů při použití kolony Pinnacle DB IBD a MF3

5.3. Optimalizace podmínek hmotnostní detekce

Fragmentační spektra jednotlivých standardů jsou zobrazena v obr. 19, přehled rodičovských a dceřiných iontů pak v tabulce 6.



Obrázek 19: Hmotnostní spektra fragmentace jednotlivých iontů zaznamenaná v režimu daughter scan.

Plochy píků jednotlivých standardů při použití různého napětí na vstupní štěrbině jsou zobrazeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Plochy píků jednotlivých standardů při použití různých štěrbinových napětí (ve V). Vybrané nejvyšší plochy vyznačeny **tučně** a zvýrazněny.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

cone voltage (V)	ade 136,11	gua 152,19	ura 111,00	uri 243,30	ado 268,18	hyp 137,13	xan 152,95	ino 269,25	guo 284,22	xos 285,18
10	67590	12499	175	94	469169	4039	3251	41643	61228	14058
12	83194	16534	301	238	558844	5997	4572	42493	67017	17320
14	91768	18478	445	412	602082	7048	5457	39351	66246	18179
16	134325	24741	927	1031	**905413**	10478	7387	59776	108282	**18415**
18	143911	27248	1137	1363	866458	11349	8469	61296	110834	17207
20	151798	29802	1301	1734	801369	12014	10328	63604	**111660**	14563
22	165089	32934	**1420**	2153	702443	12901	11767	**64476**	110203	12110
24	166230	33692	1384	**2342**	565611	12861	12200	57856	98095	10048
26	**168569**	34267	1288	2309	423623	**12950**	**12656**	48397	82613	8026
28	165520	**34411**	1138	2101	297325	12693	12233	35552	63952	6426
30	160125	33258	953	1756	198761	12245	11491	24565	46459	5158
32	154794	31727	751	1424	134409	11949	10762	17016	34010	4066
34	147387	30572	586	1078	86340	11470	9397	10579	23510	3091
36	137571	27935	417	799	56130	11035	8442	6569	16234	2385
38	124172	25105	308	556	38323	10316	7515	4308	11580	1812
40	113093	22515	226	425	28153	9802	0	3050	8948	0

Plochy píků jednotlivých standardů při použití různých kapilárních napětí jsou zobrazeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Plochy píků jednotlivých standardů při použití různých kapilárních napětí (v kV). Vybrané kapilární napětí vyznačeno podtržením, nejvyšší odezvy jednotlivých standardů vyznačeny **tučně** a zvýrazněním.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

capillary voltage (kV)	ade 136,11	gua 152,19	ura 111,00	uri 243,30	ado 268,18	hyp 137,13	xan 152,95	ino 269,25	guo 284,22	xao 285,18
0,25	**168715**	58071	1234	**4876**	646941	26098	6710	38419	108268	76096
0,50	150268	158253	1079	3657	1408703	56719	20375	75880	228430	148179
0,75	153781	209876	**1184**	4172	1610083	57088	31393	84644	252196	**156267**
1,00	149215	227612	1043	4268	**1693209**	**57257**	37943	**86160**	**252527**	155015
1,25	139730	**234786**	1023	**4358**	1648498	55242	43191	82078	248927	149762
1,50	136831	228268	880	4219	1643755	53137	46201	77477	241727	143482
1,75	128590	228515	840	4234	1617881	50052	48927	75380	233951	138837
2,00	123048	226727	807	4030	1585715	50531	**50072**	73111	228220	134582

Plochy píků jednotlivých standardů při použití různých kolizních energií jsou zobrazeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Plochy píků jednotlivých standardů při použití různých kolizních energií. Vybrané nejvyšší plochy vyznačeny **tučně** a zvýrazněním.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

collision energy (eV)	ade 136,11 >118,84	gua 152,19 >134,93	ura 111,00 >41,72	uri 243,30 >109,85	ado 268,18 >135,94	hyp 137,13 >118,84	xan 152,95 >109,92	ino 269,25 >136,96	guo 284,22 >151,98	xao 285,18 >152,97
4	4103	22207	66	73	343210	1805	4216	55673	136286	115833
6	10650	51214	132	172	770705	4438	9899	71520	205486	148727
8	26104	90008	338	433	1299576	11573	18210	**75425**	246105	**154858**
10	50382	127389	616	906	1691803	23020	26729	72926	**254953**	141842
12	81599	163544	**694**	1800	**1852587**	38487	33991	67980	245433	122896
14	114113	**173894**	586	2269	1828272	51237	**36412**	63426	231172	105941
16	134141	165466	438	**2462**	1727889	**55521**	32815	59041	214853	89869
18	**136246**	141505	343	2195	1605266	51929	27176	54708	199092	75429
20	123410	108514	237	1761	1462033	43004	19780	49559	180054	59778
22	101830	75758	193	1266	1334447	31059	13964	45524	160281	46354
24	76245	49645	131	939	1191794	21084	8708	41264	137942	34340
26	53240	30881	135	561	1079750	13718	5535	37300	116715	24914
28	35384	17727	101	379	945301	8256	3211	32536	94837	16847
30	22439	9930	105	251	819901	4720	1912	27766	73730	11053

Souhrn všech optimalizovaných nastavení MS/MS detekce v tabulce 6.

Tabulka 6: Souhrn všech optimalizovaných nastavení MS/MS detekce

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

	rodičovský iont (m/z)	dceřinný iont (m/z)	kapilární napětí (kV)	napětí na vstupní štěrbině (V)	kolizní energie (eV)
ade	136,11	118,84	1,00	26	16
gua	152,19	134,93		28	14
ura	111,00	41,72		22	12
ado	268,18	135,94		16	12
uri	243,30	109,85		24	16
hyp	137,13	118,84		26	16
xan	152,95	109,92		26	14
ino	269,25	136,96		22	8
guo	284,22	151,98		20	10
xao	285,18	152,97		16	8

5.4. Validace UHPLC-MS/MS metody

Analytické parametry naší UHPLC-MS/MS metody pro stanovení purinů jsou uvedeny pro sestavu QuatroMicro v tabulce 7 a pro sestavu Xevo v tabulce 8.

Tabulka 7: Analytické parametry UHPLC-MS/MS metody pro stanovení purinů na sestavě QuatroMicro.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

	retenční čas (min)	SD	LOD (mol/l)	LOQ (mol/l)	kalibrační rce*	R^2	přesnost (%RSD)	správnost (%bias)
ade	1,067	0,013	1,0E-08	1,0E-06	y = 1,2975x + 2,0733	0,9917	14,93%	0,94%
gua	1,181	0,010	1,0E-07	1,0E-06	y = 1,4243x + 1,9138	0,9938	15,16%	0,70%
ura	1,399	0,019	2,5E-05	5,0E-05	y = 1,5481x - 1,6467	0,9947	21,78%	0,23%
ado	1,559	0,021	1,0E-10	1,0E-06	y = 1,5276x + 2,5761	0,9925	17,08%	0,84%
uri	1,608	0,019	5,0E-06	7,5E-06	y = 1,5613x - 1,2005	0,9941	26,91%	0,48%
hyp	1,720	0,030	1,0E-10	1,0E-06	y = 1,4469x + 1,3342	0,9899	14,01%	1,15%
xan	1,903	0,013	1,0E-10	1,0E-06	y = 0,9792x + 1,7428	0,9963	14,38%	0,41%
ino	2,234	0,015	1,0E-09	2,5E-06	y = 1,5017x + 1,4857	0,9921	16,98%	0,61%
guo	2,336	0,020	1,0E-10	1,0E-06	y = 1,4242x + 2,3310	0,9901	17,40%	1,11%
xao	3,212	0,010	1,0E-09	1,0E-06	y = 1,3904x + 2,2869	0,9915	16,63%	0,95%

*) y je log R, x je log c

Tabulka 8: Analytické parametry UHPLC-MS/MS metody pro stanovení purinů na sestavě Xevo.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

	retenční čas (min)	SD	LOD	LOQ	kalibrační rce*	R^2	přesnost (% RSD)	správnost (% bias)
ade	1,044	0,021	1,0E-09	1,0E-08	y = 1,2525x + 0,4029	0,9961	2,61%	1,49%
gua	1,174	0,007	1,0E-07	1,0E-06	y = 1,8522x - 1,3911	0,9911	3,02%	-2,97%
ura	1,384	0,032	2,5E-07	2,5E-06	y = 1,0348x - 0,8661	0,9900	4,07%	-2,63%
ado	1,539	0,013	1,0E-10	1,0E-09	y = 0,9247x + 2,1462	0,9962	2,72%	2,42%
uri	1,596	0,011	7,5E-07	1,0E-06	y = 1,0150x - 1,0577	0,9945	4,15%	-2,66%
hyp	1,670	0,008	1,0E-07	1,0E-06	y = 1,7261x - 1,2676	0,9978	3,01%	0,24%
xan	1,881	0,008	1,0E-09	1,0E-07	y = 1,0880x + 0,4138	0,9986	5,28%	0,29%
ino	2,270	0,039	1,0E-07	1,0E-06	y = 1,5416x - 2,0322	0,9796	4,45%	2,39%
guo	2,362	0,009	1,0E-07	5,0E-06	y = 1,8967x - 1,1668	0,9949	3,05%	-1,69%
xao	3,252	0,007	1,0E-09	1,0E-08	y = 0,9203x + 1,5254	0,9956	2,52%	-0,85%

* y je log R, x je log c

5.5. Optimalizace podmínek přípravy vzorku - SPE

Návratnost jednotlivých analytů při použití sorbentu C18 ve všech sbíraných frakcích je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9: Návratnost jednotlivých analytů ve všech sbíraných frakcích při SPE s použitím sorbentu C18.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin; pt = *flow through*; w1 = *wash1*; w2 = *wash2*; elu = *elution*

	ade	gua	ura	ado	uri	hyp	xan	ino	guo	xao
pt	0,12%	0,03%	2,68%	0,01%	0,10%	1,36%	0,01%	1,92%	1,87%	0,21%
w1	16,97%	17,27%	65,42%	97,41%	57,59%	32,14%	40,83%	38,06%	79,73%	42,83%
w2	1,94%	0,69%	2,38%	0,03%	0,46%	0,98%	0,76%	1,59%	5,29%	2,56%
elu	1,98%	0,73%	0,51%	0,02%	0,77%	0,91%	0,74%	1,37%	4,88%	2,63%

Návratnost jednotlivých analytů ve sbíraných frakcích při použití sorbentu Oasis HLB je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10: Návratnost jednotlivých analytů ve všech sbíraných frakcích při SPE s použitím sorbentu Oasis HLB.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin; pt = flow through; w1 = wash1; w2 = wash2; elu = elution

	ade	gua	ura	ado	uri	hyp	xan	ino	guo	xao
pt	-0,28%	0,03%	4,96%	0,28%	22,55%	0,32%	1,56%	0,04%	0,04%	0,02%
w1	4,54%	62,58%	30,08%	0,05%	29,55%	28,91%	67,63%	0,01%	11,08%	0,08%
w2	45,99%	6,79%	9,70%	15,44%	8,23%	11,72%	8,27%	20,34%	0,72%	0,17%
elu	5,06%	0,71%	6,81%	0,02%	3,02%	0,45%	2,08%	0,20%	0,12%	22,39%

Návratnost jednotlivých analytů ve sbíraných frakcích při použití sorbentu SCX je uvedeno v tabulce 11.

Tabulka 11: Návratnost jednotlivých analytů ve všech sbíraných frakcích při SPE s použitím sorbentu SCX.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin; pt = flow through; w1 = wash1; w2 = wash2; elu = elution

	ade	gua	ura	ado	uri	hyp	xan	ino	guo	xao
pt	0,10%	0,05%	37,53%	0,09%	103,28%	0,46%	1,20%	0,00%	0,04%	1,08%
w1	0,02%	0,01%	66,47%	0,10%	0,65%	0,58%	-0,83%	1,74%	0,02%	65,57%
w2	0,01%	0,01%	0,25%	0,09%	0,13%	0,37%	9,78%	13,14%	0,00%	34,41%
elu	10,62%	47,47%	0,01%	46,51%	0,24%	75,21%	104,03%	88,58%	106,88%	1,43%

Návratnost jednotlivých analytů ve sbíraných frakcích při použití sorbentu Oasis MCX je uvedeno v tabulce 12.

Tabulka 12: Návratnost jednotlivých analytů ve všech sbíraných frakcích při SPE s použitím sorbentu Oasis MCX.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin; pt = flow through; w1 = wash1; w2 = wash2; elu = elution

	ade	gua	ura	ado	uri	hyp	xan	ino	guo	xao
pt	0,03%	0,00%	9,63%	0,00%	1,37%	0,04%	-0,56%	0,19%	0,00%	0,52%
w1	0,04%	-0,02%	101,58%	0,00%	70,49%	6,89%	91,04%	45,42%	0,36%	102,63%
w2	0,01%	0,00%	-3,01%	0,00%	5,61%	76,14%	4,88%	36,16%	43,77%	4,56%
elu	113,13%	52,49%	1,75%	109,69%	2,89%	6,36%	3,53%	14,67%	45,99%	2,14%

Návratnost jednotlivých analytů při použití sorbentu PVPP je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13: Návratnost jednotlivých analytů při SPE s použitím sorbentu PVPP.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin

ade	gua	ura	ado	uri	hyp	xan	ino	guo	xao
1,78%	14,41%	6,05%	4,57%	29,76%	32,55%	108,10%	14,16%	8,51%	52,21%

Návratnost jednotlivých analytů ve sbíraných frakcích při použití sorbentu Oasis MAX je uvedeno v tabulce 14.

Tabulka 14: Návratnost jednotlivých analytů ve všech sbíraných frakcích při SPE s použitím sorbentu Oasis MAX.

ade = adenin; gua = guanin; ura = uracil; ado = adenosin; uri = uridin; hyp = hypoxanthin; xan = xanthin; ino = inosin; guo = guanosin; xao = xanthosin; pt = flow through; w1 = wash1; w2 = wash2; elu = elution

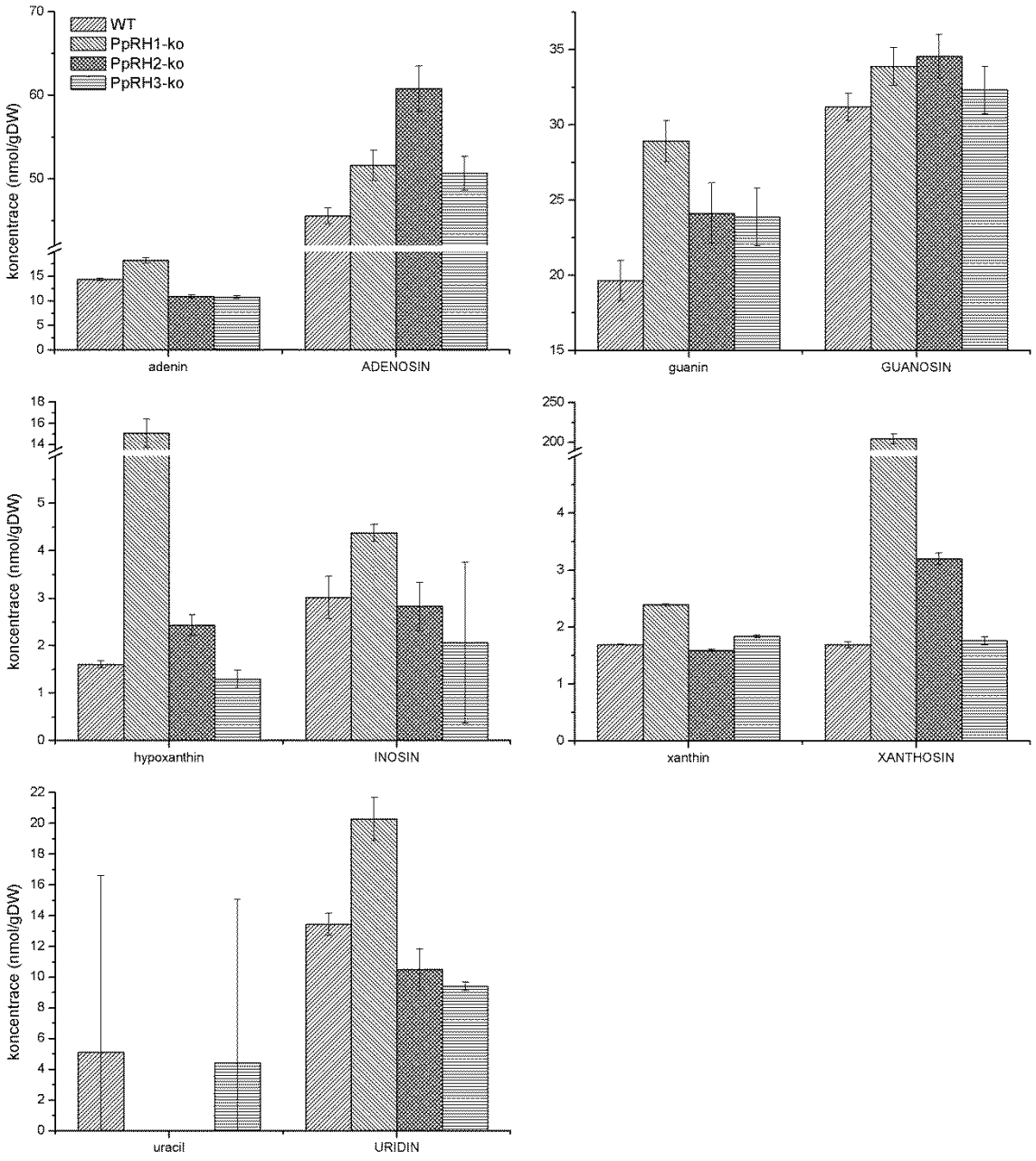
	ade	gua	ura	ado	uri	hyp	xan	ino	guo	xao
pt	0,29%	0,04%	0,29%	-0,11%	0,70%	-0,02%	0,09%	0,66%	0,91%	0,63%
w1	1,42%	0,03%	4,47%	2,08%	2,33%	-0,03%	-0,05%	0,83%	1,61%	0,33%
w2	2,57%	0,02%	3,88%	9,06%	8,59%	-0,02%	0,14%	5,61%	7,39%	8,93%
elu	95,70%	106,44%	90,69%	92,11%	86,78%	86,26%	108,41%	82,96%	91,38%	90,13%

5.6. Stanovení obsahu purinů a pyrimidinů v buňkách suspenzní kultury *Physcomitrella patens*

Stanovené koncentrace jednotlivých purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů ve WT a *single-ko*-mutantech PpNSHs suspenzní kultury *Physcomitrella patens* po 21-denní kultivaci jsou uvedeny v tabulce 15. Grafy srovnávající koncentrace jednotlivých analytů ve WT a mutantech nukleosidas jsou uvedeny v obr. 20.

Tabulka 15: Hladiny jednotlivých purinů a pyrimidinů ve WT a *single-ko*-mutantech nukleosidas *P. patens*. Hodnoty v nmol/g lyofilizátu suspenzní kultury.

	WT		PpNSH1-*ko*		PpNSH2-*ko*		PpNSH3-*ko*	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
uracil	5,115	11,486	< LOQ		< LOQ		4,405	10,642
uridin	13,431	0,713	20,280	1,397	10,484	1,335	9,408	0,275
adenin	14,332	0,262	18,214	0,529	10,881	0,309	10,742	0,266
adenosin	45,545	0,960	51,597	1,815	60,777	2,723	50,666	2,007
guanin	19,659	1,341	28,907	1,362	24,129	2,010	23,886	1,897
guanosin	31,190	0,917	33,886	1,268	34,555	1,473	32,319	1,577
hypoxanthin	1,606	0,073	15,065	1,347	2,429	0,219	1,294	0,189
inosin	3,013	0,445	4,371	0,179	2,825	0,512	2,062	1,694
xanthin	1,692	0,007	2,393	0,019	1,590	0,018	1,835	0,021
xanthosin	1,689	0,053	204,295	6,378	3,197	0,102	1,762	0,071



Obrázek 20: Grafické znázornění změn hladin jednotlivých analytů v *single*-ko-mutantech nukleosidas *P. patens* vůči WT.

6. DISKUSE

6.1. Vývoj CE metody

Pro separaci nukleových bází a nukleosidů, jakožto látek silně polárních a snadno ionizovatelných se přímo nabízí použití některé z technik kapilární elektroforézy. V minulosti již také bylo vypracováno několik elektroforetických metod stanovení bází, nukleosidů a zejména nukleotidů (viz kap. 3.1.).

Použitím techniky micelární elektrokinetické chromatografie se nám podařilo dosáhnout kompletní separace všech deseti látek v průběhu 15 min. Nevýhodou tohoto způsobu stanovení byla ale relativně malá citlivost (koncentrační limit stanovení 5 μM pro všech deset analytů) daná velmi malými objemy při nástřiku a použitou UV-detekcí. Podle Lambert-Beerova zákona je totiž absorbance dána součinem molárního absorpčního koeficientu dané látky, její koncentrace a délkou optické dráhy. Délka optické dráhy je ovšem při *on-line* UV-detekci v kapilární elektroforéze dána vnitřním průměrem použité kapiláry, tedy v našem případě pouze 75 μm.

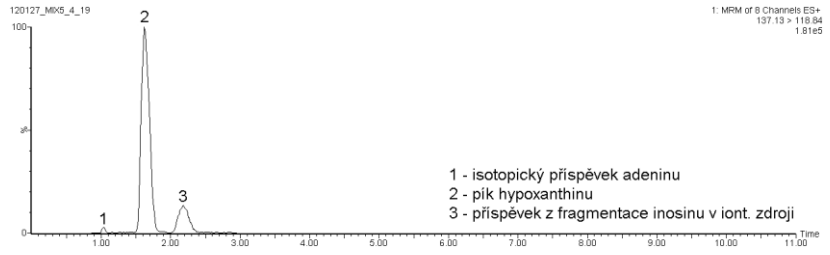
Přibližně o řád vyšší citlivosti by pravděpodobně bylo možné dosáhnout spojením kapilární elektroforézy s hmotnostním detektorem. Navíc by nebylo nutné rozseparovat dokonale všechny látky (viz kapitola 6.2.), čímž by došlo ke zkrácení analýzy. Toto spojení je ovšem relativně málo spolehlivé a obtížně realizovatelné, zejména při spojování systémů různých výrobců (T. Berés a O. Novák, osobní konzultace). Jedná se zejména o dva technické problémy – nutnost dokonalé izolace napětí vkládaného na výstupní konec kapiláry při elektroforéze (-20 kV) od napětí vkládaného na kapiláru v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru (+1 kV) a nutnost použití tzv. *sheath liquid* z důvodu nekompatibility objemu vytékajícího z kapiláry daným rychlostí EOF (řádově μl/min) s objemem potřebným pro efektivní sprejování při ESI ionizaci (řádově desítky až stovky μl/min). Dále by bylo nutné vyvinout CE-separaci s použitím jiného BGE, který by byl MS-kompatibilní, tedy bez borátu a sodných iontů. Předpokládáme, že by bylo možné použít pufr založený na (hydrogen)uhličitanu amonném, to by však vyžadovalo další optimalizaci. Proto jsme se rozhodli raději celé stanovení provádět na systému UHPLC-MS/MS.

6.2. Vývoj UHPLC-MS/MS metody

Pro chromatografickou separaci dusíkatých heterocyklů, mezi něž patří i puriny a pyrimidiny, na reversní fázi je stěžejní volba pH mobilní fáze, která ovlivňuje protonaci jednotlivých heterocyklických iminoskupin i dalších případných substituentů (aminoskupina,

hydroxyl) a tím celkový vnější náboj dané molekuly. Je-li tento nenulový, snižuje to podstatně retenci na reversní fázi a tím zhoršuje separaci.

Jednou z obecných výhod hmotnostní detekce je, že pro stanovení látek s různou molekulovou hmotností (resp. s různým poměrem m/z) není nutné tyto látky od sebe dokonale odseparovat. Separace je ovšem nutná v případech, kdy chceme stanovovat látky s velmi podobnou strukturou a tedy i blízkými (ne-li stejnými) molekulovými hmotnostmi. Během vývoje metody je tedy nutné dokonale chromatograficky odseparovat sloučeniny isobarické (se stejnou molekulovou hmotností) a také látky, které se ve své hmotě liší o jednotku. Látky isobarické by při nedokonalé separaci tvořily jediný pík, jehož plocha (resp. výška píku v hmotnostním spektru dané směsi) by byla dána sumou nastřikovaného množství obou látek. U látek lišících se ve své hmotě o jednotku jde zejména o izotopický příspěvek lehčí látky do plochy píku v kanálu látky těžší. K tomu se přidává ještě příspěvek způsobený nepřesností přístroje, zejména při rychlém „scanování“ různých m/z (tedy rychlém přepínání frekvencí střídavého napětí vkládaného na kvadrupoly hmotnostního spektrometru), kdy může docházet k příspěvku dalších látek do kanálu měřené látky. Dobrým příkladem může být v našem stanovení patrný pík adeninu (m/z = 136,11) v kanálu pro hypoxanthin (m/z = 137,13), který pro ilustraci uvádíme v obr. 21 (pík 1). Dále je nutné chromatograficky odseparovat látky, které poskytují fragment o stejném m/z (v našem případě nukleosid od příslušné báze), neboť by také docházelo k příspěvkům vlivem částečné fragmentace těžší látky již v iontovém zdroji. Pro názornost viz opět obr. 21 (pík 3).



Obrázek 21: Iontový chromatogram hypoxanthinu se znázorněním možných příspěvků k ploše píku hypoxanthinu, které je nutno odseparovat chromatograficky.

Z výše zmíněných důvodů byla pro vývoj metody klíčová dokonalá separace všech kritických párů a tedy i volba kolony a mobilní fáze. Kolona s prostou reversní fází ale neposkytovala dostatečnou retenci při pH mobilní fáze 4,7 ani 5,8, pravděpodobně jako důsledek vysoké polarity analytů. Proto jsme se rozhodli, podobně jako v metabolomické studii zabývající se stanovením dusíkatých metabolitů v bakteriální buňce (Lu et al., 2006), použít kolonu s polárními funkčními skupinami a mobilní fázi o nízkém pH. Takto jsme dosáhli separace všech kritických párů isokratickou elucí v průběhu 3,5 min.

V zájmu zvýšení životnosti kolony a prevence jejího zanášení balastními látkami v rostlinných extraktech jsme do LC-metody přidali krok promytí kolony mobilní fází s vyšší eluční silou (95% MeOH). Z důvodu tohoto promytí a následné reekvilibrace kolony na startovní podmínky se čas mezi dvěma po sobě jdoucími nástřiky prodloužil na 12 min. Doposud nejrychlejší publikovaná chromatografická metoda stanovení bází a nukleosidů má interval mezi nástřiky přibližně 15 min (Ito et al., 2000). Naše kolona má v tomto uspořádání životnost cca 520 nástřiků, což je u daného typu standardní (O. Novák, osobní sdělení).

Při použití detektoru Xevo se kvantifikační limity naší metody pro jednotlivé látky pohybovaly v rozmezí koncentrací $5 . 10^{-6} – 1 . 10^{-9}$ M (viz tabulka 8 v kapitole 5.4.), tedy srovnatelné nebo nižší, než ve dříve publikovaných metodách stanovení (Ito et al., 2000; Hartmann et al., 2006). Na detektoru QuattroMicro byly kvantifikační limity vyšší a stanovení bylo méně přesné, viz tab. 7. To je dáno stářím a celkovou konstrukcí přístroje (kratší hexapoly, méně citlivá dynoda, méně přesné zpracování iontového zdroje). Koncentrační rozsah stanovení byl pro jednotlivé látky v rozmezí až pěti řádů ($10^{-9} – 10^{-4}$ M). To je způsobeno zejména použitím interního standardu, který eliminuje chyby způsobené potlačováním ionizace při vyšších koncentracích analytů a přítomnosti biologické matrice, a dvojitě logaritmickým vynesením (log R proti log c, viz kapitola 4.6.4.) kalibrační závislosti. Přesnost naší metody je srovnatelná s metodami dříve publikovanými a její správnost je srovnatelná nebo lepší (Kaneko et al., 2009).

6.3. Stanovení purinů a pyrimidinů v *P. patens*

V charakterizaci rostlinných nukleosidas, enzymů řídících poměr mezi katabolismem a recyklací nukleosidů, byly první kroky učiněny teprve prací B. Junga a kolegů (2009, 2011), který se zabýval modelem Arabidopsis. Naše práce se zabývá kvantifikací purinů a pyrimidinů v rostlinných pletivech v návaznosti na práci H. Turčinov (2011), ve které byly *in vitro* charakterizovány a následně připraveny *ko*-mutanty všech tří nukleosidas z *P. patens*.

Nukleosidasy z *P. patens* (PpNSHs) byly již, co do biochemických vlastností, charakterizovány (Turčinov, 2011). Měření koncentrací bází a nukleosidů přímo v pletivech *P. patens* (a tím vlastně aktivity PpNSHs *in vivo*) v této práci ale vykazovalo veliké směrodatné odchylky – v rozmezí 6,9 – 54,3 % RSD (median 37,34 % RSD). Proto jsme ve spolupráci s prof. von Schwartzenbergem a H. Turčinov vytvořili přesnější metodu stanovení (median 4,17 % RSD).

Kromě toho bylo naše pracoviště požádáno o kvantifikaci cytokininů (Novák et al., 2008) v pletivech *P. patens* (WT a PpNSH-*ko*), aby se potvrdila či vyvrátila hypotéza, že PpNSHs mohou štěpit i cytokininové ribosidy a tím aktivovat cytokininovou signalizaci (Jung et al., 2009; Jung et al., 2011; Turčinov, 2011) podobně, jako to dělá LOG s cytokininovými

nukleotidy (Kurakawa et al., 2007). Tato měření však nejsou součástí této práce a jejich výsledky dosud nebyly publikovány. Ovlivnění metabolismu cytokininů aktivitou nukleosidas proto nadále zůstává otázkou.

Jak vyplývá z výsledků uvedených v kapitole 5.6., nukleosidasy se v *P. patens* skutečně podílejí na hydrolýze nukleosidů na ribosu a volné báze. Vzhledem k tomu, že největší celkový nárůst hladin nukleosidů byl pozorován v případě PpNSH1-*ko* mutanta, lze předpokládat, že tento enzym je hlavní provozní nukleosidasou *P. patens*. PpNSH1 pravděpodobně hydrolyzuje jak purinové, tak i pyrimidinové nukleosidy.

V případě uridinu se PpNSH1 zdá být hlavní nukleosidasou podílející se na jeho hydrolýze. Proti tomu však mluví relativně nízký (pouze přibližně 1,5-násobný) vzestup koncentrace uridinu. Je ovšem možné, že koncentrace uridinu zůstává relativně nízká, protože uridin je uridinkinasou (EC 2.7.1.48) efektivně recyklován zpět na UMP, který zpětnovazebně inhibuje *de novo* syntézu pyrimidinů (Kanamori et al., 1980). Po zastavení *de novo* syntézy rostlina své potřeby pyrimidinových nukleotidů kompletně pokrývá jejich recyklací a koncentrace uridinu v pletivu i po *knockoutu* PpNSH1 stoupá jen málo. Druhou možností je, že v PpNSH1-*ko* přebírá úlohu v hydrolýze uridinu PpNSH2 (u níž byla *in vitro* určena substrátová specifita pro uridin; Turčinov, 2011) nebo PpNSH3 (která je sekvenčně podobná PpNSH2 a předpokládá se proto podobná substrátová specifita; Turčinov, 2011).

Naproti tomu koncentrace xanthosinu po *knockoutu* PpNSH1 stoupá velmi výrazně, asi 120x. To může být způsobeno tím, že xanthosin je posledním meziproduktem katabolismu všech ostatních sledovaných purinů před hydrolýzou N-glykosidické vazby na ribosu, ale není zároveň produktem *de novo* syntézy purinů a nefunguje proto jako její zpětnovazebný inhibitor. *De novo* syntézu purinů inhibuje IMP (Stasolla et al., 2003), jeho defosforylací vzniklý inosin však může být dále oxidován na xanthosin, proto koncentrace inosinu po *knockoutu* PpNSH1 nemusí nutně vzrůstat natolik, aby došlo k vypnutí *de novo* syntézy purinů. Koncentrace ostatních nukleosidů v PpNSH1-*ko* stoupá jen mírně (adenosin a guanosin přibližně 1,1x, inosin přibližně 1,5x), pravděpodobně díky zmíněné konverzi na xanthosin.

Zvláštní je vysoký nárůst (přibližně 9,4-násobný) koncentrace hypoxanthinu po *knockoutu* PpNSH1. Po vyřazení nukleosidasy by totiž koncentrace volných bází měla zůstat zachována nebo by se měla mírně snížit v důsledku reakcí katabolismu (které se postupně zastaví nedostatkem substrátů). Zvýšená koncentrace hypoxanthinu by proto mohla indikovat snížení aktivity xanthindehydrogenasy (XDH, EC 1.17.1.4) v mutantu PpNSH1. Druhou reakcí, kterou XDH katalyzuje je oxidace xanthinu na kyselinu močovou, hladiny xanthinu jsou ale v PpNSH1 mutantu pouze 1,4x vyšší než ve WT. Je-li však PpNSH1 jediný (nebo alespoň

výrazně dominantní) enzym hydrolyzující xanthosin, nemusel by se pokles aktivity XDH projevit výrazným zvýšením koncentrace xanthinu.

V případě PpNSH2-*ko* došlo ke zvýšení koncentrací xanthosinu (1,9x), adenosinu (1,3x) a guanosinu (1,1x) v porovnání s WT, tento vzestup však nebyl příliš výrazný. V případě uridinu došlo naopak k poklesu (0,8x) vůči WT. To je v přímém rozporu s prací H. Turčinov (2011), kde se na základě sekvenční podobnosti PpNSH2 s AtNSH1 a *in vitro* experimentů s heterologně exprimovanou PpNSH2 uvádí, že tento enzym je specifický pro pyrimidiny. Je ovšem možné, že úlohu PpNSH2 při hydrolýze pyrimidinů přebírá *in vivo* PpNSH1. Ačkoliv je *in vitro* afinita PpNSH1 pro uridin nižší než PpNSH2 (K_m = 1,48 mM pro PpNSH1 vs. 1,02 mM pro PpNSH2), celková aktivita (poměr V_{max}/K_m) je u PpNSH1 vyšší (přibližně 1,34x). Proto je možné, že *in vivo* přebírá po *knockoutu* PpNSH2 její funkci PpNSH1 (která je v *P. patens* celkově nejaktivnější nukleosidasou) a ke zvyšování koncentrace uridinu v pletivu proto nedochází.

U PpNSH3 nejsou prozatím k dispozici žádné *in vitro* údaje o její substrátové specifitě, neboť tento protein se doposud nepodařilo heterologně exprimovat (Turčinov, 2011). Předpovězená sekvence je ze 76 % homologní s PpNSH2, proto se předpokládá, že se jedná taktéž o pro pyrimidin-specifickou nukleosidasu (Turčinov, 2011). Podle našich měření došlo v PpNSH3-*ko* mutantu pouze k mírnému zvýšení koncentrací adenosinu (1,1x) a nevýraznému vzestupu koncentrací guanosinu a xanthosinu, tedy stejných substrátů jako v případě PpNSH2, rozdíly vůči WT byly však ještě menší. Takto malé změny mohou znamenat, že PpNSH3 je jen velmi málo aktivní a koncentrace jednotlivých nukleosidů jsou udržovány na konstantní úrovni aktivitou PpNSH1, pro potvrzení či vyvrácení této hypotézy by bylo třeba vytvořit PpNSH1,3-*double-ko* mutanta. Další možností je, že PpNSH3 je exprimována pouze v některých pletivech nebo vývojových stadiích *P. patens* (např. sporofytu) a její aktivita se proto v suspenzní kultuře v dominantním stadiu gametofytu nevyskytuje (to by bylo možno ověřit např. fúzí s GFP a pozorováním jednotlivých vývojových stadií *P.patens*).

Na základě práce H. Turčinov (2011) a našich výsledků je zřejmé, že v *P. patens* je nejdůležitější nukleosidasou PpNSH1, která je schopna hydrolyzovat N-glykosidické vazby jak purinových, tak i pyrimidinových nukleosidů a pokrýt tak, současně se zvýšeným podílem recyklace nukleosidů, fyziologické potřeby rostliny. Nukleosidasy 2 a 3 mohou mít své specifické funkce pouze v některých částech nebo obdobích vývoje rostliny. To by bylo vhodné potvrdit pokusy s dvojitě či případně trojitě *knockoutovanými* mutanty. Další možností je zapojení PpNSH2 a 3 v metabolismu deoxynukleosidů, jejichž stanovení jsme v této práci neprováděli. Do budoucna je proto naším cílem metodu stanovení o tyto deriváty rozšířit.

7. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na vývoj analytického nástroje pro studium metabolismu purinových a pyrimidinových nukleosidů v rostlinných pletivech. Pokoušeli jsme se vyvinout dostatečně specifickou a citlivou metodu pro stanovení adeninu, guaninu, hypoxanthinu, xanthinu, uracilu a jejich nukleosidů. Tuto metodu jsme následně použili ke kvantifikaci purinů a pyrimidinů v buňkách suspenzní kultury *P. patens* jednak WT, jednak ve třech mutantech s *knockoutovanými* geny pro syntézu nukleosidas.

Podařilo se nám vyvinout a validovat dvě různé instrumentální metody stanovení deseti purinových a pyrimidinových derivátů (nukleosidů a volných bází) v rostlinných pletivech. Metoda založená na micelární elektrokinetické chromatografii s UV detekcí má vyšší separační účinnost, je však kvůli zvolenému způsobu detekce málo citlivá. Naproti tomu metoda založená na UHPLC na koloně s polárními modifikacemi má sice nižší (ale postačující) separační účinnost, nicméně je výrazně citlivější a díky použití izotopově značeného interního standardu je lineární v širším rozsahu koncentrací. Příprava vzorku je založena na extrakci na pevné fázi s použitím směsného anexu s návratnostmi v rozmezí 82 – 108 %.

Kvantifikací purinových a pyrimidinových nukleosidů ve WT a mutantech *P. patens* jsme dospěli k závěru, že:

- biologicky nejaktivnějším isoenzymem je v *P. patens* nukleosidasa 1, která je schopna hydrolyzovat jak purinové, tak i pyrimidinové nukleosidy
- nukleosidasy 2 a 3 jsou naproti tomu výrazně méně aktivní, na rozdíl od *in vitro* experimentů (Turčinov, 2011) jsme nepozorovali po jejich *knockoutu* zvýšení hladin uridinu
- nukleosidasy se ve svých funkcích mohou (alespoň částečně) zastupovat, pro důkladnější popis jejich úlohy *in vivo* bude nutné vytvořit *double-ko* mutanty a zároveň rozšířit metodu na stanovení bází a nukleosidů o další deriváty.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

10F-THF	10-formyl-tetrahydrofolát
ABA	kyselina abscisová
ade	adenin
ado	adenosin
AF	mravenčan amonný (*ammonium formate*)
AIR	5-aminoimidazol-ribonukleotid
AMP	adenosinmonofosfát
APT	adenin-fosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.7), enzym recyklace purinů katalyzující kondenzaci adeninu s PRPP za vzniku AMP
ATCasa	aspartáttrankarbamoylasa (EC 2.1.3.2), enzym *de novo* syntézy pyrimidinů katalyzující vznik karbamoylaspartátu z karbamoylfosfátu a aspartátu
AtNSH	nukleosidasa (EC 3.2.2.x) z *Arabidopsis thaliana*, enzym hydrolyzující nukleosidy na volnou bázi a ribosu
BGE	nosný elektrolyt (*background elektrolyte*)
CE	kapilární elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok (*electroosmotic flow*)
elu	frakce eluce při SPE
EtOH	ethanol
FA	kyselina mravenčí (*formic acid*)
FGAR	formylglycinamid-ribonukleotid
GAR	glycinamidoribonukleotid
GMP	guanosinmonofosfát
gua	guanin
guo	guanosin
hyp	hypoxanthin
IMP	inosinmonofosfát

ino	inosin
iPR	isopentenyladenosin
LOG	cytokinin-specifická fosforibohydrolasa, enzym katalyzující hydrolýzu cytokininových nukleotidů na volnou bázi a ribosa-5-fosfát (*lonely guy*)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*)
NH_4Ac	octan amonný
PpNSH	nukleosidasa (EC 3.2.2.x) z *Physcomitrella patens*, enzym hydrolyzující nukleosidy na volnou bázi a ribosu
PRA	fosforibosylamin
PRPP	5-fosforibosyl-1-difosfát
pt	*flow through* frakce při SPE
SAICAR	N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid
SPE	extrakce na pevné fázi (*solid-phase exaction*)
TCA	kyselina trichloroctová
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie (*ultra-high performance liquid chromatography*)
UMP	uridinmonofosfát
ura	uracil
uri	uridin
w1	*wash1* frakce, první promytí při SPE
w2	*wash2* frakce, druhé promytí při SPE
WT	„*wild type*“, divoký typ – organismus, jehož genom nebyl laboratorně modifikován, je tedy stejný, jako se vyskytuje v přírodě
xan	xanthin
xao	xanthosin

XDH	xanthindehydrogenasa (EC 1.17.1.4), enzym katabolismu purinů katalyzující dvě následné dehydrogenační reakce hyp –› xan a xan –› kyselina močová
XMP	xanthosinmonofosfát

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adam, T., Friedecký, D., Fairbanks, L.D., Ševčík, J., Barták, P. (1999) Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin. Chem.* **45**, 2086-2093.

Adam, T., Lochman, P., Friedecký, D. (2002) Screening method for inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism by capillary electrophoresis with reversed electroosmotic flow. *J. Chromatogr. B* **767**, 333-340.

Adams, W.S., Nakatani, M. (1968) Filter paper electrophoresis of purines and pyrimidines - mobility data. *Journal of Chromatography* **37**, 343-&.

Allen, M., Qin, W.S., Moreau, F., Moffatt, B. (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of Arabidopsis and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiol. Plant.* **115**, 56-68.

Ashihara, H., Crozier, A. (1999) Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Adv.Bot.Res.* **30**, 117-205.

Ashihara, H., Stasolla, C., Loukanina, N., Thorpe, T.A. (2000) Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: Metabolic fate of C-14-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol. Plant.* **108**, 25-33.

Ashihara, H., Takasawa, Y., Suzuki, T. (1997) Metabolic fate of guanosine in higher plants. *Physiol. Plant.* **100**, 909-916.

Astot, C., Dolezal, K., Nordstrom, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.H., Sandberg, G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14778-14783.

Atkins, C.A., Smith, P.M.C., Storer, P.J. (1997) Reexamination of the intracellular localization of *de novo* purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiol.* **113**, 127-135.

Brown, P.R., Grushka, E. (1980) Structure-retention relations in the reversed-phase high-performance liquid-chromatography of purine and pyrimidine compounds. *Anal. Chem.* **52**, 1210-1215.

Bruchelt, G., Niethammer, D., Schmidt, K.H. (1993) Isotachophoresis of nucleic-acid constituents. *J. Chromatogr.-Biomed. Appl.* **618**, 57-77.

Buchanan, J.M., Hartman, S.C. (1959) Enzymic reactions in the synthesis of the purines. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* **21**, 199-261.

Campos, A., Rijo-Johansen, M.J., Carneiro, M.F., Fevereiro, P. (2005) Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from Coffea arabica young leaves. *Phytochemistry* **66**, 147-151.

Cao, Y.J., Schubert, K.R. (2001) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding soybean nodule IMP dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* **1520**, 242-246.

Cohn, W.E. (1949) The separation of purine and pyrimidine bases and of nucleosides by ion exchange. *Science* **109**, 377-378.

Degano, M., Gopaul, D.N., Scapin, G., Schramm, V.L., Sacchettini, J.C. (1996) Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase from Crithidia fasciculata. *Biochemistry* **35**, 5971-5981.

Deng, W.W., Ashihara, H. (2010) Profiles of Purine Metabolism in Leaves and Roots of Camellia sinensis Seedlings. *Plant Cell Physiol.* **51**, 2105-2118.

Doremus, H.D. (1986) Organization of the pathway of denovo pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea (*Pisum sativum*-L cv Progress No-9) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 112-119.

Doremus, H.D., Jagendorf, A.T. (1985) Subcellular-localization of the pathway of denovo pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea leaves. *Plant Physiol.* **79**, 856-861.

Drach, J.C., Novack, J.M. (1973) Some simple thin-layer chromatographic systems for separation of purines and purine nucleosides. *Anal. Biochem.* **52**, 633-636.

Fan, H., Yang, E.Q., Li, S.P. (2007) Determination of purine and pyrimidine bases in natural and cultured Cordyceps using optimum acid hydrolysis followed by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 141-144.

Fiore, C., Trezeguet, V., Le Saux, A., Roux, P., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Noel, F., Lauquin, G.J.M., Brandolin, G., Vignais, P.V. (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: Structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* **80**, 137-150.

Geldart, S.E., Brown, P.R. (1999) Separation of purine and pyrimidine bases by capillary zone electrophoresis with carbonate buffers. *J. Chromatogr. A* **831**, 123-129.

Giermann, N., Schroder, M., Ritter, T., Zrenner, R. (2002) Molecular analysis of *de novo* pyrimidine synthesis in solanaceous species. *Plant Mol.Biol.* **50**, 393-403.

Gross, M., Gathof, B.S., Kolle, P., Gresser, U. (1995) Capillary electrophoresis for screening of adenylosuccinate lyase deficiency. *Electrophoresis* **16**, 1927-1929.

Hanks, J.F., Tolbert, N.E., Schubert, K.R. (1981) Localization of enzymes of ureide bisynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiol.* **68**, 65-69.

Hanson, A.D., Gregory, J.F. (2002) Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 244-249.

Hartmann, S., Okun, J.G., Schmidt, C., Langhans, C.D., Garbade, S.F., Burgard, P., Haas, D., Sass, J.O., Nyhan, W.L., Hoffmann, G.F. (2006) Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* **52**, 1127-1137.

Haunschmidt, M., Buchberger, W., Klampfl, C.W. (2008) Investigations on the migration behaviour of purines and pyrimidines in capillary electromigration techniques with UV detection and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1213**, 88-92.

Hemström, P., Irgum, K. (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **29**, 1784-1821.

Herz, S., Eberhardt, S., Bacher, A. (2000) Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of Arabidopsis thaliana specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* **53**, 723-731.

Hesberg, C., Hansch, R., Mendel, R.R., Bittner, F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from Arabidopsis thaliana - Differential gene expression and enzyme activities. *J. Biol. Chem.* **279**, 13547-13554.

Horvath, C., Lipsky, S.R. (1969) Rapid analysis of ribonucleosides and bases at picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. *Anal. Chem.* **41**, 1227-&.

Horvath, C.G., Preiss, B.A., Lipsky, S.R. (1967) Fast liquid chromatography - An investigation of operating parameters and separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal. Chem.* **39**, 1422-&.

Hotchkiss, R.D. (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* **175**, 315-332.

Hung, W.F., Chen, L.J., Boldt, R., Sun, C.W., Li, H.M. (2004) Characterization of Arabidopsis glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase-deficient mutants. *Plant Physiol.* **135**, 1314-1323.

Chen, C.M., Kristopeit, S.M. (1981) Metabolism of cytokinin - deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat-germ cells. *Plant Physiol.* **68**, 1020-1023.

Chen, G., Chu, Q.C., Zhang, L.Y., Ye, J.N. (2002) Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* **457**, 225-233.

Ito, T., van Kuilenburg, A.B.P., Bootsma, A.H., Haasnoot, A.J., van Cruchten, A., Wada, Y., van Gennip, A.H. (2000) Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin. Chem.* **46**, 445-452.

Iwahana, H., Fujimura, M., Ii, S., Kondo, M., Moritani, M., Takahashi, Y., Yamaoka, T., Yoshimoto, K., Itakura, M. (1996) Molecular cloning of a human cDNA encoding a trifunctional enzyme of carbamoyl-phosphate synthetase-aspartate transcarbamoylase-dihydroorotase in *de novo* pyrimidine synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 249-255.

Jung, B., Florchinger, M., Kunz, H.H., Traub, M., Wartenberg, R., Jeblick, W., Neuhaus, H.E., Mohlmann, T. (2009) Uridine-Ribohydrolase Is a Key Regulator in the Uridine Degradation Pathway of Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 876-891.

Jung, B., Hoffmann, C., Mohlmann, T. (2011) Arabidopsis nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *Plant J.* **65**, 703-711.

Kafer, C., Zhou, L., Santoso, D., Guirgis, A., Weers, B., Park, S., Thornburg, R. (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience* **9**, 1611-1625.

Kanamori, I., Ashihara, H., Komamine, A. (1980) Subcellular distribution and activity of enzymes involved in uridine-5'-monophosphate synthesis in *Vinca-rosea* cells. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **96**, 7-16.

Kaneko, K., Yamanobe, T., Fujimori, S. (2009) Determination of purine contents of alcoholic beverages using high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **23**, 858-864.

Katahira, R., Ashihara, H. (2002) Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (Solanum tuberosum L.) tubers. *Planta* **215**, 821-828.

Katayama, M., Matsuda, Y., Shimokawa, K., Tanabe, S., Kaneko, S., Hara, I., Sato, H. (2001) Simultaneous determination of six adenyl purines in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography B* **760**, 159-163.

Klampfl, C.W., Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klein, H. (2002) Determination of purines and pyrimidines in beer samples by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* **454**, 185-191.

Koyama, Y., Tomoda, Y., Kato, M., Ashihara, H. (2003) Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming Theobroma cacao leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 977-984.

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

Leroch, M., Kirchberger, S., Haferkamp, I., Wahl, M., Neuhaus, H.E., Tjaden, J. (2005) Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from Solanum tuberosum. *J. Biol. Chem.* **280**, 17992-18000.

Lin, H., Xu, D.K., Chen, H.Y. (1997) Simultaneous determination of purine bases, ribonucleosides and ribonucleotides by capillary electrophoresis electrochemistry with a copper electrode. *J. Chromatogr. A* **760**, 227-233.

Lu, W.Y., Kimball, E., Rabinowitz, J.D. (2006) A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 37-50.

Moffatt, B.A., Stevens, Y.Y., Allen, M.S., Snider, J.D., Pereira, L.A., Todorova, M.I., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Martin-McCaffrey, L., Wagner, C. (2002) Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.* **128**, 812-821.

Moffatt, B.A., Wang, L., Allen, M.S., Stevens, Y.Y., Qin, W.S., Snider, J., von Schwartzenberg, K. (2000) Adenosine kinase of arabidopsis. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol.* **124**, 1775-1785.

Monser, L. (2004) Liquid chromatographic determination of four purine bases using porous graphitic carbon column. *Chromatographia* **59**, 455-459.

Mora, L., Hernandez-Cazares, A.S., Aristoy, M.C., Toldra, F. (2010) Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites. *Food Chem.* **123**, 1282-1288.

Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., Strnad, M. (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.

O'Neal, T.D., Naylor, A.W. (1976) Some regulatory properties of pea leaf carbamoyl phosphate synthetase. *Plant Physiol.* **57**, 23-28.

Ong, B.L., Jackson, J.F. (1972) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Phaseolus-aureus* - enzymic aspects of control of carbamoyl phosphate synthesis and utilization. *Biochem. J.* **129**, 583-&.

Prezelj, M., Neubauer, D., Derganc, M. (2000) Measurement of purines in urine by capillary electrophoresis for estimating the degree of hypoxia in infants. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38**, 623-628.

Raghothama, K.G. (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **50**, 665-693.

Rebora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., Daignan-Fornier, B. (2001) Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7901-7912.

Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W., Neuhaus, H.E. (2004) Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**, 3524-3536.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L.X., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., Boore, J.L. (2008) The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64-69.

Riegler, H., Geserick, C., Zrenner, R. (2011) Arabidopsis thaliana nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. *New Phytol.* **191**, 349-359.

Riewe, D., Grosman, L., Fernie, A.R., Zauber, H., Wucke, C., Geigenberger, P. (2008) A Cell Wall-Bound Adenosine Nucleosidase is Involved in the Salvage of Extracellular ATP in Solanum tuberosum. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1572-1579.

Safranow, K., Machoy, Z. (2005) Simultaneous determination of 16 purine derivatives in urinary calculi by gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B* **819**, 229-235.

Senecoff, J.F., McKinney, E.C., Meagher, R.B. (1996) *De novo* purine synthesis in Arabidopsis thaliana .2. The PUR7 gene encoding 5'-phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiol.* **112**, 905-917.

Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U. (2005) A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genet.* **37**, 501-506.

Schoor, S., Moffatt, B.A. (2004) Applying high throughput techniques in the study of adenosine kinase in plant metabolism and development. *Frontiers in Bioscience* **9**, 1771-1781.

Smith, P.M.C., Atkins, C.A. (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* **128**, 793-802.

Smith, P.M.C., Mann, A.J., Goggin, D.E., Atkins, C.A. (1998) AIR synthetase in cowpea nodules: a single gene product targeted to two organelles? *Plant Mol.Biol.* **36**, 811-820.

Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T.A., Ashihara, H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* **160**, 1271-1295.

Stasolla, C., Thorpe, T.A. (2004) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and degradation during *in vitro* morphogenesis of white spruce (Picea glauca). *Frontiers in Bioscience* **9**, 1506-1519.

Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R., Heldt, H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant-leaves. *Method Enzymol.* **174**, 518-552.

Taya, Y., Tanaka, Y., Nishimura, S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in Dictyostelium-discoideum. *Nature* **271**, 545-547.

Turčinov, H., 2011. Identifizierung und charakterisierung der Ribohydrolase-(RH)-Familie aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. und ihr funktionelle *knockout*. Department Biologie der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Universität Hamburg, Hamburg.

van der Graaff, E., Hooykaas, P., Lein, W., Lerchl, J., Kunze, G., Sonnewald, U., Boldt, R. (2004) Molecular analysis of "*de novo*" purine biosynthesis in solanaceous species and in Arabidopsis thaliana. *Front. Biosci.* **9**, 1803-1816.

van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I., Kunze, R. (2006) Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* **141**, 776-792.

Vauclare, P., Kopřiva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krahenbuhl, U., den Camp, R.O., Brunold, C. (2002) Flux control of sulphate assimilation in Arabidopsis thaliana: adenosine 5 '-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J.* **31**, 729-740.

Versees, W., Decanniere, K., Pelle, R., Depoorter, J., Brosens, E., Parkin, D.W., Steyaert, J. (2001) Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from Trypanosoma vivax. *J. Mol. Biol.* **307**, 1363-1379.

Versees, W., Steyaert, J. (2003) Catalysis by nucleoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 731-738.

Wagner, K.G., Backer, A.I. (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int.Rev.Cytol.* **134**, 1-84.

Walther, R., Wald, K., Glund, K., Tewes, A. (1984) Evidence that a single polypeptide catalyzes the 2 step conversion of orotate to UMP in cells from a tomato suspension-culture. *J. Plant Physiol.* **116**, 301-311.

Wang, T.L., Cove, D.J., Beutelmann, P., Hartmann, E. (1980) Isopentenyladenine from mutants of the moss, *Physcomitrella-patens*. *Phytochemistry* **19**, 1103-1105.

Yang, J.M., Han, K.H. (2004) Functional characterization of allantoinase genes from Arabidopsis and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiol.* **134**, 1037-1049.

Yesbergenova, Z., Yang, G.H., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R., Sagi, M. (2005) The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant J.* **42**, 862-876.

Zalkin, H., Dixon, J.E. (1992) De-novo purine nucleotide biosynthesis. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **42**, 259-287.

Zarepour, M., Kaspari, K., Stagge, S., Rethmeier, R., Mendel, R.R., Bittner, F. (2010) Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from Arabidopsis thaliana is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Mol.Biol.* **72**, 301-310.

Zrenner, R., Riegler, H., Marquard, C.R., Lange, P.R., Geserick, C., Bartosz, C.E., Chen, C.T., Slocum, R.D. (2009) A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in Arabidopsis. *New Phytol.* **183**, 117-132.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *In: Ed (Ed.)^(Eds.)*, Annual Review of Plant Biology. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 805-836.