

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**LABORATOŘ RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ**

**CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ  
VÝZKUM**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Analýza cytokininových nukleotidů kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí.**

<b>Autor:</b>	<b>Jan Buček</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>Mgr. Tibor Béres, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	duben 2013

### Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jan Buček
Název práce	Analýza cytokininových nukleotidů kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Cytokiny jsou přirozeně se vyskytující skupina rostlinných hormonů. Z chemického hlediska jde o N<sup>6</sup> substituované deriváty adeninu, přičemž v poloze N<sup>6</sup> se nachází isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec. V rostlinném organismu plní cytokiny funkci regulátorů buněčného cyklu a podílejí se na významných vývojových procesech. Jejich koncentrace se pohybuje v rozmezí fmol-pmol/g čerstvé rostlinné hmoty. Biologická aktivita fytohormonů je úzce spjata s jejich chemickou strukturou.</p> <p>Jedna z metod kapilární elektroforézy (CE) - micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) – ve spojení s detekcí na základě laserem indukované fluorescence se jeví jako vhodná metoda pro separaci <i>cis/trans</i> izomerů fluorescenčně značených nukleotidů zeatinu a stanovení jejich poměru ve vzorku.</p>
Klíčová slova	cytokinin, zeatin, CE-LIF, MEKC, BODIPY FL EDA, LC-MS
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jan Buček
Title of thesis	Analysis of cytokinin nucleotides by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators, Center of the region Haná for biotechnological and agricultural research
Supervisor	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>Cytokinins are a group of naturally occurring plant hormones. From a chemical point of view cytokinins are N<sup>6</sup> substituted derivatives of adenine with isoprenoid or aromatic side chain in N<sup>6</sup> position. In plants cytokinins fulfil the function as a cell cycle and important developmental processes regulators. Their concentration varies between fmol-pmol/g of a fresh weight. The biological activity of phytohormones is closely related to their chemical structure.</p> <p>One of the methods of capillary electrophoresis (CE) – micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) – with detection based on laser induced fluorescence appears to be suitable for separation of <i>cis/trans</i> fluorescence labeled zeatin nucleotide isomers and determination of their ratio in the sample.</p>
Key words	cytokinin, zeatin, CE-LIF, MEKC, BODIPY FL EDA, LC-MS
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne 17.4.2013

.....

Vlastnoruční podpis

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a podávání cenných informací. V neposlední řadě děkuji také doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Ginterové z katedry analytické chemie za možnost měření v laboratoři a své rodině za podporu.

# OBSAH

<b>Cíle práce</b> .....	7
<b>1. Teoretická část</b> .....	8
1.1 Úvod .....	9
1.2 Rostlinné hormony (fytohormony) .....	9
1.2.1 Cytokininy .....	10
1.2.1.1 Struktura cytokininů .....	10
1.2.1.2 Biosyntéza cytokininů .....	12
1.2.1.3 Metabolismus cytokininů .....	14
1.2.1.4 Cytokininové nukleotidy a metody jejich analýzy .....	16
1.3 Elektromigrační metody .....	17
1.3.1 Elektroforéza v plošném uspořádání .....	18
1.3.2 Kapilární elektroforéza (CE) .....	19
1.3.2.1 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) .....	22
1.3.2.2 Způsoby detekce v CE .....	23
1.3.2.3 CE v analýze fytohormonů .....	24
1.3.2.3.1 CE-LIF v analýze fytohormonů .....	25
1.3.2.4 CE v analýze nukleotidů .....	25
1.3.2.4.1 CE-LIF v analýze nukleotidů .....	26
1.4 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) .....	27
<b>2. Experimentální část</b> .....	28
2.1 Materiál a metody .....	29
2.1.1 Chemikálie .....	29
2.1.2 Přístrojové vybavení .....	29
2.1.3 Příprava standardů pro CE-LIF analýzu .....	31
2.1.3.1 Derivatizace pomocí BODIPY FL EDA .....	31
2.1.3.2 Purifikace vzorků .....	31
2.1.4 Identifikace standardů pomocí LC-MS .....	32
2.1.5 Separace standardů pomocí CE-LIF .....	33
2.2 Výsledky a diskuze .....	34
2.3 Závěr .....	41
<b>Seznam zkratk</b> .....	42
<b>Seznam použité literatury</b> .....	45

## **CÍLE PRÁCE**

1. Vypracování literární rešerše na téma cytokininy, jejich biosyntéza. Cytokininové nukleotidy.
2. Vypracování literární rešerše na téma kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí a její využití v analýze nukleotidů.
3. Vývoj metody na separaci fluorescenčně značených zeatinových cytokininových nukleotidů s využitím kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí.

# **1. Teoretická část**



## 1.1 Úvod

Rostlinné hormony jsou skupinou přirozeně se vyskytujících látek, která v mnoha směrech ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Pochopení jejich biosyntézy, metabolismu a funkce v rostlinném organismu přináší zefektivnění postupů při pěstování zemědělských plodin (J. Pulkrábek 1988). Využití fytohormonů může zdaleka přesahovat pole rostlinné fyziologie. Jejich aplikace je slibná především na poli biomedicíny. Výraznými protinádorovými účinky se vyznačují cytokininy (Y. Ishii *et al.* 2002) a kyselina jasmonová (E. Flescher *et al.* 2002).

## 1.2 Rostlinné hormony (fytohormony)

Fytohormony hrají klíčovou roli ve vývoji jednotlivých rostlinných orgánů. Jako jeden z prvních byl popsán účinek ethylenu na zrání ovocných plodů (S.P. Burg *et al.* 1965). Rostlinné hormony ovlivňují fyziologické procesy rostlin za velmi nízkých koncentrací. Na rozdíl od savčích hormonů jsou fytohormony mnohem univerzálnější, co se efektu týče, a jejich účinek je primárně závislý na koncentraci. Prvním identifikovaným rostlinným hormonem byl auxin. Fytohormony nacházejí své místo účinku často ve velkých vzdálenostech od místa syntézy. Například cytokininy syntetizované v kořeni rostliny mohou ovlivňovat metabolickou aktivitu a senescenci listů. Naopak ethylen může ovlivňovat stejné pletivo či buňku, ve které byl syntetizován. Do skupiny rostlinných hormonů řadíme auxiny, gibbereliny, cytokininy, ethylen, kyselinu abscisovou, brasinosteroidy, polyaminy, jasmonáty a kyselinu salicylovou (P.J. Davies 2010).

## 1.2.1 Cytokininy

Adeninové deriváty označované jako cytokininy jsou skupinou rostlinných hormonů charakteristické svou schopností navodit dělení buňky v rostlinných kulturách za přítomnosti auxinů. Nejhojnějším cytokininem je zeatin. Cytokininy jsou syntetizovány v kořenové špičce, odkud jsou xylémem transportovány do vrcholových částí rostliny. Mezi hlavní fyziologické účinky této skupiny fytohormonů patří oddálení senescence, navození buněčného dělení, regenerace orgánů, stimulace rezistence vůči stresovým faktorům a v neposlední řadě mohou vyvolat růst adventivních pupenů a jejich proliferaci (P.J. Davies 2010).

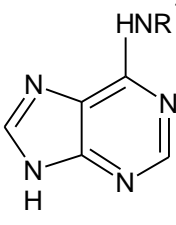
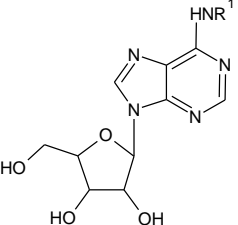
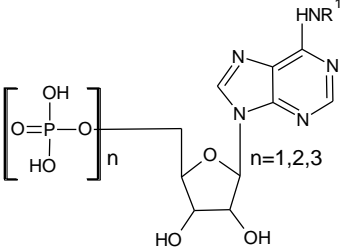
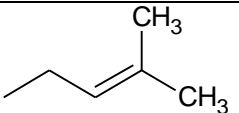
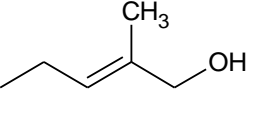
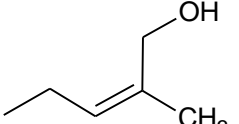
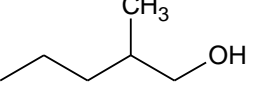
Jako první cytokinin byl v roce 1955 izolován kinetin (6-furfurylaminopurin). Folke Skoog jej izoloval z autoklavované DNA ze sledího spermatu (C.O. Miller *et al.* 1955). Ve stejném roce Ross H. Hall a R. S. De Ropp zjistili, že kinetin je produktem degradace DNA (De Ropp *et al.* 1955). Skoog ve svém experimentu navazoval na výzkum Johanese van Overbeeka. Ten v roce 1941 objevil v endospermu kokosových ořechů látku s fyziologickými účinky. První přirozeně se vyskytující cytokinin, zeatin, byl izolován z kukuřice v roce 1961 Carlosem O. Millerem (C.O. Miller 1961).

### 1.2.1.1 Struktura cytokininů

Cytokininy jsou deriváty adeninu, nesoucí na exocyklické aminoskupině N<sup>6</sup> isoprenoidní nebo aromatický řetězec. Mohou být děleny do tří základních skupin: aktivní formy (volné báze), transportní formy (ribosidy) a zásobní formy (nukleotidy) (Tab. 1). Ribosidy vykazují mnohem menší aktivitu než volné báze cytokininů, není však jasné, zda mají svou vlastní specifickou funkci v rostlinném organismu či nikoliv (H. Sakakibara 2010).

**Tab. 1:** Vzorce, zkratky a názvy vybraných cytokininů a jejich forem

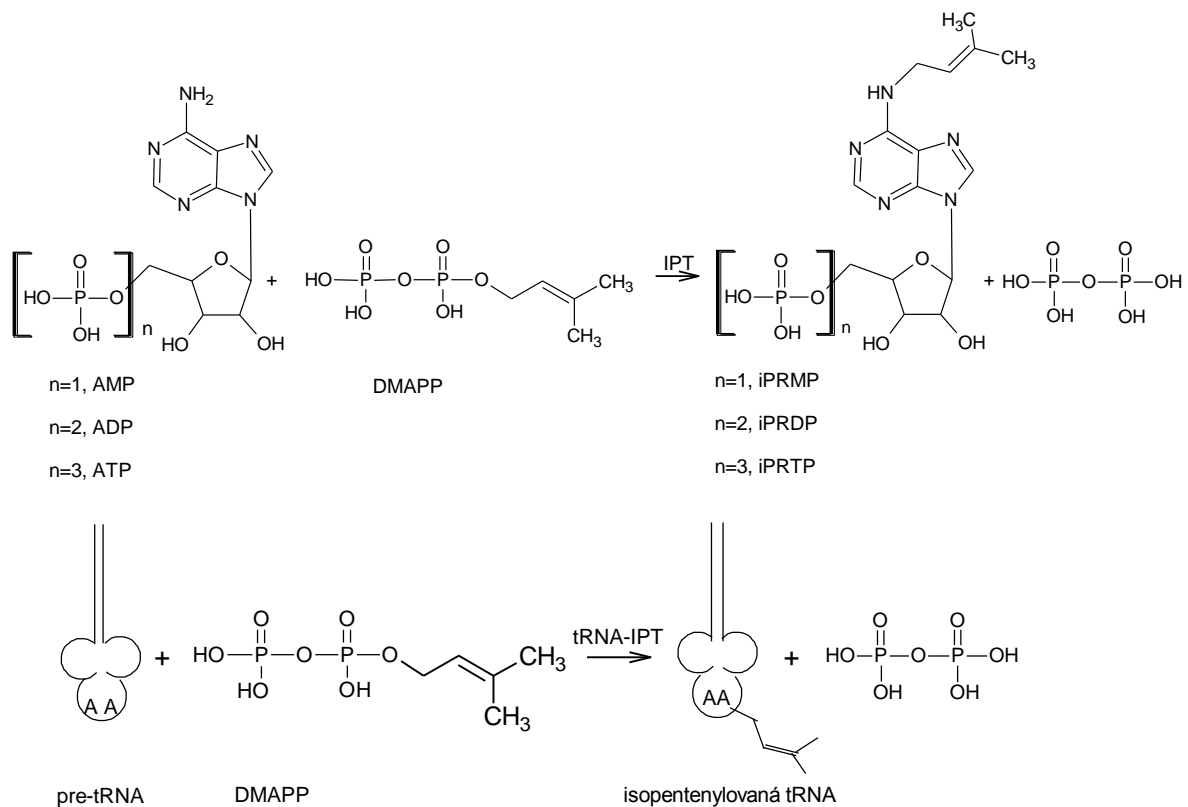
(převzato z: Peter J. Davies (2010) *Plant Hormones – Biosynthesis, Signal transduction, Action!* Springer, New York, USA).

			
R <sup>1</sup>	Báze	Nukleosid	Nukleotid
	isopentenyladenin (iP)	isopentenyladenin ribosid (iPR)	isopentenyladenin ribosid-5'-(mono,di, tri) fosfát (iPRMP, iPRDP, iPRTP)
	<i>trans</i> -zeatin (tZ)	<i>trans</i> -zeatin ribosid (tZR)	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-(mono,di, tri) fosfát (tZRMP, tZRDP, tZRTP)
	<i>cis</i> -zeatin (cZ)	<i>cis</i> -zeatin ribosid (cZR)	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát (cZRMP, cZRDP, cZRTP)
	Dihydrozeatin (DZ)	dihydrozeatin ribosid (DZR)	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát (DZRMP)

### 1.2.1.2 Biosyntéza cytokininů

V dnešní době jsou známy dvě biosyntetické dráhy pro syntézu isoprenoidních cytokininů. Jedna z nich je založena na degradaci tRNA, druhá funguje na principu isopentenylace volného adeninového nukleotidu (Obr 1.). Poprvé byly substráty pro obě biosyntetické dráhy popsány u hlenky *Dictyostelium discoideum* K.B. Raper, 1935, která se velmi často používá jako modelový organismus v molekulární biologii, chemii a fyzice (Taya Y. *et al.* 1978). Tato studie ukazuje, že dimethylallyldifosfát (DMAPP) a AMP jsou výchozími substráty pro syntézu isopentenyladeninu (iP) a jeho ribosidu (iPR). Primárním produktem této dráhy je iPRMP. Celá reakce je katalyzována enzymem isopentenyltransferázou (IPT). V genomu *Arabidopsis thaliana* C. Linnaeus, 1753 bylo nalezeno celkem devět *AtIPT* genů, z toho sedm pro isopentenylaci adenylátových nukleotidů a dva pro tRNA. Geny *AtIPT1a AtIPT3-8* jsou zodpovědné za produkci IPT. Tyto enzymy katalyzují přenesení isopentenylové skupiny z DMAPP na N<sup>6</sup> ATP nebo ADP, nikoliv však AMP. Tento experiment dokázal jako první, že cytokininy jsou, alespoň z části, syntetizovány z ATP a ADP (T. Kakimoto 2001).

Předpokládá se, že biosyntetické dráhy isoprenoidních a aromatických cytokininů budou obdobné. Doposud však nebyly identifikovány katalytické enzymy dráhy syntetizující aromatické cytokininy. Stejně tak nebyl potvrzen jakýkoliv vliv isopentenyltransferáz na biosyntézu aromatických cytokininů (H. Sakakibara 2010).



**Obr. 1:** Primární reakce biosyntézy cytokininů katalyzované pomocí IPT a tRNA-IPT. (převzato z: Peter J. Davies (2010) *Plant Hormones – Biosynthesis, Signal transduction, Action!*, Springer, New York, USA).

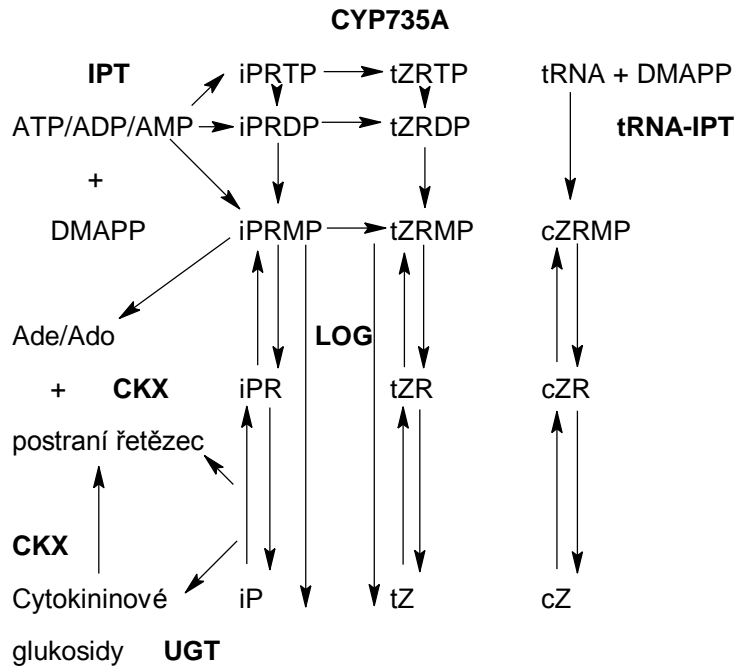
### 1.2.1.3 Metabolismus cytokininů

Metabolické dráhy cytokininů jsou studovány zejména podáváním radioizotopicky značených růstových hormonů. Na základě sledování postupné přeměny značených cytokininů na nukleotidy, nukleosidy, volné báze a poté až na degradační produkty byly klasifikovány dvě metabolické dráhy přeměny cytokininů: dráha modifikace adeninové části a dráha enzymatické přeměny postranního řetězce (Obr. 2). Obě zmíněné dráhy vedou k dočasné nebo trvalé inaktivaci cytokininů (H. Sakakibara 2010).

Většina enzymů podílejících se na degradaci adeninové části nejsou pro cytokininy striktně specifické a existuje jich celá řada. Jsou to například 5'-nukleotidáza, adenosin nukleosidáza, adenin fosforibotransferáza nebo adenosin kináza. V roce 2007 byl objeven specifický enzym pozměňující adeninovou část molekuly cytokininů. Konkrétně se jedná o fosforibohydrolázu, která přímo mění inaktivní nukleotidy cytokininů (iPRMP, tZRMP) na jejich volné báze. Tento enzym byl pojmenován "lonely guy" (LOG). LOG interaguje specificky s cytokininovými nukleotidy-5'-monofosfáty, nikoliv však s di- a trifosfáty, AMP nebo cytokininovými bázemi či ribosidy (T. Kurakawa *et al.* 2007).

Jednou z dalších možností metabolické přeměny cytokininů je jejich glykosylace, tedy navázání molekuly cukru na jeden z dusíků postranního řetězce. Tento způsob zahrnuje druhou, výše zmíněnou, dráhu přeměny cytokininů. Bylo zjištěno, že glykosylace probíhá na N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> pozici purinu. Tyto metabolity jsou označovány jako N-glykosidy. Glykosylace může probíhat také na hydroxylové skupině tZ, DZ a cZ. Tyto metabolity jsou označovány jako O-glukosidy a O-xylosidy. Předpokládá se, že právě O-glukosidy jsou jednou ze zásobních forem cytokininů (H. Sakakibara 2006).

Na rozdíl od N-glykosylace, O-glykosylace je proces reverzibilní. Deglukosylace je zajišťována enzymem β-glukosidázou (B. Brzobohatý *et al.* 1993).



**Obr. 2:** Metabolismus cytokininů (převzato z: Peter J. Davies (2010) *Plant Hormones – Biosynthesis, Signal transduction, Action!*, Springer, New York, USA).

#### 1.2.1.4 Cytokininové nukleotidy a metody jejich analýzy

Je známo, že účinek cytokininů je přímo závislý na jejich koncentraci. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto množství analyticko-chemických metod zabývajících se jejich kvantifikací. Před samotnou analýzou je nutné provést extrakci z rostlinného materiálu. V dnešní době se nejčastěji používá směs methanolu, kyseliny mravenčí a vody (15:1:4) (K. Hoyerová *et al.* 2006). Oproti Bieleškého směsi, která je složena z methanolu, chloroformu, kyseliny mravenčí a vody (12:5:1:2) (R.L. Bielecki 1964) neobsahuje výše zmíněné extrakční činidlo chloroform, který zvyšuje extrakci lipofilních molekul a komplikuje tak následné čištění.

Před analytickou koncovkou je nutné provést purifikační proces, který má za úkol rozdělit cytokininové metabolity do tří frakcí: nukleotidové, bazické (volné báze, ribosidy a *N*-glukosidy) a *O*-glukosidové. Zároveň by purifikací měla být zajištěna dostatečná návratnost a čistota vzorků pro konečnou analýzu (P. Tarkowski *et al.* 2004). Nejčastější metodou při purifikaci je kombinace metody extrakce tuhou fází (SPE) s iontově výměnnou a imunoafinitní chromatografií (IEC, IAC) (A. Crozier *et al.* 1999).

Jednou z dalších metod je extrakce kapalina-kapalina. Tato metoda využívá různé rozpustnosti cytokininů ve vodě a butanolu při různém pH. Mezi její největší výhody patří jednoduchost, časová a finanční nenáročnost, relativně vysoká návratnost a uspokojivý stupeň přečištění (V. Pacáková *et al.* 1997).

V koncové analýze cytokininů je možné využít spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS) (A. Crozier *et al.* 1999). Postupem času byla tato metoda nahrazena spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS), která dosahuje detekčních limitů 10–50 fmol (O. Novák *et al.* 2003). Spojením ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) bylo v roce 2008 dosaženo pro separaci a analýzu cytokininových *O*-glukosidů a nukleotidů detekčních limitů 5–25 fmol (Novák *et al.* 2008).



Cytokininové nukleotidy se ovšem od volných bází cytokininů liší svou polaritou, a proto je nutné zvolit samostatnou metodu jejich analýzy. V roce 2010 byla vyvinuta metoda schopná kvantifikovat cytokininové nukleotidy v lidských leukemických buňkách K-562 pomocí spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS) s detekčním limitem 0.2–0.6 pmol (T. Béres *et al.* 2010).

### 1.3 Elektromigrační metody

Elektromigrační separační metody využívají rozdílné rychlosti migrace nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli k separaci složek směsi. Elektrické pole je vytvořeno vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Prostředí mezi elektrodami je tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje elektrickou vodivost v systému. Kationty migrují k zápornému pólu, anionty ke kladnému a neutrální částice se nepohybují. Tento elektrokinetický jev se nazývá elektroforéza (P. Klouda 2003).

Elektroforetická rychlost molekul je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  a elektroforetické pohyblivosti daného iontu  $u_{ef,i}$  (P. Coufal 2004).

$$v_{ef,i} = u_{ef,i} \cdot E \text{ [m s}^{-1}\text{]}$$

Separaci látek může komplikovat difúze, která způsobuje vyrovnávání koncentrace složek roztoku v celém jeho objemu. Proto jsou složky během separace fixovány a elektroforéza je prováděna na vhodném separačním nosiči. Jeho uspořádání je plošné nebo kapilární.

### 1.3.1 Elektroforéza v plošném uspořádání

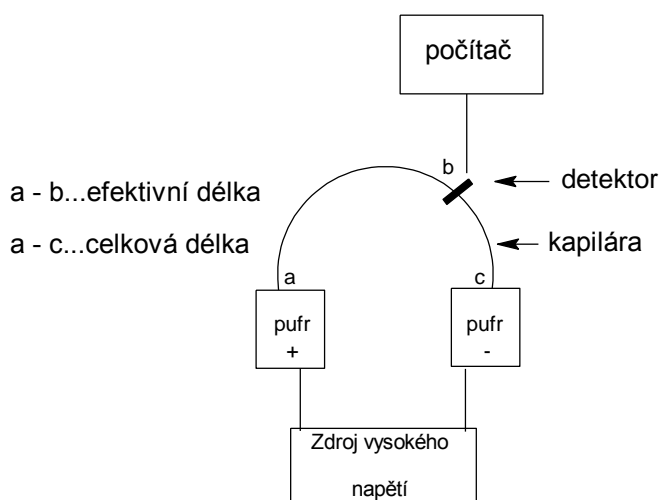
Plošný nosič je napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře. Jako nosiče se používají tenké vrstvy gelu na skleněných deskách (gelová elektroforéza) (P. Klouda 2003). Vzorek je nanášen do jamek, nejčastěji v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu (D.R. Baker 1995). Při separaci se uplatňuje kromě elektroforetické pohyblivosti také molekulově síťový efekt založený na rozdílné velikosti pórů v polyakrylamidovém gelu. Elektroforéza na plošném nosiči je metoda používaná k separaci především bílkovinných makromolekul. Uplatnění nachází také při separaci menších molekul a při studiu interakcí mezi nukleovými kyselinami a proteiny (J. Doškař *et al.* 2005).

Výše popsaná metoda je oproti kapilární elektroforéze metodou preparativní, pro analyzované látky nedestruktivní a dosahuje nižší separativní účinnosti. Jednou z dalších nevýhod elektroforézy v plošném uspořádání oproti kapilární elektroforéze je poměrně velká časová náročnost separace. Obě výše zmíněné nevýhody lze připsat většímu separačnímu napětí a tím pádem i větší intenzitě elektrického pole při analýze za pomoci kapilární elektroforézy (J. Zehnálek 2001).

### 1.3.2 Kapilární elektroforéza (CE)

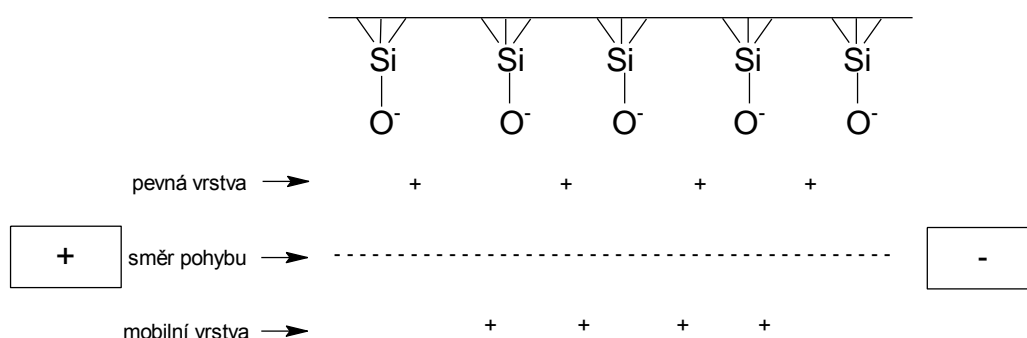
Kapilární elektroforéza je metoda využívající separaci látek v tenké křemenné kapiláře o variabilním vnitřním průměru 25–100  $\mu\text{m}$  a přesně definované efektivní a celkové délce (Obr. 3). Kapilára je ponořena do zásobníku s pufrům společně s platinovými elektrodami, mezi které je vkládáno vysoké napětí 0–30 kV. Vzorek je do kapiláry nastříkovan ze zásobníku, který je k tomu určen (D.R. Baker 1995).

Kapilární elektroforetické uspořádání se oproti plošnému liší v mnoha svých vlastnostech ovlivňujících charakter analýzy. Díky povrchu kapiláry, který efektivně odvádí vzniklé Joulovo teplo, je možno mezi elektrody vložit napětí o maximální hodnotě 30 kV bez poškození analytu. V plošném uspořádání je maximální vkládané napětí 200V. Metoda kapilární elektroforézy vyžaduje oproti elektroforéze v plošném uspořádání mnohem složitější instrumentaci, která ovšem zajišťuje několikanásobně větší účinnost, on-line detekci analytu a pokročilejší automatizaci minimalizující vznik lidské chyby v průběhu samotné analýzy. Oproti elektroforéze v plošném uspořádání je také použito mnohonásobně menší množství analytu (D.R. Baker 1995), (J. Zehnálek 2001).



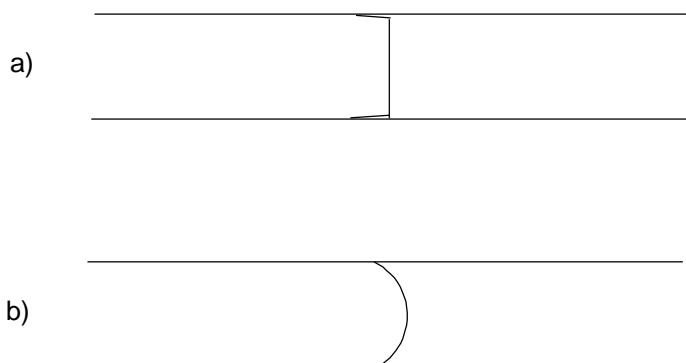
**Obr. 3:** Blokové schéma instrumentace kapilární elektroforézy s vyznačenou efektivní a celkovou délkou kapiláry.

Jevem typickým pro CE je elektroosmotický tok (EOF, Electroosmotic Flow) (Obr. 4), který se běžně vyskytuje po aplikaci vysokého napětí na stěnu kapiláry naplněné roztokem vhodného elektrolytu. Aplikací roztoku o  $\text{pH} > 3$  dochází k hydrolyze siloxanových skupin ( $\text{Si-O-Si}$ ) za vzniku silanolových skupin ( $\text{Si-OH}$ ) a jejich následné disociaci, díky které je vnitřní povrch kapiláry pokryt záporně nabitými křemičitanovými skupinami ( $\text{Si-O}^-$ ). Ke stěně kapiláry je přitahována vrstva kationtů základního elektrolytu a vzniká tak stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Kationty blíže středu kapiláry tvoří tzv. difúzní vrstvu. Po aplikaci elektrického napětí jsou tyto kationty ležící na vnější difúzní vrstvě elektrické dvojvrstvy unášeny směrem ke katodě. Hydratované kationy  $\text{H}^+$  se společně s asociovanými molekulami vody pohybují stejným směrem a vyvolávají tok celého roztoku směrem k detektoru umístěného před katodou. Tento jev se nazývá elektroosmotický tok. Ustanovením Sternovy a difúzní vrstvy dochází ke vzniku potenciálových rozdílů. Potenciálový rozdíl difúzní vrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál neboli zeta potenciál  $\zeta$ . Úroveň EOF je závislá na  $\text{pH}$ , jelikož zeta potenciál roste s úrovní disociace silanolových skupin na povrchu kapiláry. Naopak úroveň EOF je nepřímo závislá na koncentraci základního elektrolytu (D. Heiger 2000), (P. Klouda 2003).



**Obr. 4:** Elektroosmotický tok v kapiláře.

Elektroosmotický tok má v závislosti na použitém tlaku (elektroosmotický/hydrodynamický) plochý, respektive parabolický profil (Obr. 5) a jeho vlastnosti lze dále ovlivnit velikostí aplikovaného napětí, teplotou nebo přidáním organických sloučenin (D.A. Skoog *et al.* 1998).



**Obr. 5:** Plochý a), respektive parabolický b) profil elektroosmotického toku v závislosti na použitém tlaku.

Mezi faktory nepříznivě ovlivňující účinnost separace patří dávkování vzorku, které může způsobit vznik startovní zóny analytu dosahující až několika mm délky kapiláry. Pro redukci délky startovní zóny se využívá tzv. „stacking“ efektu, kdy je vzorek rozpuštěn v roztoku o nižší iontové síle, než má elektrolyt použitý k separaci. Následkem toho dochází k zesílení elektrického pole ve startovní zóně a rychlejšímu pohybu kationtů vzorku až do doby, dokud nenarazí na rozhraní se základním elektrolytem, kde je intenzita elektrického pole nižší, a tak dochází ke snížení rychlosti pohybu kationtů. Startovní zóna se tak výrazně zaostří. Tento efekt se používá, je-li vzorek rozpuštěn například ve vodě (P. Klouda 2003).

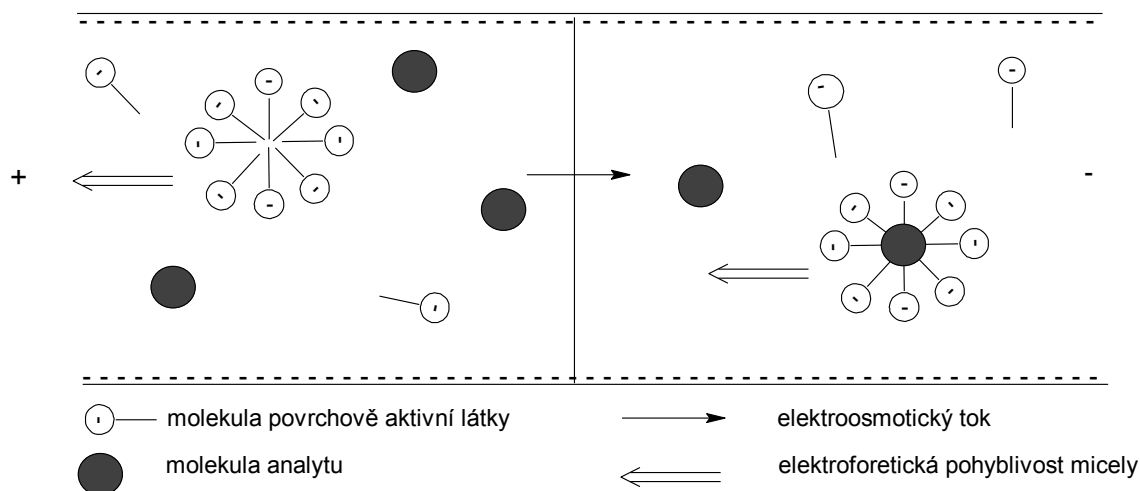
Mezi techniky kapilární elektroforézy je možné v závislosti na mechanismu separace a použitím médiu v kapiláře řadit celkem šest základních technik:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE, Capillary Zone Electrophoresis)
  2. Kapilární gelová elektroforéza (CGE, Capillary Gel Electrophoresis)
  3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC, MECC, Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography)
  4. Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (EC, CEC, Capillary Electrochromatography)
  5. Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, IEF, Capillary Isoelectric Focusing)
  6. Kapilární izotachoforéza (CITP, ITP, Capillary Isotachopheresis)
- (P.Coufal 2004)

Díky své jednoduchosti a všestrannosti je nejpoužívanější technikou kapilární elektroforézy kapilární zónová elektroforéza a to především z toho důvodu, že kapilára je naplněná pouze samotným pufrům. Její modifikací, původně vyvinutou pro separaci nenabitých sloučenin, je micelární elektrokinetická chromatografie.

### **1.3.2.1 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)**

Micelární elektrokinetická chromatografie je považována za hybridní metodu mezi elektroforézou a chromatografií. Její největší výhodou je schopnost separace neutrálních, ale i nabitých molekul. Neutrální molekuly jsou separovány na základě přidání povrchově aktivní látky (SDS, CTAB, atd.) o koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace do roztoku pufru. Při této koncentraci povrchově aktivní látky dochází ke vzniku kulovitých útvarů, micel, a vytváří se micelární fáze. Micela vytvořená v hydrofilním prostředí pufru má polární povrch a nepolární dutinu na rozdíl od micely vytvořené v hydrofobním prostředí, která vykazuje nepolární povrch a polární dutinu. Separace analytů v MEKC je tedy založena především na rozdílné distribuci neutrálních analytů mezi vodnou a micelární fází a nábojem vyskytujícím se na povrchu micely (Obr. 5) (P. Coufal 2004), (D. Heiger 2000).



**Obr. 5:** Separace analytu v micelární elektrokinetické chromatografii.

### 1.3.2.2 Způsoby detekce v CE

Detekce separovaných iontů je v kapilární elektroforéze možno provádět několika způsoby, které jsou specifické svou citlivostí v závislosti na koncentraci vzorku. Jedna z nejběžněji používaných metod je UV detekce (CE-UV), která je schopna měřit při vlnových délkách od 200 nm až po vlnové délky viditelného spektra. Kvůli velmi krátké dráze, kterou UV paprsky v kapiláře urazí, je pro zachování vysokého rozlišení nutné precizní zaostření čoček detektoru. Tato metoda je schopna dosáhnout koncentračních limitů  $10^{-5}$  až  $10^{-8}$  mol/l. Její největší výhodou je univerzální použití, dosahuje však v porovnání s ostatními metodami nejnižších koncentračních limitů vzorků.

Jednou z dalších, avšak mnohem citlivějších metod, je fluorescence, jejíž koncentrační detekční limit je  $10^{-7}$  až  $10^{-9}$  mol/l. Nevýhodou této metody v porovnání s UV detekcí je nutnost derivatizace vzorků před analýzou.

Nejcitlivější běžně používanou metodou je laserem indukovaná fluorescence (CE-LIF). Tato metoda dosahuje koncentračních detekčních limitů  $10^{-14}$  až  $10^{-16}$  mol/l. Je ovšem finančně velmi nákladná a vzorky je opět nutné před analýzou derivatizovat (D. Heiger 2000).

### 1.3.2.3 CE v analýze fytohormonů

Jako první byla kapilární zónová elektroforéza s UV detekcí použita na separaci a analýzu cytokininů, jejich ribosidů a dalších purinových a pyrimidinových bází v roce 1997. Při vlnové délce 265 nm byl limit detekce pro zeatin 6 µg/ml a pro zeatin ribosid 9 µg/ml respektive 36 pg a 45 pg v 6 nl nastříkovaného objemu (V. Pacáková *et al.* 1997).

V roce 2005 byla úspěšně provedena separace a identifikace kinetinu a kinetin ribosidu v kokosovém mléce na základě spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) a kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Detekční limity pro kinetin a kinetin ribosid byly 0.02 µM, respektive 0.005 µM (Ge L. *et al.* 2005).

V dalších případech byla kapilární elektroforéza použita ke stanovení kyseliny indolactové (IAA). Na základě přirozené fluorescence auxinů bylo při excitační vlnové délce 283 nm a emisní vlnové délce 350 nm v mezofylu kalanchoe *Kalanchoë daigremontiana* R. Hamet&H. Perrier, 1914 detekováno 95 pmol/g IAA, v apikálním vrcholu kukuřice seté *Zea mays* C. Linnaeus, 1753 92 pmol/g IAA a ve stonku skočce obecného *Ricinus communis* C. Linnaeus, 1753 1120 pmol/g IAA z čerstvé rostlinné hmoty (M. Brüns *et al.* 1997).

Nejen IAA, ale také její primární metabolit, indol-3-acetylaspartátová kyselina (IAAsp), byly kvantifikovány pomocí CE z extraktu hrachu setého *Pea sativum* C. Linnaeus, 1753 při excitační vlnové délce 254 nm a emisní vlnové délce 360 nm (J. Olsson *et al.* 1998).



#### 1.3.2.3.1 CE-LIF v analýze fytohormonů

Jako první a jedna z mála byla vyvinuta metoda na kvantifikaci kyseliny abscisové (ABA), která hraje nezastupitelnou roli v průběhu růstu a vývoje rostliny. Detekční limit ABA po derivatizaci byl určen na 5.5 amol pro nástřik o objemu 5 nl. (X. Liu *et al.* 2003).

#### 1.3.2.4 CE v analýze nukleotidů

V průběhu minulých let bylo vyvinuto množství metod využívajících kapilární elektroforézu s UV detekcí k analýze nukleotidů. Úspěšnost separace nukleotidů je závislá především na složení a pH použitého pufru. Použití pufru obsahujícího 40mM kyselinu citronovou, 0.8mM CTAB a titrovaného na výsledné pH 4.3 kyselinou  $\gamma$ -amino máselnou (GABA) bylo v roce 2007 separováno a analyzováno 21 nukleotidů a deoxynukleotidů, které ovlivňují mnohé metabolické dráhy v živočišných buňkách (D. Friedecký *et al.* 2007). Stejných podmínek bylo použito v roce 2010 při identifikaci intracelulárního *ortho*-topolin ribosid-5'-monofosfátu (*o*TRMP). U této látky byla prvně popsána její cytotoxická aktivita (J. Voller *et al.* 2010).

K separaci 5'-ribonukleotidů z orgánů morčete domácího byl již v roce 1988 použit fosforečnan sodný v rozmezí pH 6-8 (T. Tsuda *et al.* 1988).

V roce 2009 byl použit pufr obsahující 100mM hydrogenuhličitan sodný o pH 9.6 s přísadkou beta-cyklodextrinu ( $\beta$ -CD) k separaci molekul AMP, ADP, ATP, koenzymu NAD<sup>+</sup> a NADPH v bakterii *Paracoccus denitrificans* s cílem potvrdit možnost použití kapilární elektroforézy v metabolomice (J. Musilová *et al.* 2009).

#### 1.3.2.4.1 CE-LIF v analýze nukleotidů

Jednou z dalších hojně využívaných metod při analýze nukleotidů je kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí (CE-LIF). Při použití této metody je však nutná derivatizace vzorku, která spočívá ve specifickém navázání fluorescenčního barviva na molekulu nukleotidu. Limit detekce (LOD) je v tomto případě výrazně nižší.

V roce 2005 byl poprvé úspěšně separován a detekován nukleosid-5'-monofosfát z DNA pomocí metody založené na laserem indukované fluorescenční detekci. Nukleosid-5'-monofosfát byl získán z DNA pomocí nukleázy P1 (NP1) a následně byl vytvořen konjugát s fluorescenčním barvivem BODIPY FL EDA. Výsledek experimentu ukázal, že CE-LIF má potenciální uplatnění v determinaci poškozené DNA a to především z důvodu citlivosti, která je v porovnání s CE-UV o dva řády vyšší (M. Cornelli *et al.* 2005).

Analýza nukleotidů za pomoci CE-LIF byla použita také na detekci dideoxyadenosin trifosfátu (ddATP) a to především z důvodu své až 160krát vyšší citlivosti oproti CE-UV. Dideoxyadenosin trifosfát vykazuje ve vnitrobuněčném prostředí významné inhibiční účinky proti virové reversní transkriptáze viru HIV (S. Mallampati *et al.* 2007).

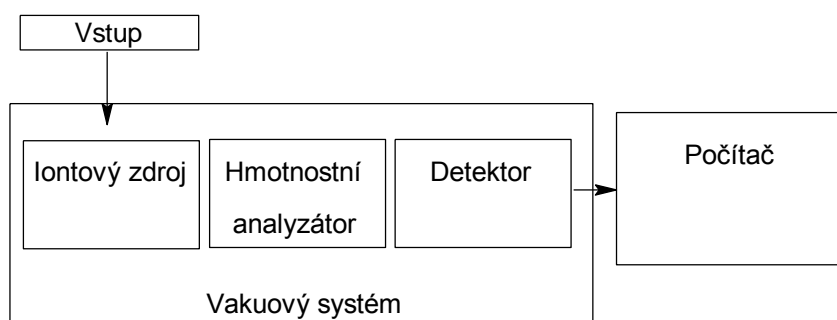
V roce 2010 byla představena metoda CE-LIF schopná analyzovat hladinu ATP 120krát nižší než předchozí metody využívající CE-UV. Použitím této metody bylo možné změřit hladinu ATP v pohlavních buňkách samic kuru obsahujících pouhých 20 oocytů. Uplatnění této metody je možné například v technikách asistované reprodukce (A. Zinellu *et al.* 2010).

## 1.4 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně chemická metoda, založená na převedení analyzovaných látek na záporně či kladně nabitě ionty za účelem následného měření jejich hmotnosti. Informace získané touto analýzou mohou výrazně přispět k určení struktury látky.

Zvýšení selektivity a úspěšnosti identifikace analytu ve vzorku lze docílit spojením MS se separačními metodami, jako jsou například kapalinová chromatografie (LC), popřípadě plynová chromatografie (GC). V takovémto spojení vystupuje hmotnostní spektrometr jako detektor látek eluovaných z kolony kapalinové nebo plynové chromatografie.

U všech přístrojů lze identifikovat i přes značnou konstrukční rozmanitost jejich základní funkční prvky (Obr. 6). Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do formy nabitých iontů. Takto vzniklé ionty jsou následně děleny na základě poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) v hmotnostním analyzátoru. Proud iontů je po průchodu hmotnostním analyzátozem usměrňován na detektor poskytující po dopadu iontů analogový signál, který je následně zpracován počítačem (I. Jelínek 2004).



**Obr. 6:** Blokové schéma hmotnostního spektrometru

## **2. Experimentální část**

## 2.1 Materiál a metody

### 2.1.1 Chemikálie

Směs standardů – *trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfát (*t*ZRMP), *trans*-zeatin ribosid-5'-difosfát (*t*ZRDP), *trans*-zeatin ribosid-5'-trifosfát (*t*ZRTP), *cis*-zeatin ribosid-5'-monofosfát (*c*ZRMP), *cis*-zeatin ribosid-5'-difosfát (*c*ZRDP), *cis*-zeatin ribosid-5'-trifosfát (*c*ZRTP), koncentrace  $10^{-3}$  mol/l (Biolog, Německo)

Derivatizace – 27 mM BODIPY FL EDA (Invitrogen, USA), 1.8 M EDC (Sigma-Aldrich, USA), 50mM HEPES, pH = 6.5 (Sigma-Aldrich, USA), 1M NaOH (Sigma-Aldrich, USA), deionozoivaný voda Milli Q water (Millipore, USA)

Purifikace – 52.5M tetrafenylborát sodný (Sigma-Aldrich, USA), 1mM fosfátový pufr, pH=6.5 (Sigma-Aldrich, USA), dichlormethan (Sigma-Aldrich, USA)

CE-LIF analýza – základní elektrolyt: 25mM TRIS, pH=8.0, 60mM SDS (Sigma-Aldrich, USA)

LC-MS analýza – 10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH=10.0 (Sigma-Aldrich, USA),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Merck, Německo), LC-MS grade methanol (Sigma-Aldrich, USA). Kalibrační směs: 10mM NaOH, 0.1 % FA v 80 % ACN

### 2.1.2. Přístrojové vybavení

- Pro analýzy vzorků pomocí kapilární elektroforézy byl použit přístroj Agilent<sup>3D</sup> CE s možností elektrokinetického nebo hydrodynamického tlakového dávkování (Agilent Technologies, Německo) řízený pomocí softwaru Hewlett Packard ChemStation.
- Analýza probíhala v křemenných kapilárách o celkové délce 78 cm, efektivní délce 69.5 cm a vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  (Polymicro CE and CEC Technologies, USA).
- Analyty byly detekovány na detektoru Zetalif<sup>TM</sup> Evolution s argon-iontovým laserem o vlnové délce 488 nm (Picometrics, Francie).

- K identifikaci derivatizovaných nukleotidů byla použita HPLC sestava Alliance 2695 (Waters, UK) s detektorem diodového pole, spojená s hybridním hmotnostním spektrometrem QqTOF micro (Waters, UK).
- Vorky byly navažovány na vahách Mettler Toledo PB-303, (Mettler Toledo, USA).
- K sonifikaci a odplyňování vzorků byl použit ultrazvukový sonifikátor Transsonic 310 (Elma, Německo).
- K centrifugaci vzorků byla použita nechlazená laboratorní centrifuga Mini Spin Eppendorf (Eppendorf, Německo).
- K promíchání vzorků byla použita třepačka Bio RS-24 mini-rotator (Biotech, Česká republika).
- K homogenizaci vzorků byl použit Mixer vortex Wizard (Velp scientifica, Itálie).
- K měření pH roztoků byl použit pH metr HI 110 (Hanna Instruments, USA).
- Deionizovaná voda k rozpuštění vzorků byla vyráběna zařízením Millipore Direct-Q 3 Ultrapure Water Systém (Millipore, USA).
- K manipulaci se vzorky a roztoky byly použity pipety a špičky Eppendorf (Eppendorf, Německo).

## 2.1.3 Příprava standardů pro CE-LIF analýzu

### 2.1.3.1 Derivatizace pomocí BODIPY FL EDA

Ke směsi standardů zeatinových nukleotidů (10  $\mu$ l, koncentrace  $10^{-3}$  mol/l) bylo přidáno 1.8M EDC (15  $\mu$ l, rozpuštěno v 50mM HEPES, pH=6.5), 27mM BODIPY FL EDA (15  $\mu$ l, rozpuštěno v 50mM HEPES, pH=6.5) a HEPES (15  $\mu$ l, pH=6.5). Vzorke byly inkubovány po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě ve tmě na třepače o 500 rpm.

K úpravě pH vzorků byl použit 1M NaOH (A.M. Krais *et al.* 2010).

### 2.1.3.2 Purifikace vzorků

Proces purifikace derivatizovaných vzorků zeatinových nukleotidů má za následek odstranění zbytku nezreagovaného barviva BODIPY FL EDA a EDC extrakcí kapalina-kapalina. Dochází tak k potlačení šumu v následné analýze.

Před začátkem purifikace byl vzorek zředěn vodou na výslednou koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Následně byl přidán 52.5M tetrafenylborát sodný (50  $\mu$ l, rozpuštěný v 1mM fosfátovém pufru, pH=6.5) a 1 ml dichlormethanu. Směs byla homogenizována pomocí vortexu a zcentrifugována. Po odebrání vodné fáze byl opět přidán 1 ml dichlormethanu a proces byl opakován 3krát (A.M. Krais *et al.* 2010)

## 2.1.4 Identifikace standardů pomocí LC-MS

Chromatografická separace byla provedena v systému obrácených fází na koloně XBridge (150x 2.1 mm, velikost částic 3.5  $\mu\text{m}$ ). Kolona byla temperována na 20 °C. Objem nastříknutého vzorku byl 20  $\mu\text{l}$  purifikované směsi, koncentrace analytů 50  $\mu\text{mol/l}$ . Jako mobilní fáze A byl použit 10mM hydrogenuhličitan amonný upraven koncentrovaným hydroxidem amonným na pH 10.0. Mobilní fázi B tvořil methanol. Eluce probíhala při průtoku 0.2 ml/min. Počáteční izokratická fáze (98 % A) trvala 2 minuty. Následovala fáze lineárního gradientu (2–25 min), při které se objemové procento methanolu zvýšilo na 65 %. Cílem následujícího izokratického kroku (26–34 min, 90 % methanol) bylo vymýt případné hydrofóbnější složky vzorku. Posledním krokem (35–45 min) byla reekvilibrace na výchozí podmínky. Eluent byl veden skrz DAD detektor (rozsah vlnových délek 210–400 nm) do iontového zdroje hybridního hmotnostního spektrometru QqTOF micro. Analyty byly v iontovém zdroji vyhřátém na 110 °C současně ionizovány (napětí na kapiláře 3 kV) a zmlženy plynem (dusík o teplotě 350 °C a průtoku 500 l/h). Průtok sušícího plynu byl 50 l/h a napětí na konický vstupní otvor 20 V. Ionizace probíhala v negativním módu a data byla sbírána v rozsahu  $m/z$  50–1000. Jako kalibrant byla použita směs 10mM hydroxidu sodného a 1% kyseliny mravenčí v 80% acetonitrilu.



## 2.1.5 Separace standardů pomocí CE-LIF

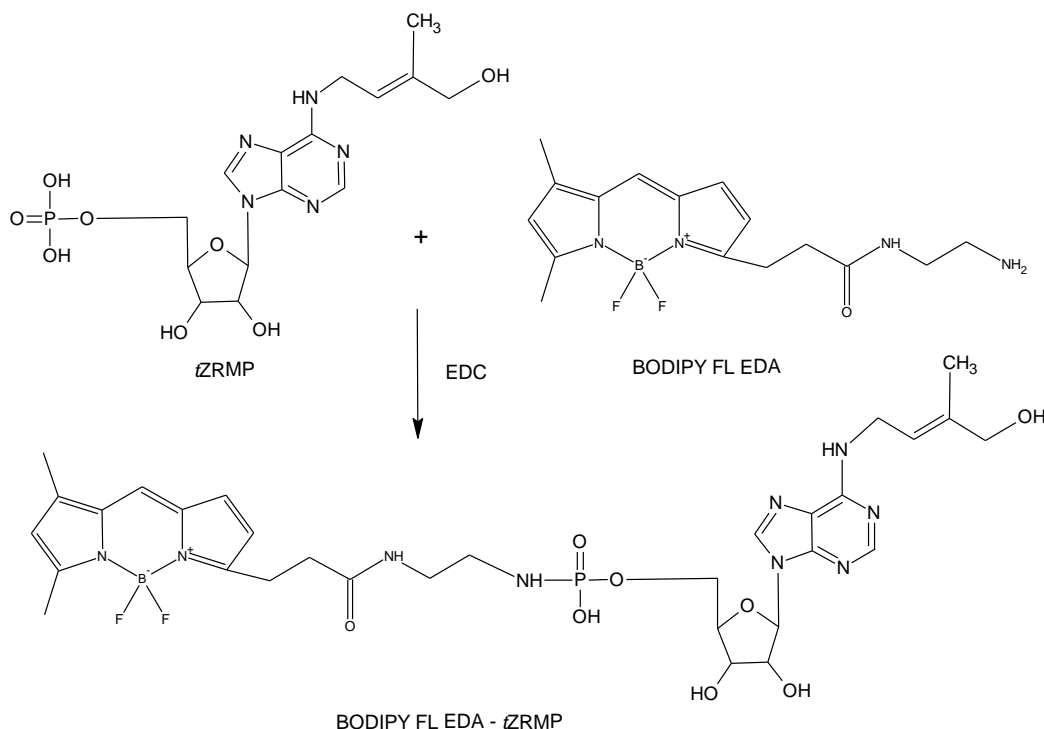
Jako základní elektrolyt byl použit 25mM TRIS, pH=8.0 s obsahem 60mM SDS. Navážka 0.757 g TRIS byla rozpuštěna ve 250 ml vody, pH na hodnotu 8.0 bylo upraveno za pomoci 8.5% kyseliny fosforečné příslušně zředěné vodou z 85% zásobního roztoku. K 25 ml takto připraveného roztoku byla přidána navážka 432 mg SDS.

Všechny analýzy probíhaly v křemenné kapiláře bez úpravy vnitřního povrchu o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ , efektivní délce 69.5 cm a celkové délce 78 cm. Nová kapilára byla vždy promyta 1M hydroxidem sodným po dobu 10 min, následně vodou po dobu 10 minut a v konečné fázi pufrům po dobu 20 minut. Při ekvilibraci kapiláry během optimalizace základního elektrolytu (pH, koncentrace pufru a SDS) byla taktéž promývána novým pufrům po dobu 20 minut. Excitační vlnová délka laseru byla 488 nm, emisní vlnová délka byla nastavena na 520 nm. Analýzy probíhaly vždy ve dvou opakováních za teploty 25 °C.

## 2.2 Výsledky a diskuze

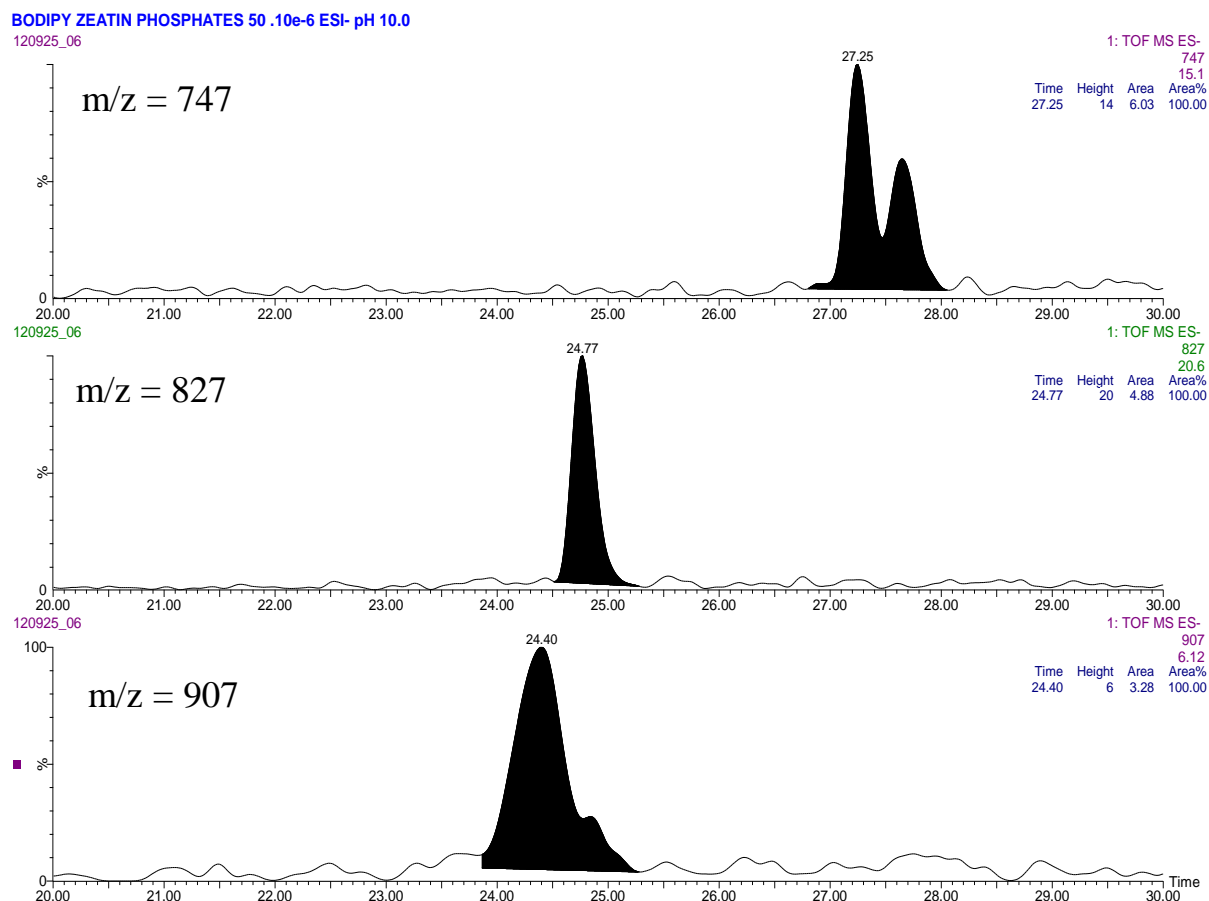
Největším nedostatkem dosud publikovaných metod na analýzu intaktních cytokininových nukleotidů jsou jejich vysoké (řádově mikromolární) detekční limity (T. Béres *et al.* 2010; T. Béres *et al.* M. Gemrotová *et al.* 2012). Naší snahou bylo ověřit možnost využití vysoce citlivé metody CE-LIF při jejich analýze. Protože cytokininové nukleotidy nevykazují přirozenou fluorescenci, bylo potřebné konjugovat je s vhodným fluoroforem. Zeatinové nukleotidy byly derivatizovány fluorescenčním barvivem BODIPY FL EDA, které bylo k derivatizaci nukleotidů poprvé použito v roce 2002 (Schmitz *et al.* 2002) a posléze ještě několikrát (A.M. Krajs *et al.* 2010; S. Mallampati *et al.* 2007; R. Schiewek *et al.* 2007; A. Zinellu *et al.* 2010). Podmínky derivatizace byly zvoleny na základě strukturní analogie cytokininových nukleotidů s intracelulárními metabolity 2'-deoxy-N<sup>6</sup>-methyladenosinu (A.M. Krajs *et al.* 2010).

Fluorescenční barvivo se selektivně váže skrze svou amino skupinu na fosfátový zbytek nukleotidů za přítomnosti ve vodě rozpustného 1-ethyl-3-(3-N,N-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu (EDC). Schéma reakce (Obr.7) znázorňuje vazbu fluorescenčního barviva na *trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfát (tZRMP) a je analogické také pro zbytek analyzovaných zeatinových nukleotidů.



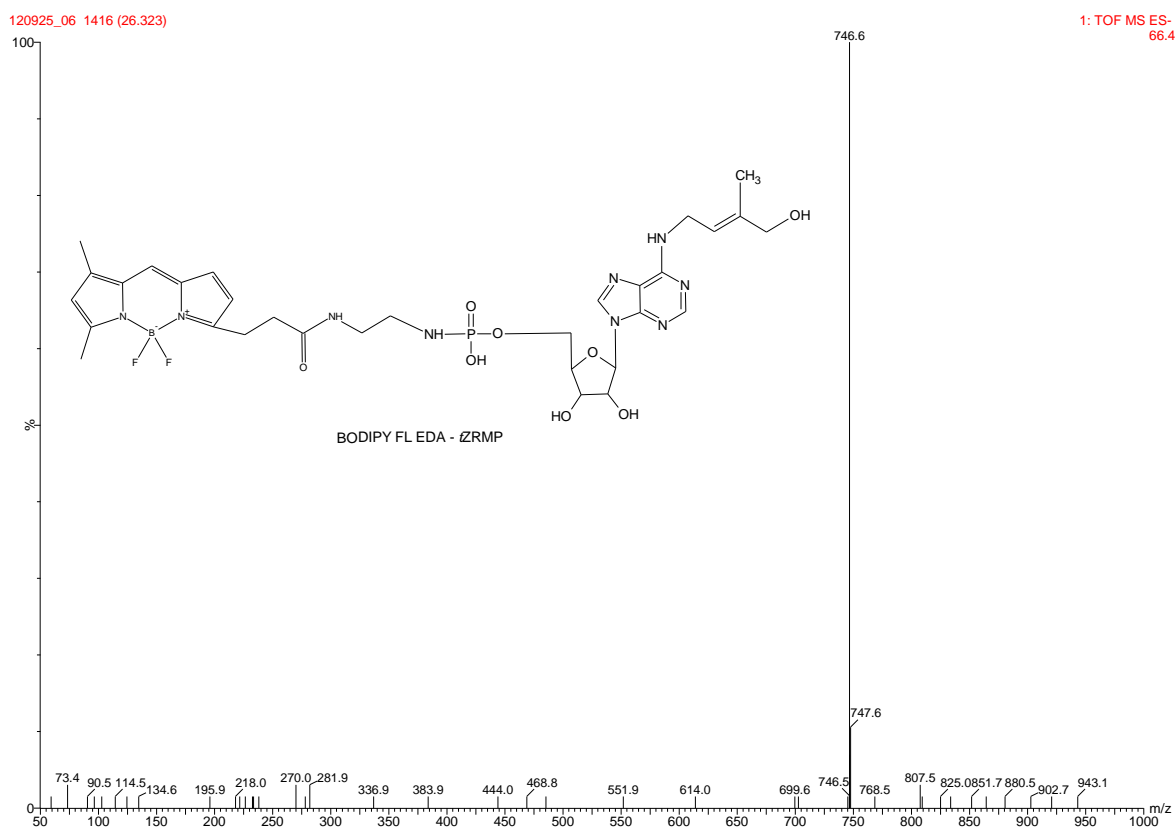
**Obr. 7** – Schéma derivatizace *trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfátu (tZRMP) pomocí fluorescenčního barviva BODIPY FL EDA a EDC.

Hmotnostní spektrometrie je na poli analýzy fytohormonů hojně využívanou analytickou metodou především díky své citlivosti a selektivitě. K identifikaci fluorescenčních konjugátů zeatinových nukleotidů byla použita ve spojení s kapalinovou chromatografií. Extrahované iontové chromatogramy (Obr. 9) naznačují, že pořadí eluce fluorescenčně značených mono-, di- a trifosforylovaných zeatinových nukleotidů je shodné s elučním pořadím nederivatizovaných cytokininových nukleotidů (T. Béres *et al.* 2010). Nejdéle jsou zadržovány nukleotidy s jednou fosfátovou skupinou. Retence se snižuje s narůstajícím počtem fosfátových skupin. Zvýšení retence derivatizovaných cytokininových nukleotidů oproti nederivatizovaným lze přičíst navázání fluorescenčního barviva. V případě monofosfátů a trifosfátů je pozorovatelný náznak separace *cis* a *trans* forem (Obr. 8).

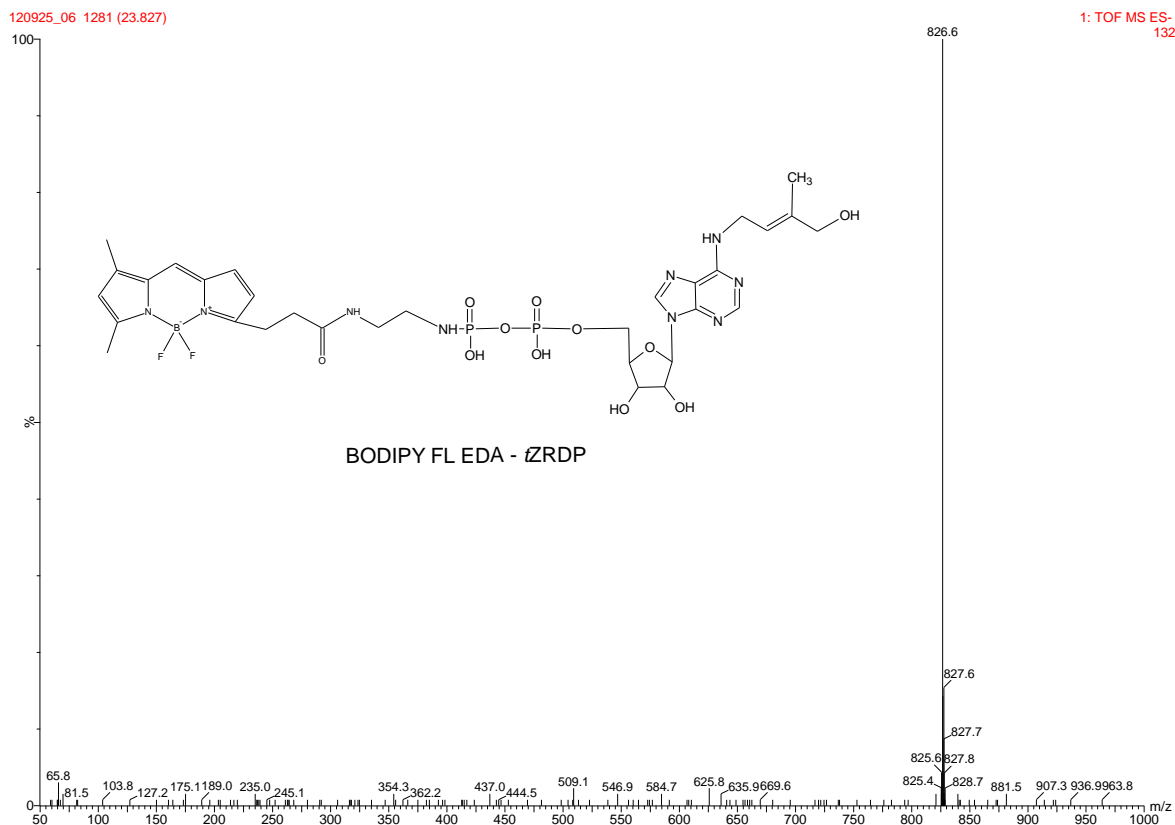


**Obr.8** – Extrahované iontové chromatogramy derivatizovaných mono-, di- a trifosfátů zeatinových nukleotidů.

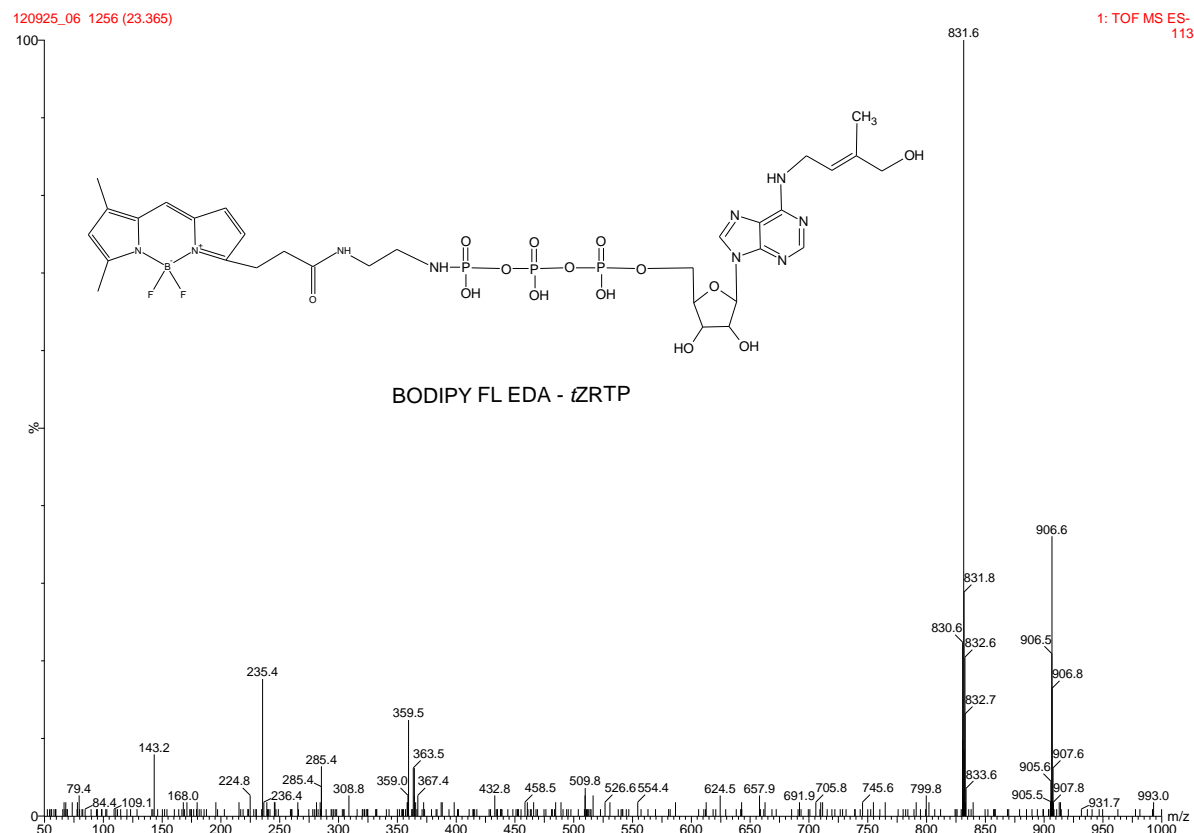
Nejvýraznějším iontem hmotnostních spekter fluorescenčně značených mono- a difosforylovaných zeatinových nukleotidů je molekulový iont  $[M-H]^-$  (Obr. 9, 10). Hmotnostní spektrum derivatizovaného trifosfátu obsahuje kromě molekulového iontu  $[M-H]^-$  výrazný iont o  $m/z$  831,6 (Obr. 11). Různá šíře píku extrahovaného iontového chromatogramu při  $m/z$  907 (předpokládaná hmota BODIPY FL EDA *c*-/*t*ZRTP) a  $m/z$  832 (neznámý pík) naznačuje, že  $m/z$  831,6 neodpovídá fragmentu BODIPY FL EDA *c*-/*t*ZRTP, ale spíš se jedná o neznámou koelující nečistotu (Obr. 12). Fragmentace trifosforylovaných fluorescenčně značených zeatinových nukleotidů se jeví být nepravděpodobná i vzhledem k absentující fragmentaci mono- a difosfátů za daných podmínek. Zvolený způsob kalibrace (externí) a složení kalibrační směsi (10mM NaOH, 0.1 % FA v 80 % ACN), která se vyznačuje klesající intenzitou signálu charakteristických aduktů se zvyšujícím se  $m/z$ , jsou pravděpodobnou příčinou výrazného rozdílu mezi teoretickou a naměřenou hodnotou  $m/z$  (0,4 Da).



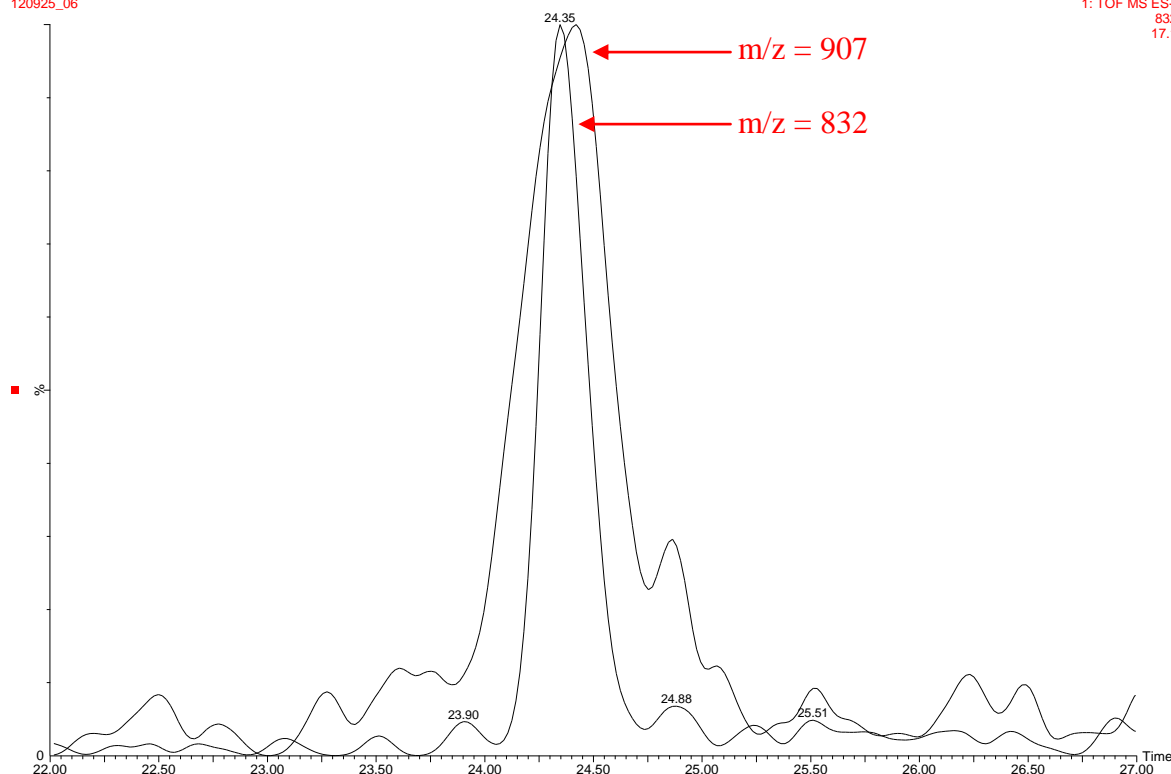
**Obr. 9** – Hmotnostní spektrum konjugátu fluorescenčního barviva BODIPY FL EDA a *cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfátu.



**Obr. 10** – Hmotností spektrum konjugátu fluorescenčního barviva BODIPY FL EDA a *cis/trans*-zeatin ribosid-5'-difosfátu.



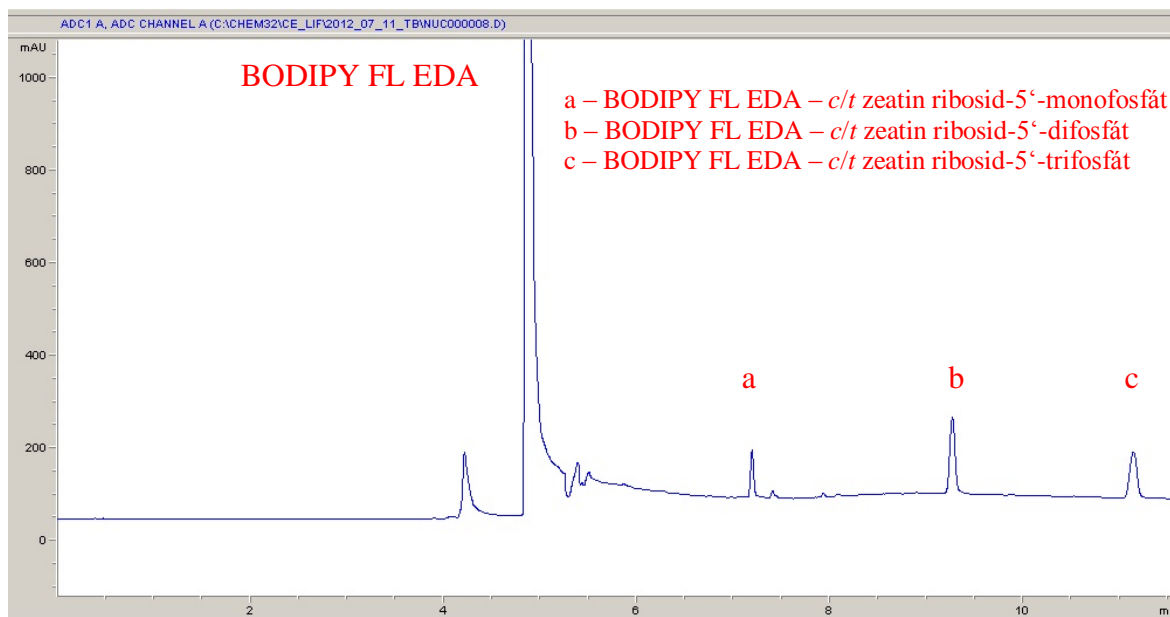
**Obr. 11** – Hmotností spektrum konjugátu fluorescenčního barviva BODIPY FL EDA a *cis/trans*-zeatin ribosid-5'-trifosfátu.



**Obr. 12** – Srovnání extrahovaných iontových chromatogramů  $m/z$  832 a  $m/z$  907.

Vlivem tepla, světla a kyslíku dochází k postupnému rozkladu nadbytečného fluorescenčního barviva a ke vzniku dekompozičních produktů schopných fluorescence po excitaci při vlnové délce 488 nm, která je totožná s excitační vlnovou délkou BODIPY FL EDA (R. Schiewek *et al.* 2007). Díky této skutečnosti je nutné provést purifikaci standardů za účelem odstranění zbytku nezreagovaného barviva BODIPY FL EDA a EDC. V průběhu purifikace komplexuje tetrafenylborát s kladně nabitými zbytky EDC a BODIPY FL EDA. Po následném přidání dichlormethanu přechází hydrofobní komplex z vodné do organické fáze. Hydrofilní nukleotidy zůstávají ve fázi vodní (R. Schiewek *et al.* 2007).

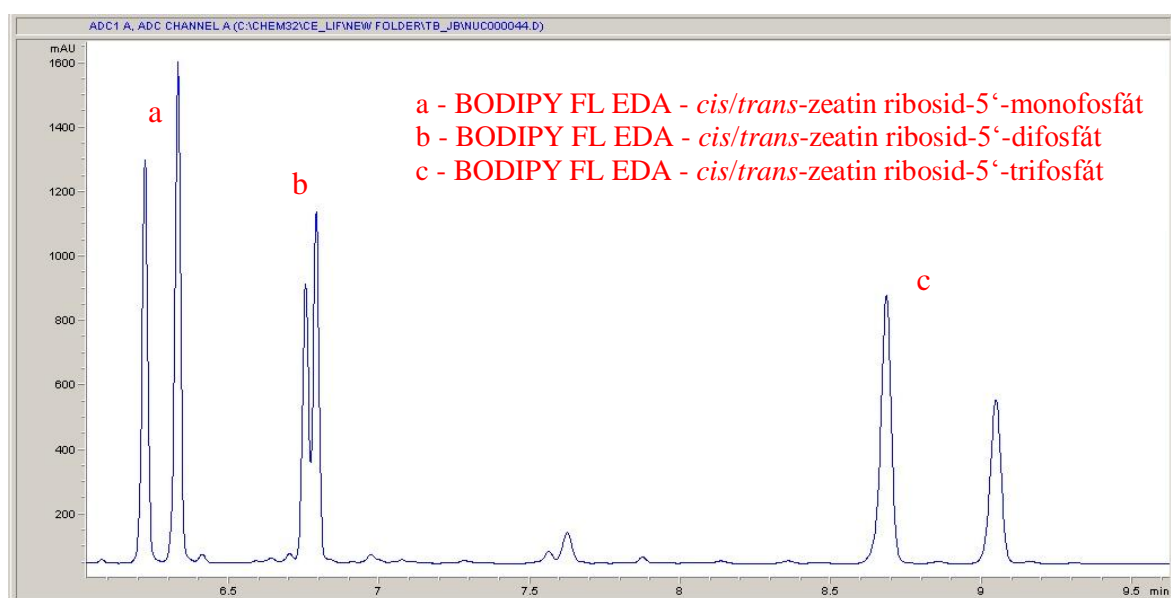
Z elektroferogramu analýzy probíhající za suboptimálních podmínek (S. Mallampati *et al.* 2007) (Obr. 13) lze vyčíst přítomnost fluorescenčního barviva BODIPY FL EDA, které je unášeno elektroosmotickým tokem. Kromě toho pozorujeme 3 výrazné píky, které pravděpodobně odpovídají mono-, di- a trifosforylovaným zeatinovým nukleotidům.



**Obr. 13** – Analýza derivatizovaných zeatinových nukleotidů před procesem purifikace za suboptimálních podmínek: základní elektrolyt 100mM amonium acetát, pH=9.5, doba nástřiku 5 sekund při 10 mbar, vkládané napětí 30 kV, generovaný proud 99.5  $\mu$ A. Analýza probíhala v křemenné kapiláře bez úpravy vnitřního povrchu o vnitřním průměru 75  $\mu$ m, efektivní délce 69.5 cm a celkové délce 78 cm.

CE-LIF metoda na separaci derivatizovaných zeatinových nukleotidů byla v průběhu experimentu optimalizována. Experiment vycházel ze suboptimálních podmínek za použití základního elektrolytu složeného ze 100mM amonium acetátu o pH=9.5 (S. Mallampati *et al.* 2007). Při těchto podmínkách nedocházelo ani v náznaku k separaci izomerů. Z těchto důvodů bylo přistoupeno ke změně složení pufru. Jako základní elektrolyt byl zvolen TRIS s ohledem na nízkou vodivost. Dalším důvodem byla oblast aktivity pufru blízká oblasti amoniaku ( $pK_a$  TRIS=8.5,  $pK_a$   $NH_4OH$ =9.25). Optimalizována byla koncentrace a pH pufru (rozsah 12.5–25–50–100mmol/l, pH 7.5–8.0–8.5–9.0) s cílem separace *cis*-/*trans*- izomerů. Navzdory optimalizaci docházelo ke komigraci izomerů. Na základě tohoto bylo do základního elektrolytu přidáno SDS a separace prováděna jako micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Koncentrace SDS byla testována v rozmezí 20–100mM (v 20mM intervalech). Po přidání detergentu byly pozorovány zvýšené hodnoty proudu, zvýšený šum a prodloužené migrační časy. Zatímco zvýšení hodnot šumu a proudu je možné vysvětlit vysokou vodivostí SDS, prodloužené migrační časy lze přičíst tvorbě záporně nabitých micel, které mají tendenci migrovat proti směru EOF (D.R. Baker 1995).

Přidavek organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) ovlivňuje selektivitu separace MEKC. Do optimalizovaného základního elektrolytu (25mM TRIS, pH=8.0, 60mM SDS) byl přidán methanol a nebo acetonitril (10–20 objemových %). I když došlo ke snížení hodnot generovaného proudu (pravděpodobně díky nízké vodivosti organických rozpouštědel), efekt zlepšení separace analytů se nedostavil. Navíc bylo pozorováno prodloužení analýzy, zřejmě z důvodu změny viskozity pufru (D.R. Baker 1995). Elektroferogram analýzy fluorescenčně značených zeatinových nukleotidů za optimálních podmínek je znázorněn níže (Obr. 14). Pozorovat lze úplnou separaci konjugátů fluorescenčního barviva BODIPY FL EDA s *cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfátem, respektive s *cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-trifosfátem. V případě *cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-difosfátu proběhla separace jen částečně.



**Obr. 14** – Analýza derivatizovaných zeatinových standardů za optimálních podmínek: základní elektrolyt 25mM TRIS, pH=8.0 s přidavkem SDS o koncentraci 60 mM, doba nástřiku do kapiláry 3 sekundy při tlaku 10 mbar, vkládané napětí 30 kV, generovaný proud 63  $\mu$ A. Analýza probíhala v křemenné kapiláře bez úpravy vnitřního povrchu o vnitřním průměru 75  $\mu$ m, efektivní délce 69.5 cm a celkové délce 78 cm.



Detekční limity pro BODIPY FL EDA-*cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfát, respektive BODIPY FL EDA-*cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-difosfát a BODIPY FL EDA-*cis*-/*trans*-zeatin ribosid-5'-trifosfát byly naměřeny  $1.8 \cdot 10^{-10}$  mol/l, respektive  $3.3 \cdot 10^{-10}$  mol/l a  $3.3 \cdot 10^{-10}$  mol/l (Tab. 2). Hodnoty separační účinnosti pro jednotlivé analyty se pohybují od  $0.35 \cdot 10^6$  do  $0.55 \cdot 10^6$  (Tab.2) a jsou zcela akceptovatelné. Rozlišení *cis*-/*trans*- izomerů je nejvyšší v případě trifosfátů (5.70) a nejnižší pro difosfáty (0.93) (Tab. 2).

**Tab. 2** – Hodnoty detekčních limitů, účinnosti a rozlišení pro jednotlivé analyty.

Analyt	LOD [mol/l]	účinnost <i>cis/trans</i>	rozlišení <i>cis/trans</i>
BODIPY FL EDA - <i>cis/trans</i> zeatin ribosid-5'-monofosfát	$1.8 \cdot 10^{-10}$	535918 / 539876	3.20
BODIPY FL EDA - <i>cis/trans</i> zeatin ribosid-5'-difosfát	$3.3 \cdot 10^{-10}$	477726 / 558171	0.93
BODIPY FL EDA - <i>cis/trans</i> zeatin ribosid-5'-trifosfát	$3.3 \cdot 10^{-10}$	320280 / 299785	5.70

## 2.3 Závěr

V rámci bakalářské práce byla vyvinuta metoda, pomocí které je možno na kapilární elektroforéze s laserem indukovaným fluorescenčním detektorem analyzovat derivatizované izomerní formy nukleotidů rostlinného hormonu zeatinu. Je známo, že biologická aktivita rostlinných hormonů je závislá na jejich chemické struktuře, můžeme tedy předpokládat, že jednotlivé izomerní formy fytohormonů nemusí vykazovat stejnou biologickou aktivitu. Na základě vyvinuté metody je možno určit poměr jednotlivých izomerních forem nukleotidů zeatinu ve vzorku a předpokládat tak reakci rostlinného organismu po jeho aplikaci. Je třeba podotknout, že metoda separace byla vyvíjená na uměle syntetizovaných zeatinových standardech, a proto je nutno brát v úvahu její omezené použití a nutnost další modifikace v případě vzorků pocházejících z rostlinného materiálu.

## SEZNAM ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
<i>AtIPT</i>	rodina genů izolovaná z <i>Arabidopsis thaliana</i> kodující tvorbu isopenenyl transferázy
ATP	adenosintrifosfát
BODIPY FL EDA	4,4-difluoro-5,7-dimethyl- 4-bora-3a,4a-diaza- s-indacene- 3-propionyl ethylenediamine
CEC	kapilární elektrochromatografie
CE-LIF	kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí
CE-UV	kapilární elektroforéza s detektorem v UV oblasti
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrické fokusování
CITP	kapilární izotachoforéza
CTAB	cetyltrimethylammoniumbromid
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZRDP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-difosfát
<i>cZRMP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>cZRTP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-trifosfát
ddATP	dideoxy adenosintrifosfát
DAD	detektor diodového pole
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DZ	dihydrozeatin
DZR	dihydrozeatin ribosid
DZRMP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát

EDC	1-ethyl-3-(3-N,N-dimethylaminopropyl)- karbodiimid
EOF	elektroosmotický tok
FA	kyselina mravenčí
GABA	kyselina $\gamma$ -amino máselná
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonová
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií
IAA	kyselina indolactová
IAC	imunoafinitní chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
iP	isopentenyladenin
iPR	isopentenyladenosin
iPRDP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPRMP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iPRTP	isopentenyladenosin-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferáza
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií
LOD	limit detekce
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
<i>o</i> TRMP	<i>ortho</i> -topolin ribosid-5'-monofosfát
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce na pevné fázi
TIC	celkový iontový proud
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan

tRNA	transferová ribonukleová kyselina
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>tZRDP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-difosfát
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>tZRTP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-trifosfát
UHPLC-MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s kombinovanou hmotnostní spektrometrií

## Seznam použité literatury

- Baker D.R. (1995) *Capillary electrophoresis*, pp. 1-55, A Wiley-Interscience Publication, New York, USA.
- Barták P., Ševčík J., Adam T., Friedecký D., Lemr K., Stránský Z. (1998) Study of cytokinin separation using capillary electrophoresis with cytodextrin additives. *Journal of Chromatography A* **818**, 231-238
- Béres T., Zatloukal M., Voller J., Niemann P., Gahsche Ch.M., Tarkowski P., Novák O., Hanuš J., Strnad M., Doležal K. (2010) Tandem mass spectrometry identification and LC-MS quantification of intact cytokinin nucleotides in K-562 human leukemia cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398**, 2071-2080.
- Béres T., Gemrotová M., Tarkowski P., Ganzera M., Maier V., Friedecký D., Dessoy A.M., Wessjohann L.A., Spíchal L., Strnad M., Doležal K. (2010) Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme *in vitro* reaction. *Analytica Chimica acta* **751**, 176-181.
- Bielecki R.L. (1964) Problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**, 431-442.
- Brüns M., Bazzanella A., Lochmann H., Bächmann K., Eberius-Ullrich C. (1997) Determination of indole-3-acetic acid in plant tissues by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **779**, 342-346.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.

- Burg S.P., Burg E.A. (1965) Ethylene Action and Ripening of Fruits – Ethylene influences growth and development of plants and is hormone which initiates fruit ripening. *Science* **148**, 1190–1196.
- Cornellius M., Wörth Ch., G., C., T., Kliem H., Ch., Wiessler M., Schmeiser H.H. (2005) Detection and separation of nucleoside-5'-monophosphates of DNA by conjugation with the fluorescent dye BODIPY and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **26**, 2591-2598.
- Coufal P. (2004) Kapilární elektromigrační metody. In: Štulík P., Bosáková Z., Coufal P., Jelínek I., Pacáková V., Ševčík J.: *Analytické separační metody*. Pp. 180-208. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, Česká republika.
- Crozier A., Moritz T. (1999) Physico-chemical methods of plant hormones analysis. In: Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Pp.23-56. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Davis P.J. (2010) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davis P.J.(ed): *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Pp. 1–15. Springer, New York, USA.
- Doškař J., Růžičková V., Pantůček R., Šmarda J. (2005) Purifikace a separace nukleových kyselin. In: Šmarda J., Doškař J., Pantůček J., Růžičková J., Kostíková J.: *Metody molekulární biologie*. Pp. 7–13. Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.
- Flescher E., Fingrut O. (2002) Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia* **16**, 608–616.
- Friedecký D., Tomková J., Maier V., Janošťáková A., Procházka M., Adam T. (2007) Capillary electrophoresis method for nucleotide analysis in cells: Application on inherited metabolic disorders. *Electrophoresis* **28**, 373-380.

- Ge. L., Yong J.W.H., Goh N.K., Chia L.S., Tan S.N., Ong E.S. (2005) Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **829**, 26-34.
- Heiger D. (2000) *High performance capillary electrophoresis*, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev I.P., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1152–1159.
- Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y. (2002) Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth & Differentiation* **13**, 19–26.
- Jelínek I. (2004) Hmotostní spektrometrie a její spojení s kolonovými separacemi. In: Štulík P., Bosáková Z., Coufal P., Jelínek I., Pacáková V., Ševčík J.: *Analytické separační metody*. Pp. 210-242. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, Česká republika.
- Kakimoto T. (2001) Identification of cytokinin biosynthesis enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Klouda P. (2003) *Moderní analytické metody*, pp. 33–37, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, Česká republika.
- Krais A.M., Cornelius M.G., Schnmeiser H.H. (2010) Genomic N<sup>6</sup>-methyladenine determination by MEKC with LIF. *Electrophoresis* **31**, 3548-3551.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi M., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.

- Liu X., Ma L., Lin Y.W., Lu Y.T.(2003) Determination of abscisic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **1021**, 209-213.
- Mallampati S., Van Aerschot A., Hoogmartens J., Van Schepdael A. (2007) Analysis of dideoxyadenosine triphosphate by CE with fluorescence detection. Derivatization through the phosphate group. *Electrophoresis* **28**, 3948-3956.
- Miller C.O., Skoog F., Vonsaltza M.H., Okumura F.S., Strong F.M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemistry Society* **77**, 1392.
- Musilová J., Sedláček V., Kučera I., Glatz Z. (2009) Capillary zone electrophoresis with field enhanced sample stacking as a tool for targeted metabolome analysis of adenine nucleotides and coenzymes in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of separation science* **32**, 2416-2420.
- 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.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkovská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480**, 207-218.
- Olsson J., Claesson K., Karlberg B., Nordström A. (1998) Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspatic acid in pea plant with capillary electrophoresis and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **824**, 231-239.
- Pacáková V., Štulík K., Vlasáková V., Březinová A. (1997) Capillary electrophoresis of cytokinins and cytokinin ribosides. *Journal of Chromatography A* **764**, 331-335.
- Pulkrábek J. (1988) Vliv cytokininů na množství a jakost sklizně cukrovky. *Listy cukrovarnické* **104**, 152–158.



- Ross H.H., De Ropp R.S. (1955) Formation of 6-furfurylaminopurine from DNA breakdown products. *Journal of the American Chemistry Society* **77**, 6400.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431–449.
- Sakakibara H. (2010) Cytokinins Biosynthesis and Metabolism. In: Davis P.J.(ed): *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*.Pp. 95–114. Springer, New York, USA.
- Schiewek R., Wirtz M., Thiemann M., Plitt K., Vogt G., Schmitz O.J. (2007) Determination of DNA methylation level of the marbled crayfish: An increase in sample throughput by an optimised sample preparation. *Journal of Chromatography B* **850**, 548-552.
- Schmitz O.J., Wörth Ch.C.T, Stach D., Weisler M. (2002) Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis. *Angewandte chemie-international edition* **41**, 445-448.
- Skoog D.A., Holler F.J., Norman T.A. (1998) Principles of instrumental analysis, pp. 778-797, Thomson Learning, London, United Kingdom.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy* **98**, 834–841.
- Taya Y., Tahala Y., Nishimura S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.
- Tsuda T., Takagi K., Watanabe T., Satake T. (1988) Separation of nucleotides in organs of guinea pig by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of high resolution chromatography* **11**, 721-723.

Voller J., Zatloukal M., Lenobel R., Doležal K., Béres T., Kryštof V., Spíchal L., Niemann P., Džubák P., Hajdúch M., Strnad M. (2010). Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study. *Phytochemistry* **71**, 1350-1359.

Zehnálek J. (2001) *Biochemie cvičení*, pp. 18-20, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, Česká republika.

Zinellu A., Pasciu V., Sotgia S., Scanu B., Berlinguer F., Leoni G., Succu S., Cossu I., Passino E.S., Naitana S., Deiana L., Carru C. (2010) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for ATP quantification in spermatozoa and oocytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398**, 2109-2116.