

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

a

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a
zemědělský výzkum



**Cytokininové nukleotidy a jejich izolace
z rostlinných pletiv**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Halenková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	5. 8. 2013

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

V Olomouci dne 5. 8. 2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a předané zkušenosti při tvorbě této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. a Bc. Janu Bučkovi za ochotu a provedení analýzy kapilární elektroforézou.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lucie Halenková
Název práce	Cytokininové nukleotidy a jejich izolace z rostlinných pletiv
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce je zaměřena na vypracování purifikačního protokolu s použitím extrakce na pevné fázi pro separaci cytokininových nukleotidů od sacharidů. Teoretická část je věnována cytokininům, jejich biologické aktivitě a metabolismu, dále pak separační metodě extrakce na pevné fázi, metodám analýzy cytokininů se zaměřením na kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu.</p> <p>V experimentální části je popsána purifikace pomocí extrakce na pevné fázi s použitím sorbentu diethylaminoethyl Sephadexu a elučního činidla 1M mravenčanu amonného. Ze získaných výsledků vyplývá, že zvolený purifikační krok je vhodný pro separaci cytokininových nukleotidů od sacharosy. Zatímco je takto sacharid kvantitativně odstraněn, návratnost nukleotidů se pohybuje kolem 80%. Použití 6% roztoku kyseliny mravenčí jako elučního činidla není vhodné, protože jeho eluční síla je nedostatečná.</p>
Klíčová slova	cytokininy, metabolismus cytokininů, extrakce na pevné fázi, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Lucie Halenková
Title	Cytokinin nucleotides and their isolation from plant tissues
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This bachelor thesis is focused on the development of the purification protocol using solid phase extraction for separation of cytokinin nucleotides from carbohydrates. The theoretical part is devoted to cytokinins, their biological activity and metabolism, as well as a separation methods, solid phase extraction, methods of final analysis with emphasis on liquid chromatography and capillary electrophoresis.</p> <p>The experimental part describes the cytokinin nucleotide purification by solid phase extraction using a sorbent diethylaminoethyl Sephadex and 1M ammonium formate as a eluent. The results show that the selected purification step is suitable for separation cytokinin nucleotides from sucrose. While sugars are removed quantitatively, a recovery of nucleotides is about 80%. Using 6% formic acid as the eluent is not suitable due to its low elution strength.</p>
Keywords	cytokinins, metabolism of cytokinins, solid phase extraction, liquid chromatography, capillary electrophoresis
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	- 7 -
Teoretická část	- 8 -
1. Úvod.....	- 9 -
2. Cytokininy.....	- 10 -
2. 1. Struktura cytokininů	- 11 -
3. Metabolismus cytokininů	- 13 -
3. 1. Biosyntéza cytokininů	- 13 -
3. 2. Inaktivace a degradace cytokininů	- 16 -
4. Analýza cytokininů.....	- 17 -
4. 1. Extrakce a čištění	- 18 -
4. 2. Metody.....	- 21 -
4. 2. 1. HPLC	- 21 -
4. 2. 1. 1. HPLC/ELSD.....	- 23 -
4. 2. 1. 2. HPLC/MS.....	- 23 -
4. 2. 2. GC/MS	- 25 -
4. 2. 3. Kapilární elektroforéza.....	- 26 -
4. 2. 4. Imunochemické metody.....	- 28 -
Experimentální část	- 29 -
5. Materiál a chemikálie.....	- 30 -
6. Metody	- 31 -
6. 1. Příprava standardních roztoků nukleotidů	- 31 -
6. 2. Příprava standardního roztoku sacharidu.....	- 31 -
6. 3. Optimalizace odezvy detektoru ELSD pro stanovení sacharidů	- 31 -
6. 4. Extrakce nukleotidů metodou SPE s použitím kolony CarboGraph.....	- 32 -
6. 5. Extrakce sacharidů metodou SPE se sorbentem DEAE Sephadex.....	- 32 -
6. 6. Extrakce nukleotidů metodou SPE se sorbentem DEAE Sephadex	- 33 -
6. 7. Extrakce <i>z</i> MMP a <i>z</i> TTP metodou SPE se sorbentem DEAE Sephadex	- 35 -
7. Výsledky a diskuse.....	- 35 -

7. 1. Optimalizace ELSD detektoru	- 36 -
7. 1. 1. Optimalizace průtoku plynu ELSD	- 36 -
7. 1. 2. Teplotní optimalizace ELSD	- 37 -
7. 2. Extrakce nukleotidů metodou SPE na kolonách Carbohydrate	- 37 -
7. 3. Extrakce sacharosy a nukleotidů s použitím SPE a sorbentem DEAE Sephadex	- 39 -
7. 3. 1. Extrakce sacharosy a analýza pomocí HPLC/ELSD	- 40 -
7. 3. 2. Extrakce nukleotidů a analýza pomocí UV/VIS Spektrofotometru	- 41 -
7. 3. 3. Extrakce a analýza nukleotidů kapilární elektroforézou	- 42 -
7. 3. 4. Extrakce tZMP, tZTP a jejich analýza pomocí HPLC-UV/VIS	- 44 -
Závěr	- 47 -
Seznam použitých zkratk	- 48 -
Seznam použité literatury	- 50 -

Cíle práce

- Cílem teoretické části bylo vypracovat rešerši s klíčovými slovy cytokininy, extrakce pevnou fází, metody analýzy cytokininů, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza.
- V experimentální části bylo mým úkolem vypracovat SPE metodu izolace cytokininových nukleotidů z rostlinných pletiv.

Teoretická část

1. Úvod

Již ke konci 19. století byly objeveny první látky schopné regulovat buněčný rostlinný růst. Jeden z prvních, kdo se zabýval výzkumem rostlinných hormonů, byl Charles Darwin, který položil základy koncepce těchto morfogenních látek, jež regulují růst již při nízkých koncentracích. Již tehdy vyřkl i německý botanik Julius von Sachs teorii o možné existenci chemických signálů, pomocí kterých mohou rostlinné orgány mezi sebou komunikovat. V dalších desetiletích pak byly chemicky identifikovány a nashromáždilo se mnoho informací o látkách, které regulují růstové a vývojové děje v rostlinách. Komplexně tyto látky nazýváme růstové regulátory, nicméně tento obecný název nerozlišuje látky přirozené od uměle připravených (Frébort *et al.*, 2011).

Prvním důkazem existence nízkomolekulárních látek regulujících rostlinný růst byl slavný experiment Fritze Wenta. Tak došlo v roce 1920 k vývoji prvního biotestu na rostlinné hormony. Test spočíval v tom, že položil na agarovou plotnu coleoptil po určitou dobu. Po přenosu tohoto bloku na seříznuté rostliny ovsa a splnění podmínky, že byla plotna kladena na jednu stranu pro přístup světla jen z určité strany, pozoroval zvýšený rostlinný růst a asymetrii. Stejným způsobem bylo zkoumáno hodně látek z různých zdrojů pro jejich podpůrnou aktivitu rostlinného růstu (Frébort *et al.*, 2011).

Po dlouhé práci, v roce 1955, byla izolována nová sloučenina, zvaná kinetin. Izolace byla provedena ze starší nebo autoklátované DNA sledího spermatu a telecího brzlíku. Název kinetin byl vybrán z toho důvodu, že je to látka podporující buněčné dělení - cytokinezi. Ukázalo se, že se jedná o derivát adenin (6-aminopurin), 6-furfurylaminopurin. Kinetin není přirozený regulátor rostlinného růstu. Nevyskytuje se volně jako báze v DNA v žádném rostlinném druhu. Je produktem tepelně indukované degradace DNA, přičemž je deoxyribosa adenosinu převedena na furfurylový kruh a posunuta z deváté pozice adeninového kruhu na šestou. Objev kinetinu byl důležitý, protože se díky tomu prokázalo, že buněčné dělení může být způsobeno jednoduchými chemickými látkami (Miler *et al.* 1995). Několik let po objevu kinetinu bylo zjištěno, že v extraktu nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*) je obsažena látka, která má stejné biologické účinky jako kinetin. Tato látka (rostlinný hormon) měla společně s auxinem stimulovat zralé rostlinné buňky k buněčnému dělení (Heldt, 2005).

Jak tedy bylo zjištěno, rostlinné hormony (fytohormony) jsou nízkomolekulární látky organického původu, které si rostlina dokáže sama syntetizovat. Na rozdíl od ostatních sloučenin se v rostlinách vyskytují jen ve velmi nízkých koncentracích a při nich i působí. I při těchto nízkých koncentracích se ale zásadně podílejí na regulaci různých růstových a vývojových procesech a nedochází ke změně jejich chemické

struktury. Ve srovnání s fytohormony například cukry působí při koncentracích až milionkrát vyšších a přesto s méně obecnými účinky (Luštinec a Žárský, 2005).

Rostlinné hormony mají hlavní roli v komunikaci mezi buňkami, pletivy a orgány v průběhu celého životního cyklu rostlin. Neúčastní se jednotlivých dějů samostatně, ale často ve spolupráci s jinými hormony a jejich účinky bývají synergické i antagonické. Jejich působení se týká i jiných procesů, než jen růstu a vývoje. Jsou to přírodní látky a mezi růstové regulátory patří jak růstově účinné látky přírodní, tak i jejich synteticky připravená analoga (Luštinec a Žárský, 2005).

Dnes je známo 5 základních skupin fytohormonů a další látky s regulační aktivitou fytohormonům podobné, nicméně jejich působení se projevuje až při zvýšených koncentracích a jejich oblasti působení jsou méně obecné. Mezi základní skupiny fytohormonů řadíme cytokininy, auxiny, gibbereliny, kyselinu abscisovou a etylen. Mezi látky jim podobné patří brassinosteroidy, jasmonáty, polyaminy, oligosachariny a velká skupina fenolických látek (Procházka *et al.*, 1998).

2. Cytokininy

Cytokininy jsou skupinou rostlinných hormonů, které jsou definované jako přírodní látky schopné regulovat buněčné dělení, vývoj rostlin a účastní se mnoha fyziologických procesů v rostlině. Obvykle zralé rostlinné buňky zastavují buněčné dělení, ale přidáním cytokininu a auxinu dochází k indukci diferenciovaných buněk a opětovnému dělení (Heldt, 2005). Letham izoloval tuto látku, identifikoval ji jako trans-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino) purin a nazval zeatin podle jeho prvního objevu v kukuřici (*Zea mays*). Jedná se o první identifikovaný přirozený cytokinin (Letham, 1963).

Ačkoli byl kinetin identifikovaný jako první cytokinin, trvalo více než 40 let, než byl nalezen v rostlinném materiálu jako například v dužině kokosového ořechu (Barciszewski *et al.* 1996) nebo v čerstvém kokosovém mléce (Ge *et al.*, 2005). Na proti tomu, deriváty benzyladeninu už byly nalezeny v přírodě, a to v listech topolu, v 70. letech 20. století (Horgan *et al.*, 1973).

Cytokininy byly tedy definované jako látky podporující buněčné dělení a regulují růst rostlin stejným způsobem, jako kinetin. Dnes ale tento termín označuje všechny molekuly s podobnou strukturou bez ohledu na to, jaká je jejich aktivita (Frébort *et al.*, 2011).

Cytokininy jsou schopné regulace již za nízkých koncentrací a v mnoha případech jsou i schopné přemístit se v rámci rostlinného těla (Frébort *et al.*, 2011).

Jsou to nízkomolekulární látky, které se zásadním způsobem podílejí na regulaci růstu, vývoji rostlin, morfogenezi a hrají nezastupitelnou roli v komunikaci mezi buňkami, pletivou a orgány v průběhu celého životního cyklu rostlin. Je možné je označit za integrátory vnějších a vnitřních signálů. Jednotlivé hormony neregulují vývojové procesy samostatně, ale velmi často společně s dalšími hormony, přičemž účinky bývají jak synergické, tak antagonické. Vedle fytohormonů se v rostlinách vyskytují i jiné látky s růstově regulační aktivitou a od fytohormonů se liší zejména vyššími koncentracemi a méně obecnými účinky (Podlešáková *et al.*, 2012).

2. 1. Struktura cytokininů

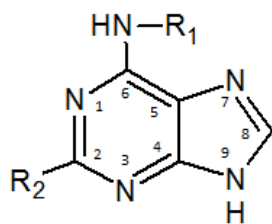
Po chemické stránce jsou cytokininy N^6 substituované deriváty adeninu. Tyto deriváty rozlišujeme v závislosti na substituovaném postranním řetězci v pozici N^6 na isoprenoidní a aromatické (Tab. 1). Mezi isoprenoidní cytokininy patří například isopentenyladenin (iP), jehož postranní řetězec [N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin] může být hydroxylovaný buď v *cis*- nebo *trans*- poloze, kdy se tvoří příslušný zeatin. Dvojná vazba zeatinu je redukována na dihydrozeatin [N^6 -(4-hydroxy-3-methylbutyl)adenin] a tento redukovaný ekvivalent isopentenyladeninu byl identifikován hlavně v apikálních pupenech a dormantních semenech rostlin. Isoprenoidní cytokininy jsou v přírodě velmi rozšířené na rozdíl od aromatických cytokininů, které byly považovány dlouhou dobu výhradně za syntetické (Frébert *et al.*, 2011).

Příkladem aromatického cytokininu je například benzyladenin (6-benzylaminopurin, BA). Podle jeho původu nálezu v listech topolu, jak již bylo zmíněno, dostaly deriváty benzyladeninu české označení topoliny (Strnad, 1997). Tyto látky byly později identifikovány i v jiných rostlinných druzích jako například v *Arabidopsis* (Tarkowská *et al.*, 2003) a hrachu (Gaudinová *et al.*, 2005).

Cytokininy se v rostlinných pletivech vyskytují jako volné báze, nukleosidy, nukleotidy a cukerné konjugáty, substituované v poloze N^7 a N^9 purinového kruhu (7N-, 9N-glykosidy) nebo s hydroxylovaným postranním řetězcem (O-glukosidy a O-xylosidy).

Cytokininová aktivita je také pozorována v některých syntetických derivátech fenylničoviny, které vykazují cytokininovou aktivitu, ale nebyly identifikovány v rostlinných pletivech, a tudíž se nejedná a přirozeně se vyskytující cytokininy (Sakakibara, 2006).

Tab. 1: Příklady strukturních vzorců vybraných cytokininů. Převzato z Tarkowski, 2011.



R ₁	R ₂	Název cytokininu	Zkratka
	H	Isopentenyladenin	iP
	H	<i>trans</i> -zeatin	<i>tZ</i>
	H	<i>cis</i> -zeatin	<i>cZ</i>
	H	Dihydrozeatin	DHZ
	CH ₃ -S-	2-methylthio-isopentenyladenin	2MeiP
	CH ₃ -S-	2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin	Me <i>tZ</i>
	CH ₃ -S-	2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin	2MeScZ
	H	Benzyladenin	BA
	H	<i>ortho</i> -topolin	<i>oT</i>
	H	<i>meta</i> -topolin	<i>mT</i>

3. Metabolismus cytokininů

3. 1. Biosyntéza cytokininů

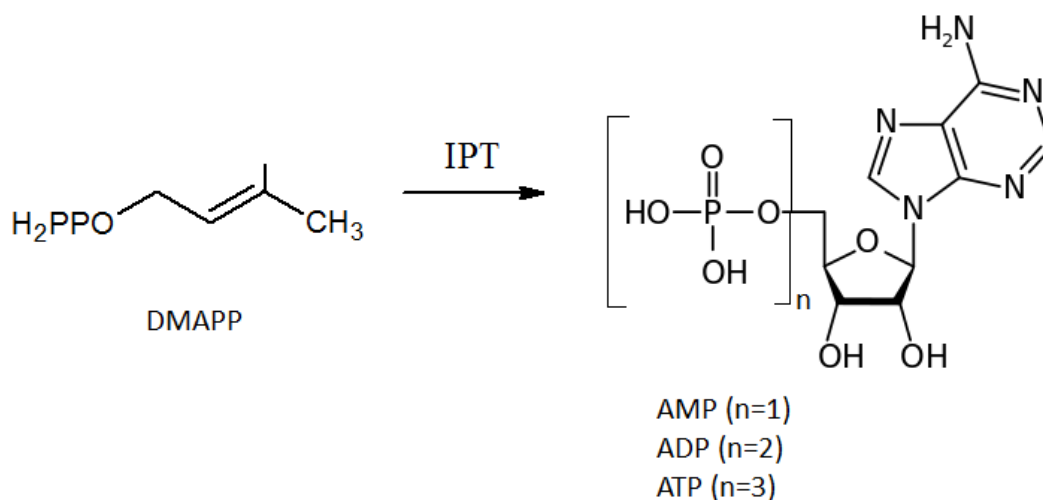
Přítomnost jednotlivých cytokininů se značně liší v různých částech rostlin. Hladiny cytokininů jsou odlišné jak v jednotlivých orgánech, tak i v průběhu ontogenetického vývoje rostliny. Obsah cytokininů je ovlivňován zejména minerální výživou. Zvýšené hladiny cytokininů se nachází v prolifерujících pletivech, např. ve vrcholcích stonků, mladých listech, nezralých semenech a kořenových špičkách (Takei *et al.*, 2002).

Prvním krokem biosyntézy cytokininů je *N*-prenylace (isopentenylace) exocyklické aminoskupiny adeninového skeletu na N^6 - pozici (Obr. 1). Klíčovými enzymy, jež katalyzují tyto reakce, jsou isopentenyltransferasy (IPT). Tyto isopentenyltransferasy dělíme na základě substrátové specifčnosti na adenylátové IPT (EC 2.5.1.27), které se účastní *N*-prenylace adenosin-5'-fosfátu (AMP, ADP nebo ATP) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001) a dále na tRNA IPT (EC 2.5.1.8), které umožňují prenylaci adeninu v tRNA (Morris *et al.*, 1993). Substráty, které slouží jako donory postranního isoprenoidního řetězce, známe dva. Prvním je dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP), kdy produkty této reakce jsou isopentenyadenosin-5'-fosfáty (iPMP, iPDP, iPTP) (Kakimoto, 2003). Druhým je (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP) a produktem reakce je *trans*-zeatin (Krall *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2005).

Poprvé byla biosyntetická aktivita cytokininů zaznamenána *in vitro* ve vzorku pocházejícího ze slizu hlenky *Dictyostelium discoideum*, kde je tato aktivita důležitá pro produkci discadeninu, který funguje jako inhibitor klíčení výtrusů. V tomto procesu dochází k přenosu isoprenoidního řetězce z DMAPP na AMP a vzniku příslušného isopentenyadenosin-5'-monofosfátu (iPMP). Další substráty (ADP, ATP, cAMP) nebyly vhodnými akceptory isoprenoidního řetězce (Taya *et al.*, 1978). O pár let později byla identifikována IPT v patogenní bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, která obsahuje v T-DNA na Ti-plasmidu gen *Tmr*, jež má schopnost produkovat cytokininy. Tato bakterie má schopnost infikovat rostliny za tvorby nádorů takovým způsobem, že se Ti-plasmid zabudovává do genomu rostliny. V případě *Escherichia coli* bylo zjištěno, že po expresi genu *Tmr* do bakterie dochází ke kódování IPT a poté k produkci isopentenyadenosin-5'-monofosfátu (iPMP) přenosem isoprenoidního postranního řetězce z DMAPP na AMP stejně jako u *D. discoideum*. Na druhé straně, v případě *Arabidopsis thaliana* bylo v dalších studiích prokázáno, že u rostlin IPT využívají jako akceptory ATP či ADP

a jako donor isoprenylové skupiny je opět využíván DMAPP (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001).

V genomu vyšších rostlin bylo do této doby nalezeno a identifikováno několik genových rodin IPT. Sedm genových rodin v rýži, také sedm u *Arabidopsis* (AtIPT1, AtIPT3 až AtIPT8) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001) a v kukuřici devět genových rodin IPT (Brugiére *et al.*, 2008; Vyroubalová *et al.*, 2009).



Obr. 1 : Schéma prenylace AMP, ADP či ATP za katalýzy IPT.

Pro cytokininy *trans*-zeatinového typu (tZ) byly navrženy dvě možné biosyntetické dráhy vzniku. První dráha je založena na přítomnosti isopentenyladeninu, kde je nejdříve produkován isopentenyladeninový nukleotid (iP-nukleotid) a později hydroxylovaný monooxygenasou cytochromem P450, kdy vznikají právě *trans*-zeatinové nukleotidy (Takei *et al.*, 2004). Druhý způsob vzniku tZ cytokininů je nezávislý na přítomnosti iP-nukleotidu, kde je *trans*-zeatinový nukleotid produkován přímo přenosem hydroxylovaného postranního řetězce z navrženého prekurzoru HMBDP na adeninový kruh (Sakakibara *et al.*, 2005). Který způsob vzniku tZ-nukleotidů je více významný závisí na původu donorů isoprenoidního řetězce (Frébort *et al.*, 2011). V rostlinách jsou možné dva způsoby vzniku prekurzorů DMAPP a HMBDP. Prvním způsobem je mevalonátová dráha (MVA), která je aktivní i u zvířat, hub, archeí a některých bakterií. Je lokalizovaná v cytosolu a mitochondriích. Produktem mnoha reakcí je DMAPP, který slouží právě jako prekurzor pro syntézu cytokininů. Druhým způsobem vzniku prekurzorů je methylethritol-fosfátová dráha, která je lokalizována v plastidech a výsledkem sledu reakcí je HMBDP. Tento produkt je možné dále redukovat na DMAPP. Z toho vyplývá, že tímto způsobem je možné získat jak HMBDP, tak i DMAPP a obě látky mohou být prekurzory cytokininů. Hladina HMBDP je ovšem v plastidech asi 5x vyšší než DMAPP (Sakakibara *et al.*, 2005). Pro vznik cytokininů

cis-zeatinového typu v rostlinách dosud nebyl nalezen žádný isoprenoidní prekurzor, jež obsahuje hydroxylovou skupinu v požadované pozici *cis* (Frébort *et al.*, 2011). Předmětem zkoumání je možnost vzniku cZ degradací prenylované tRNA za účasti enzymů tRNA-isopentenyltransferas, jež katalyzují prenylaci tRNA (Golovko *et al.*, 2002).

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány první rostlinné IPT, když byla zkompletována sekvence prvního rostlinného genomu této rostliny. AtIPT byly identifikovány pomocí vyhledávání BLAST proti bakteriálním IPT genům a bylo zjištěno, že genom *A. thaliana* obsahuje devět genů (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001). Sedm již zmíněných AtIPT a dvě tRNA-isopentenyltransferasy (AtIPT2 a AtIPT9). Aktivita AtIPT9 doposud nebyla detekována, ale AtIPT2 byla potvrzena jako tRNA IPT (Golovko *et al.*, 2002). Enzymy IPT jsou rozmístěny v různých částech rostliny. V plastidech buněk listů byl potvrzen výskyt AtIPT1, AtIPT3 a AtIPT5 pomocí metody fúze se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Stejně tak byl stanoven AtIPT8 v buňkách kořene. Oproti tomu AtIPT4 a tRNA AtIPT2 byly identifikovány v cytosolu a AtIPT7 byl nalezen v mitochondriích. Lokalizace těchto IPT nám poskytují informaci o tom, jaká dráha a jaký prekurzor je využit na syntézu cytokininů. U enzymů AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5 a AtIPT8 se získává prekurzor HMBDP pro syntézu cytokininů z MEP dráhy. Naopak u AtIPT4, AtIPT7 a tRNA AtIPT2 naznačuje lokalizace použití DMAPP z MVA dráhy (Kasahara *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že se jednotlivé enzymy vyskytují v různých buněčných kompartmentech a v odlišných částech rostliny, lze vyloučit dříve uváděné hypotézy, že se cytokininy produkují pouze v kořenech a jsou do nadzemní části transportovány (Miyawaki *et al.*, 2004; Nordstrom *et al.*, 2004). Dále bylo také zjištěno, že exprese IPT a produkce cytokininů u *A. thaliana* je ovlivňována jednak hladinou auxinů, dále amoniakem, nitráty a dalšími živinami jako např. sulfáty, fosfáty a železem (Miyawaki *et al.*, 2004; Nordstrom *et al.*, 2004; Hirose *et al.*, 2008).

Dalším krokem biosyntézy je přeměna cytokininových nukleotidů na aktivní volné báze. Syntézou *de novo* dochází ke vzniku málo aktivních nukleotidů (mono-, di- nebo trifosfáty či nukleotid monofosfáty z tRNA) a poté jejich aktivaci. Tato reakce je katalyzována enzymem specifickým vůči cytokininům s názvem Lonely guy (LOG). Jde o látku ribosid-5'-monofosfát fosforibohydrolasu, která je schopná štěpit cytokinin ribosid-5'-monofosfát za vzniku ribosy-5'-monofosfátu a aktivních cytokininových volných bazí (Kurakawa *et al.*, 2007).

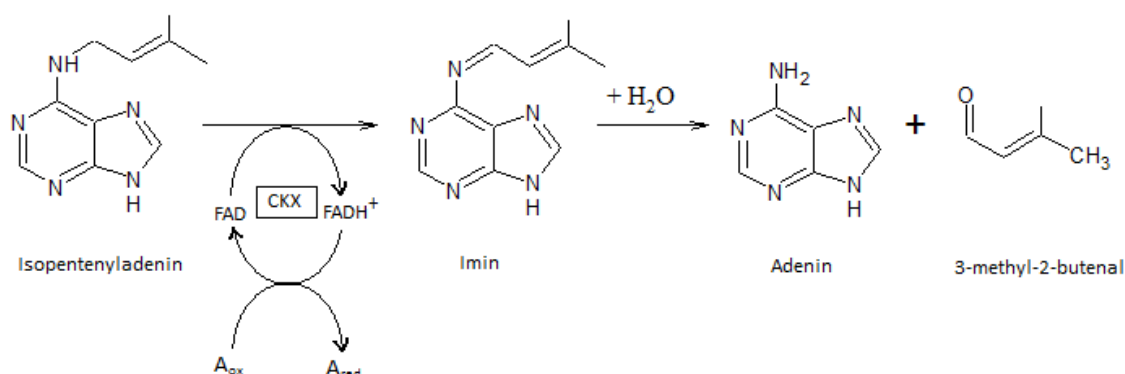
3. 2. Inaktivace a degradace cytokininů

Hladina biologicky aktivních cytokininů musí být přesně hlídána. Jedním způsobem regulace aktivních cytokininů v rostlinných pletivech je jejich inaktivace. Nejvíce biologicky aktivními formami cytokininů jsou volné báze a proti nim vykazují nízkou biologickou aktivitu cytokininové ribosidy. Inaktivací může být nevratné odštěpení postranního řetězce nebo mohou být cytokininové glukosylovány na pozici N^7 a N^8 . Tyto N^7 a N^8 glukosidy jsou neaktivní. Enzymem katalyzujícím produkci cytokininového N^7 a N^8 - glykosidu je *N*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.118). U *Arabidopsis* byly identifikovány dva geny kódující enzym *N*-glukosyltransferasu, která má schopnost přenášet glukosylový zbytek z uridinu 5'-difosfoglukosy na N^7 a N^8 atomy isoprenoidních i aromatických cytokininů (Hou *et al.*, 2004). Dalším možným způsobem modifikace je O-glykosilace hydroxylů na postranním řetězci a enzymem katalyzujícím tuhle reakci je glykosyltransferasa (Frébort *et al.*, 2011). Produkty reakce jsou O-glykosylované cytokininové ribosidy, které mohou být dále štěpeny enzymem β -glukosidasou (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Dalším velice důležitým procesem při regulaci hladiny aktivních cytokininů je jejich nevratná degradace. Nevratná degradace spočívá v oxidativním štěpení N^8 postranního řetězce, které je katalyzované enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX, EC 1.5.99.12). Produktem štěpení je adenin (popř. příslušný N^8 substituovaný derivát cytokininu) a aldehyd postranního řetězce (Obr. 2). CKX jsou enzymy patřící do skupiny oxidoreduktas, jež obsahují FAD a vyskytují se ve více isoformách (Schmülling *et al.*, 2003). Cytokininový degradační enzym se původně označoval jako cytokinin oxidasa, ale bylo naznačeno, že reakce může být řízena mechanismem dehydrogenace. Několik studií ukázalo, že jiné redox-aktivní sloučeniny jsou mnohem efektivnějšími akceptory elektronů než kyslík a enzym byl tedy přejmenován na cytokinin dehydrogenasu (Morris *et al.*, 1999; Galuszka *et al.*, 2001).

V genomu *Arabidopsis* bylo doposud identifikováno 7 genů kódujících CKX (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003), v genomu rýže 11 genů (Ashikari *et al.*, 2005) a v kukuřici je dodnes identifikováno 13 genů kódujících CKX (Massonneau *et al.*, 2004; Šmehilová *et al.*, 2009).

V kukuřici byla izolována sloučenina, 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin (DIMBOA), která po oxidativním štěpení za katalýzy laccasy či peroxidasy zvyšuje degradační aktivitu CKX. DIMBOA je štěpením přeměněna na 4-nitrosoresorcinol-1-monomethyl ether (coniferron), který slouží jako slabý akceptor elektronů. Oxidací DIMBOA a coniferronu vznikají přechodné volné radikály, které jsou použity cytokinin dehydrogenasou jako efektivní elektronové akceptory (Frébortová *et al.*, 2010).



Obr. 2: Reakční schéma katalytické degradace isopentenyladeninu za katalýzy CKX. Upraveno podle Frébortová et al., 2004.

4. Analýza cytokininů

Rostlinné pletivo obsahuje velké množství nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek, které se liší svým zastoupením v rostlině i v jednotkách řádů. Cytokinininy jsou skupinou rostlinných hormonů, které v závislosti na struktuře jednotlivých cytokininových derivátů a množství obsaženém v rostlinném těle, velkou měrou ovlivňují růst a vývoj rostlin. Až na pár výjimek se v rostlinách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (fmol - pmol/g čerstvé hmoty) a vzhledem k přítomnosti velkého množství látek s podobnou strukturou či fyzikálně-chemickými vlastnostmi je analýza značně komplikovaná (Nordström *et al.*, 2004). Ani samotná skupina cytokininů neobsahuje látky stejných fyzikálně-chemických vlastností, a není tak možné analyzovat všechny formy najednou. Jedná se o různé konjugáty se sacharidy nebo aminokyselinami, také o isomery s různou biologickou aktivitou, které je nutné rozlišit. Obtíže při analýze cytokininů v rostlinném extraktu jsou tedy spojené s tím, že je třeba odlišit zkoumanou látku od velkého množství interferujících látek. Tudíž pro správnou a citlivou kvalitativní a kvantitativní analýzu je důležitá správná volba analytické metody, efektivního čistícího procesu a v neposlední řadě volba citlivé a dostatečně selektivní analytické koncovky. Nároky na analytické koncovky se samozřejmě liší dle potřeby a metody studia. V některých případech je třeba z důvodu malého množství vzorku zvolit vysoce selektivní a citlivou metodu a naopak v případě jiné analýzy může postačit metoda méně citlivá a průměrně selektivní se zjednodušeným postupem čištění, a tak i úsporou času a materiálu. Takové analýzy jsou schopné nám podat informace nejen o

obsahu analytu, strukturu dané látky, ale také umí odlišit od sebe metabolity podobných vlastností (Tarkowski *et al.*, 2004).

4. 1. Extrakce a čištění

Příprava vzorku je klíčovým krokem v každé moderní chemické analýze, zejména pak pro vzorky, kde se látky nachází ve stopovém nebo ultra stopovém množství. Postupy používané pro extrakci cytokininů a přípravy vzorků jsou proto nejdůležitějšími kroky v celém analytickém procesu.

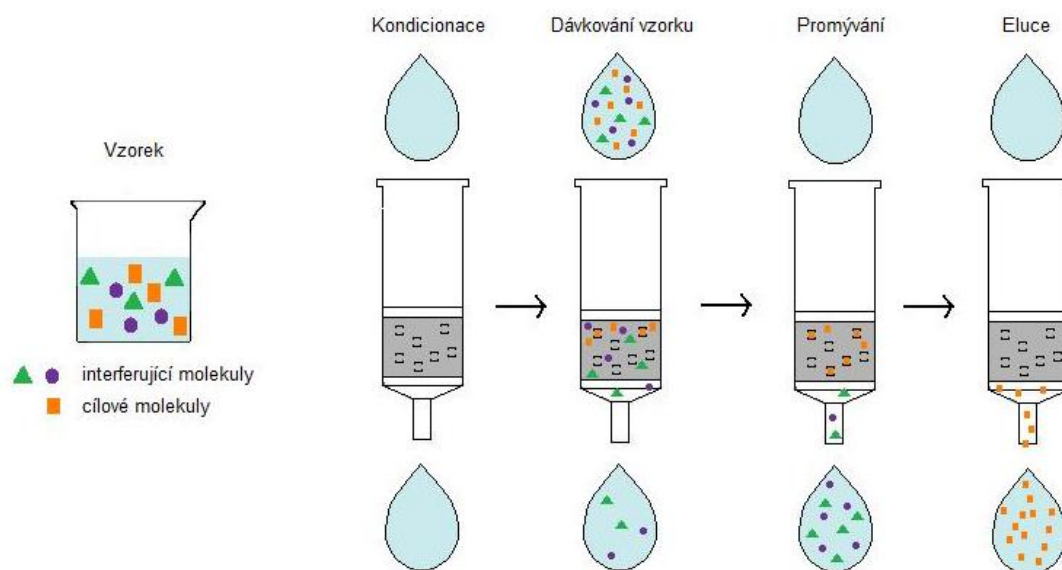
Podstatou extrakčních procesů je převedení zkoumaných látek do extrakčního činidla, aniž by v průběhu procesu došlo k degradaci látek. Vzhledem k tomu, že cytokininy jsou látky odvozené od adeninu a v N^6 poloze mají substituovaný postranní řetězec (isoprenoidní nebo aromatický), mají na rozdíl od adeninu hydrofobní charakter. Cytokininy ovšem nejsou jen volné báze, ale je to skupina širokého spektra metabolitů s odlišnými vlastnostmi. Abychom extrahovali současně všechny cytokininové deriváty - silně polární cytokininové nukleotidy, hydrofobní volné báze, *N*-glukosidy, *O*-glukosidy a ribosidy, musíme zvolit správné extrakční činidlo.

Při provádění extrakce se také musí dbát na to, aby se zabránilo enzymatické degradaci cytokininů, což může nastat při kontaktu cytokininů s enzymy v rostlinném materiálu. Nastala by například přeměna cytokininových nukleotidů na ribosidy nebo jiné formy a také by mohlo dojít k přeměně struktury až na látky odlišné od cytokininů. Tudíž by se měl rostlinný materiál po sklizení okamžitě zmrazit nebo extrahovat správným extrakčním činidlem. Enzymy, jež jsou schopny degradovat cytokininové nukleotidy až na ribosidy prostřednictvím procesu defosforylace, se nazývají fosfatasy. Právě této degradaci se musí při extrakci zabránit. Extrakce cytokininů se provádí za snížené teploty, obvykle v rozmezí 4°C až -20°C a to právě z toho důvodu, že se sníží riziko degradace. Nejčastěji používanými extrakčními rozpouštědly se staly methanol, ethanol, aceton či kyselina chloristá (Hoyerová *et al.*, 2006). Ze skupiny více složkových soustav se nejpoužívanější extrakční směsí stala směs podle Bielekého. Jde o směs methanol/chloroform/voda/kyselina mravenčí (12:5:2:1, v/v/v/v), která je schopna inaktivovat rostlinné fosfatasy v rostlinném materiálu (Bielecki, 1964). Později se zjistilo, že přítomností chloroformu ve směsi dochází k extrakci vyššího množství lipofilních látek, což má za následek horší purifikaci. Směs Bielekého byla tedy pozměněna odstraněním chloroformu ze směsi. Tato optimalizovaná směs ve složení methanol/voda/kyselina mravenčí (15/4/1, v/v/v) byla porovnána s původním rozpouštědlem Bielekého a 80% methanolem (v/v) za účelem porovnat jejich

extrakční účinnost. Zjistilo se, že optimalizovaná směs Bieleského (bez chloroformu) je schopna dostatečně potlačit defosforylaci cytokininových nukleotidů, a tudíž zabránit jejich degradaci. Také snižuje extrakci lipofilních látek (Hoyerová *et al.*, 2006).

Následné čistící procesy by se měly odvíjet podle typu analytické koncovky. Ty se totiž v závislosti na různé finální analýze od sebe liší. Pro všechny procesy je ale společné splnění několika parametrů. A to proto, abychom byly schopni dosáhnout eliminace všech ostatních látek z původního materiálu - peptidy, aminokyseliny, cukry, sekundární metabolity a další. Poté by měl purifikovaný materiál obsahovat pouze cytokininy a sloučeniny, které nebudou rušit finální analýzu. První z požadavků je rozdělení cytokininových metabolitů do několika frakcí, a to na O-glukosidy, nukleotidy a frakci společnou pro volné báze, N-glukosidy a ribosidy. Tohle rozdělení se provádí proto, že pro všechny tyto látky dohromady neexistuje společná analytická koncovka. Dalším požadavkem je dostatečný stupeň přečištění a návratnost analytů. Důraz je potřeba klást i na hodnoty pH při jednotlivých krocích z důvodu možných změn vlastností analytů. Jednou z možných účinných metod je extrakce kapalina - kapalina. Jedná se o metodu levnou a rychlou, která je založena na různé rozpustnosti cytokininů ve vodě a organickém rozpouštědle butanolu při různém pH. S vysokou návratností a dostatečného stupně přečištění jsme schopni oddělit od sebe báze, nukleotidy, všechny ostatní nežádoucí látky a nedochází k degradaci nukleotidů či přeměně na látky odlišných chemických struktur (Pacáková *et al.*, 1997).

Ovšem v dnešní době často používaná metoda je extrakce pevnou fází (SPE= *solid phase extraction*). Jedná se o metodu, jež se stala široce používanou pro purifikaci, extrakci a izolaci mnoha sloučenin a nahradila některé předchozí složitější postupy (Ge *et al.*, 2004). V případě, kdy ostatní extrakční techniky selžou, je i tak u metody SPE při použití vhodného rozpouštědla, typu pevné fáze a postupu jednou z výhod podstatně vyšší extrakční návratnost. Principem metody je zachytávání molekul na pevném povrchu sorbentu, kdy se na základě různé afinity složek směsi k pevné fázi tyto složky na koloně rozdělí. Látka s vyšší afinitou vůči sorbentu se koncentruje a zůstává na jeho povrchu, zatímco látka s nižší afinitou se nezadržuje a protéká kolonou. Látka zachycená na sorbentu je poté vymyta vhodným elučním roztokem. Extrakce může být provedena i obráceně, kdy jsou balastní látky zachyceny na koloně a zkoumaný analyt kolonou prochází (Obr. 3).



Obr. 3: Schéma extrakce na pevné fázi (SPE).

Pro zakoncentrování a separaci analytů využíváme i iontoměniče s úlohou vyměňovat anionty. Jedná se například o DEAE-Sephadex nebo DEAE-celulosu. Podstatou metody je separace cytokininových nukleotidů, cukerných konjugátů a bazí, kdy dochází k navázání cytokininových nukleotidů na sorbent a vymytí zbylých látek ven z kolony (Prinsen *et al.*, 1995).

Zakoncentrování nepolárních cytokininů může být obvykle dosaženo použitím SPE s C_{18} kolonou. Efektivnější separace cytokininů bylo ale dosaženo použitím metody mixed-mode SPE v systému obrácených fází společně s iontovou výměnou. Takto dochází k lepšímu přečištění, a tudíž i separaci cytokininů od dalších rostlinných hormonů. Tímto způsobem dochází ke zjednodušení purifikace a vzhledem k získaným vlastnostem tohoto sorbentu i k separaci většího množství cytokininových metabolitů, a tudíž i vyšší výtěžnosti. Rychlá a jednoduchá metoda pro separaci a purifikaci cytokininů od auxinu a kyseliny abscisové je založena na aplikaci kyselého rostlinného extraktu na MCX kolonu s charakterem reverzní fáze a funkcí katexu. Tyto vlastnosti sorbentu umožňují postupnou eluci auxinu, kyseliny abscisové a následně separaci cytokininových nukleotidů od cytokininových bazí, ribosidů a glukosidů (Dobrev a Kamínek., 2002).

Další vhodnou purifikační metodou je imunoafinitní chromatografie. Tato metoda bývá používána jako poslední čistící proces. Je to velmi významná vysoce selektivní metoda, jež odděluje cytokininy od velkého množství, až téměř všech nečistot. Je založena na interakci protilátka - antigen (Ab - Ag), která zvyšuje selektivitu, a tím výrazně zvyšuje mez detekce stopových analýz. Když je tedy jako

purifikační krok před finální analýzou použít imunoafinitní přístup, lze získat cytokininy ve vysoké čistotě a jen ve stopovém množství ostatní UV-absorbující látky. Imunoafinitní kolony čistí analyt dle strukturních podobností a imunoextrakce je více selektivní než konvenční metoda SPE, ale méně výkonná (Hauserová *et al.*, 2005).

Po správném zvolení separační metody a čistícího procesu jsou z rostlinného materiálu odstraněny všechny nečistoty a látky, které by mohly rušit finální analýzu. Cytokininové metabolity jsou separovány do požadovaných frakcí a přečištěny na dostatečný stupeň čistoty. Dalším krokem je výběr analytické koncovky, pomocí níž jsme schopni cytokininy stanovit jak kvalitativně, tak i kvantitativně.

4. 2. Metody

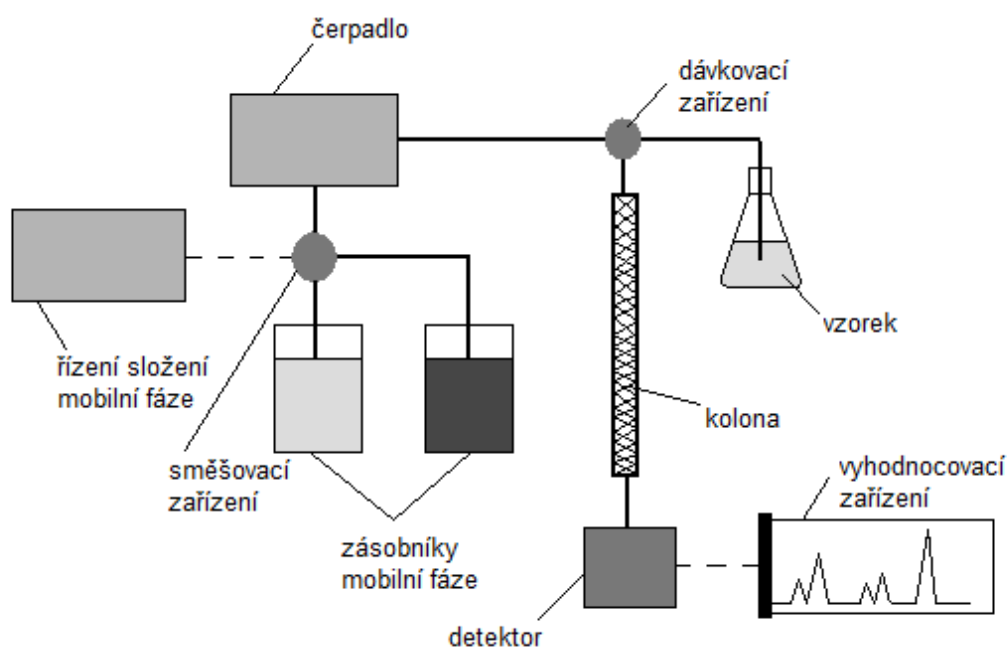
4. 2. 1. HPLC

Jednou z prvních chromatografických metod byla k separaci cytokininů použita tenkovrstvá papírová kapalinová chromatografie. Jedná se o relativně jednoduchou, rychlou a levnou metodu, mezi složitějšími metodami dnešní doby. Používá se v procesech, kde není třeba vysoké účinnosti separace a vysoké citlivosti (Hewett, 1973).

Oproti tomu se díky své separační účinnosti, rychlosti a velké výhodě spojení s různými detektory, stala metoda HPLC (High-performance liquid chromatography) nejpoužívanější technikou kvalitativní a kvantitativní analýzy cytokininů. Tato metoda pracuje na principu separace analytu mezi mobilní (kapalnou) fází a stacionární (pevnou) fází, kdy se během separace analyt rozděluje právě mezi tyto dvě fáze. Rozhodující je tedy při separaci nejen interakce složek vzorku se stacionární fází, ale také výběr použité mobilní fáze. Čas, který stráví analyt v jednotlivých fázích, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Probíhá zde několik mechanismů separace, a to například adsorpce, iontová výměna, molekulově síťový efekt či rozdělování na základě různé rozpustnosti. K separaci složek dochází v náplňové koloně s definovanou délkou, vnitřním průměrem a náplní. Kapalina se do kolony čerpá pístovými, membránovými čerpadly nebo čerpadlem na principu injekční stříkačky naplněné mobilní fází. Složení mobilní fáze může být stálé (izokratická eluce) nebo se může během separace měnit (gradientová eluce), k čemuž je zapotřebí směšovací zařízení a zásobníky různých mobilních fází. Vzorek je dávkován injekčním zařízením (Obr. 4). Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a není potřeba termostatování (Klouda, 2003).

Výhodou HPLC je spojení s více koncovkami a to zejména s hmotnostní spektrometrií (MS), enzymovou imunoanalýzou, radioimunoanalýzou nebo UV-spektrometrií. Takto je možné účinně analyzovat rostlinný extrakt a analýza nám může poskytnout spolehlivou identifikaci cytokininů. Pro spolehlivou analýzu je ovšem nutné splnění důležitých zásad a při nedokonalé separaci se mohou ve směsi nacházet *cis/trans* izomery derivátů zeatinu či glukosidy cytokininů, a to může způsobit nepřesné stanovení. Většinou se tedy separace provádí v systému reverzních fází (RP) na základě rozdílné polariry cytokininů.

Bylo zjištěno, že pomocí RP-HPLC s detekcí MS jsme schopni separovat a kvantifikovat intaktní monofosforylované, difosforylované a trifosforylované cytokininové nukleotidy bez použití iont-párového činidla. Tato metoda byla použita k analýze vzorků lidských leukemických buněk K-562, kde byly jednotlivé formy cytokininových nukleotidů stanoveny jako intracelulární metabolity. Tato metoda je potenciálně vhodnou metodou pro stanovení endogenních CK nukleotidů v rostlinách (Béres *et al.*, 2010).



Obr. 4: Schéma kapalinového chromatografu. Podle Klouda, 2003.

4. 2. 1. 1. HPLC/ELSD

Jedním z detektorů široce používaným v oblasti kapalinové chromatografie je detektor ELSD (Evaporative Light Scattering Detector). Jedná se o odpařovací detektor, jehož mechanismus se skládá ze tří fází, a to zmlžování, odpařování a detekce. Tento detektor pracuje na principu rozptylu světla a měří tedy množství světla rozptýleného částicemi analytu. Jsou tímto způsobem detekovány všechny sloučeniny, u kterých nedochází při odpařování mobilní fáze k rozložení nebo vypaření. U analýz prováděných použitím HPLC-ELSD je důležitá volba typu eluce, výběr mobilní fáze a další podmínky, které ve výsledku ovlivňují nejen retenční časy, které jsou důležité pro identifikaci sloučenin, ale ovlivňují také například poměr signál/šum a stabilitu základní linie. Používaným plynem bývá dusík, jehož průtok ovlivňuje míru detekovaného signálu a taktéž volba vhodné teploty ovlivňuje nechtěné ztráty, ke kterým může dojít například vypařením analytu (Young a Dolan, 2003).

ELSD se používá zejména na analýzu netěkavých sloučenin, které neabsorbují nad 200nm (např. cukry, steroidy, nasycené uhlovodíky) a ve srovnání s optickými absorpčními detektory citlivost detekce tohoto detektoru nezávisí na spektrálních vlastnostech sloučenin (Man *et al.*, 2010).

4. 2. 1. 2. HPLC/MS

Od devadesátých let minulého století se analýza cytokininů rozšířila o použití kombinace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS). Tento přístup nabízí nový nástroj pro detekci, kvantifikaci a charakterizaci cytokininů v extraktu z rostlinných pletiv na vysoké úrovni. Je třeba dokonalé chromatografické separace s ohledem na lepší odstranění nescifického šumu a přirozený výskyt izomerů. Precizní chromatografická separace může ovlivnit lepší signál v detektoru. Pro MS analýzy cytokininů v kombinaci s RP-HPLC byly použity odlišné ionizační techniky, jako je ionizace termosprejem (TSI), rychlými atomy (FAB), chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) či ionizace elektrosprejem (ESI). Nevýhodou prvních třech metod byla ne mnoho vysoká citlivost a potřeba zpracování většího množství biologického materiálu či práce s transgenním materiálem, kde byla chemickou indukcí zvýšena hladina cytokininů (Tarkowski *et al.*, 2009). Jednou z prvních prací využívající ionizačních technik je práce popisující použití HPLC/APCI-MS, jež byla použita ke stanovení hladiny tZR v nádorech rostlin tabáku. Při použití chemické ionizace za atmosférického tlaku se dospělo ke zjištění, že i přes dosažený

detekční limit, jež dovoluje použití této metody u rostlinného materiálu bez zvýšených hladin cytokininů, je pozorována nižší selektivita protonovaných molekul, a je tedy třeba separovat každý cytokinin (Yang *et al.*, 1993).

Horší úspěšnost byla při použití ionizační techniky termosprejem u metody HPLC/ESI-MS/MS. Nevýhodou této metody je vyšší citlivost termospreje na složení mobilní fáze. Nemůže být použita gradientová eluce, a tak je nutná oddělená analýza některých metabolitů (ZR, DHZR). Z toho vyplývají i další nevýhody spočívající v prodlužování analýz a vyšší spotřebě rostlinného materiálu. Naopak metoda, která získala uplatnění při analýze fytohormonů, využívá ionizace rychlými atomy a jedná se o kapilární HPLC/frit-FAB-MS/MS. Hmotnostní spektra cytokininových metabolitů obsahovala velké množství fragmentů a zejména u molekul s cukernými zbytky jsou spektra bohatší až o dva fragmenty, i přes to, že jde o měkkou ionizační techniku. Této metody bylo využito ke stanovení a identifikaci isopentenyladenosinu ve smrkovém jehličí (Imbault *et al.*, 1993).

Ionizace elektrosprejem se využívá u metody HPLC/ESI-MS/MS. Její výhodou je časová nenáročnost a vysoká propustnost vzorků. Základem metody je částečná separace analytů na chromatografické koloně a hmotnostní detekci v selektivním modu, kdy sledujeme produkty rozpadu. U této metody došlo na srovnání lineárních dynamických rozsahů a detekčních limitů u více druhů kolon, počínaje konvenčními, mikrokolonami až po kolony kapilární. Také se zde porovná prekoncentrace analytu na předkolonce či rovnou na analytické koloně. Výhodou je nástřik většího množství extraktu a poté zakoncentrování na pevné fázi i u kolon menších rozměrů, kterými jsou právě kapilární kolony a mikrokolony. Výsledkem je, že při použití chromatografické kolony spolu se zakoncentrováním analytu na předkolonce, lze dosáhnout detekčních limitů až femtomolárních (Prinsen *et al.*, 1998). První metodou ESI-MS, jež je schopna sledovat jak isoprenoidní, tak i aromatické cytokininy, je metoda s použitím hmotnostního detektoru s jedním kvadrupólovým analyzátozem. Dochází zde k úplné chromatografické separaci a v kombinaci imunoafinitní chromatografie s HPLC/ESI-MS bylo umožněno sledování vybraného iontu, a tudíž docíleno dostatečné selektivity při separaci cytokininů (Novák *et al.*, 2003).

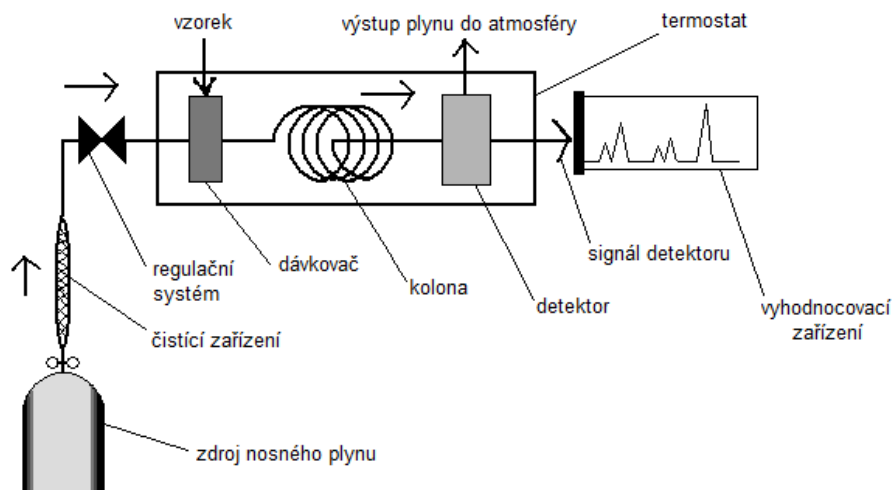
Dalšími metodami, které byly úspěšné při identifikaci nukleotidů, byla kombinace kapalinové chromatografie s ionizací elektrosprejem a detekcí hmotnostním spektrometrem (LC-ESI-MS) a o pár let později i ultra účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (UPLC-MS/MS). U obou těchto metod bylo ale dosaženo nižších detekčních limitů (Novák *et al.*, 2008; Nordström *et al.*, 2004).

Vyšších detekčních limitů bylo dosaženo metodou HILIC-MS/MS, která byla vyvinuta stejně jako předchozí metody, pro stanovení majoritních cytokininů v rostlinných extraktech. Extrakční roztok rostlinných vzorků je možné aplikovat přímo na separační kolony bez odpaření rozpouštědla, což do značné míry zjednodušuje separační proces. Kromě toho, on-line systém zachycení zvyšuje citlivost detekce analytické metody. Pomocí této metody byla stanovena koncentrace cytokininových nukleotidů ve třech rostlinných vzorcích, a to v extraktech sazenic *A. thaliana* a *O. sativa* a listech *L. esculentum* Mill. V extraktu sazenic *A. thaliana* bylo stanoveno sedm cytokininů (iP, iPR, iP9G, Z, ZR, Z9G, DHZR), šest v sazenicích *O. sativa* (iP, iPR, iP9G, Z, ZR, Z9G) a pět v listech *L. esculentum* Mill. (iPR, iP9G, Z, ZR, Z9G). Tyto výsledky tedy ukázaly, že metoda HILIC-MS/MS je vhodná pro rychlé a citlivé stanovení endogenních cytokininových nukleotidů v různých rostlinných vzorcích (Liu *et al.*, 2012).

4. 2. 2. GC/MS

Metody založené na plynové chromatografii poskytují vysoké rozlišení a nízké detekční limity, ale jsou náročné na provedení a finančně nákladné (Obr. 5). Plynová chromatografie byla použita pro analýzu cytokininů od počátku 70. let a struktury téměř všech přirozeně se vyskytujících cytokininů byly pomocí GC/MS dosud objasněny. Před zavedením HPLC/MS byla plynová chromatografie s hmotnostní detekcí jedinou spolehlivou metodou pro identifikaci a kvantifikaci cytokininů, která usnadnila určení chemické struktury velkého počtu cytokininových metabolitů. Cytokiny nejsou látky těkavé, a proto musí být derivatizovány pro zvýšení jejich těkavosti a také ke zlepšení jejich tepelné stability před analýzami plynové chromatografie. Tento krok je nejen časově náročný, ale většinou je potřeba opětovné přečištění analytů pomocí kapalinové chromatografie. Derivatizační metody mají některé podstatné technické problémy, jako je například vznik nestabilních derivátů s omezenou těkavostí po acetylaci (Björkman a Tillberg., 1996).

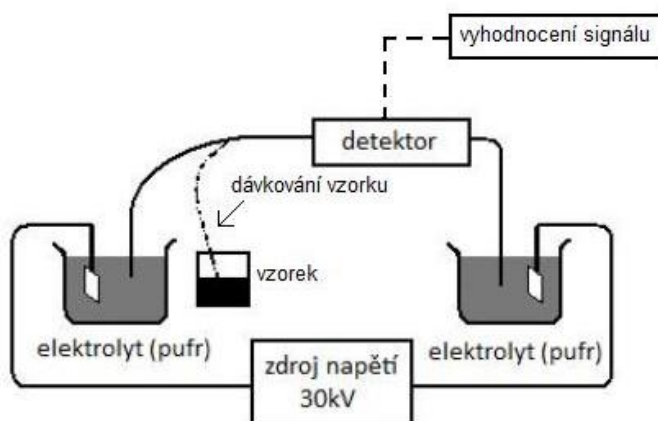
Ikdyž byly zjištěny nevýhody GC/MS v porovnání s HPLC/MS, které spočívají v nižší citlivosti, potřeby derivatizace, složitějšího čištění, a tudíž k většímu množství použitého rostlinného materiálu, byla tato metoda dlouhodobě využívána k identifikaci a stanovení (Tarkowski *et al.*, 2004).



Obr. 5: Schéma plynového chromatografu. Podle Klouda, 2003.

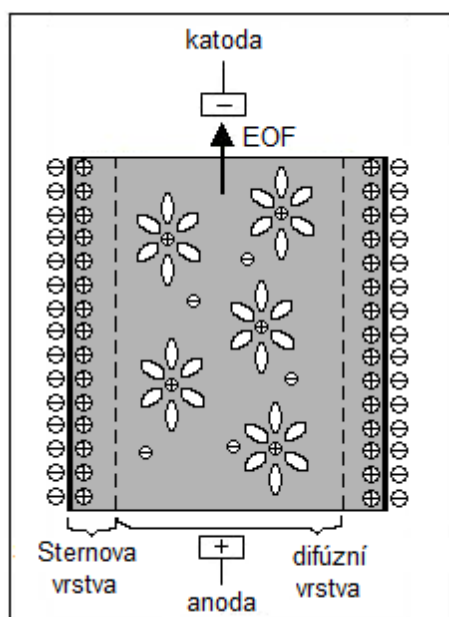
4. 2. 3. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je široce používaná elektromigrační separační metoda, která je založena na rozdílné rychlosti migrace nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli k separaci složek směsi. K separaci látek dochází v tenké křemenné kapiláře definovaných rozměrů, která je naplněna základním elektrolytem (pufr) a její konce jsou ponořeny do pufru spolu s elektrodami, mezi které se vkládá vysoké napětí až 30kV (Obr. 6). Díky pufru je zajištěna elektrická vodivost v systému a díky povrchu kapiláry, která musí být termostatovaná, je odváděno vzniklé Joulovo teplo. Tato metoda vyžaduje složitější instrumentaci, ale je tak zajištěna větší účinnost, vyšší rozlišovací schopnost, on-line detekce analytu, rychlejší čas analýz, minimální požadavek na množství vzorku a snížení vzniku manuální chyby v průběhu analýzy díky vyšší automatizaci (Klouda, 2003).



Obr. 6: Schéma kapilární elektroforézy. Podle Klouda, 2003.

Typickým jevem kapilární elektroforézy je elektroosmotický tok (EOF) (Obr. 7), ke kterému dochází po vložení vysokého napětí do systému. Jedná se o vznik elektrické dvojvrstvy (tzv. Sternovy vrstvy), kdy po aplikaci roztoku (pH>3) dochází k hydrolyze siloxanových skupin (Si-O-Si) a vzniku skupin silanolových (Si-OH). Ty posléze disociují a vnitřní stěna kapiláry je pokryta negativně nabitými křemičitanovými skupinami (Si-O⁻), které přitahují kationty základního elektrolytu. Kationty ve střední části kapiláry tvoří tzv. difúzní vrstvu a po vložení elektrického napětí jsou unášeny ke katodě. Stejným směrem jsou unášeny také molekuly vody a dochází tak k toku celému roztoku k detektoru před katodou (Klouda, 2003).



Obr. 7: Elektroosmotický tok. Podle Klouda, 2003.

Detekovat separované ionty lze více způsoby, které se odlišují různou citlivostí vzhledem ke koncentraci analytu. Nejběžnějším způsobem detekce při stanovení cytokininů je UV (CE/UV) a MS (CE/MS) detekce. Standardním a široce používaným detektorem při analýzách cytokininů je UV detektor.

Nejpoužívanější technikou kapilární elektroforézy pro stanovení cytokininů je kapilární zónová elektroforéza (CZE), kdy je kapilára naplněna pouze samotným pufrům. První analýzy cytokininů provedené na kapilární zónové elektroforéze s UV detekcí byly provedeny v roce 1997. Jednalo se o analýzu cytokininů, jejich ribosidů a jiných purinových i pyrimidinových bází (Pacáková *et al.*, 1997). Za pár let poté byla vyvinuta první metoda CZE-MS na analýzu 12 cytokininů v kokosovém mléce (Ge *et al.*, 2006).

Dále byly pomocí této metody stanoveny disociační konstanty některých zástupců aromatických a isoprenoidních cytokininů, a protože se jedná o jednoduchou a snadno automatizovatelnou separační techniku, kdy je možné pracovat se vzorky nižší čistoty a stanovovat konstanty více derivátů současně, je tato metoda stanovení disociačních konstant oproti jiným (např. UV-spektrometrie) výhodnější (Barták *et al.*, 2000).

4. 2. 4. Imunochemické metody

Imunochemické metody se staly v oblasti analýzy cytokininů vysoce používanými metodami. Důvodem je zejména vysoká citlivost těchto metod při nižších provozních nákladech a přístrojové vybavení v porovnání s LC/MS a GC/MS (Tarkowski *et al.*, 2004). Principem imunochemických metod je tvorba imunokomplexního páru antigen (analyt)-protilátka, který může být následně detekován a stanoven. Jeden z reaktantů bývá označen enzymem (fluorescenční nebo chemiluminiscenční látkou), což je důležité pro detekci vzniklého imunokomplexu. Na stanovení nízkomolekulárních látek těmito metodami se využívá testů, které jsou založeny na kompetitivním uspořádání, což spočívá v tom, že definované množství značeného indikátoru soutěží s různými koncentracemi neznačeného standardu o omezený počet volných vazebných míst protilátek. Když jsou koncentrace značeného antigenu a protilátky konstantní, je poměr mezi značeným antigenem volným a vázaným funkcí koncentrace neznačeného antigenu v roztoku. Srovnáním se standardní křivkou, kde byly použity známé koncentrace neznačeného antigenu, lze stanovit množství antigenu v neznámém analytu (Tarkowski *et al.*, 2004).

Cytokiny jsou nízkomolekulární látky, které v organismu nevyvolávají imunitní odpověď a antigeny se stávají až po navázání na vhodný makromolekulární nosič. Typickou vlastností a nevýhodou připravených protilátek je jejich křížová reaktivita. Protilátka neváže jen molekulu, proti které byla připravena, ale i molekuly strukturně podobné. Někdy je ale žádoucí, aby protilátky vykazovaly křížovou reakci a bylo tak možné stanovit použitím jedné protilátky více metabolitů.

Imunochemické metody, jimiž jsou enzymová imunoanalýza (ELISA) nebo radioimunoanalýza (RIA) jsou velmi využívány. Pro přesnou kvantifikaci těmito metodami je důležitá předseparace vzorku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), díky které separujeme analyt tak precizně, že jsme pak schopni stanovit imunoreaktivitu jednotlivých křížově reagujících látek (Tarkowski *et al.*, 2004).

Experimentální část

5. Materiál a chemikálie

- AMP (Sigma Aldrich, USA)
- ADP (Sigma Aldrich, USA)
- ATP (Sigma Aldrich, USA)
- *t*ZMP (Biolog, Německo)
- *t*ZTP (Biolog, Německo)
- Acetonitril (Baker, Nizozemsko)
- Kyselina trifluoroctová (Sigma Aldrich, USA)
- Methanol (Chromservis, Česká republika)
- Octan amonný (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, USA)
- Sacharosa (Lachner, Česká republika)
- Roztok amoniaku (Merck, Německo)
- DEAE Sephadex (GE Healthcare, Německo)
- Mravenčan amonný (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina citronová (Sigma Aldrich, USA)
- Bromid cetyltrimethyl amonný (Sigma Aldrich, USA)

Přístroje a experimentální vybavení:

- Analytické váhy (Radwag, Polsko)
- Pipety a špičky 1 μ l - 5ml (Eppendorf, Německo)
- HPLC vialky (Phenomenex, USA)
- pH metr (Elmetron, Polsko)
- Vortex (Biosan, Litva)
- Magnetická míchačka (Biosan, Litva)
- Kolony Carbograph 500mg (Grace, USA)
- Kolony (Agilent, USA)
- UV/VIS Spektrofotometr (Shimadzu, Japan)
- Kapalinový chromatograf LC2010c (Shimadzu, Japonsko)
- Chromatografická kolona- Gemini NX 3 μ m (150 x 2,00 mm) (Phenomenex, USA)
- Kapalinový chromatograf Smartline (Knauer, Německo)
- Detektor ELSD 3300 (Alltech, USA)
- Chromatografická kolona Waters Spherisorb 5 μ m NH₂ (250 x 2,1 mm) (Waters, USA)
- Kapilární elektroforéza Agilent_{3D} CE (Agilent technologies, Německo)

- Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μ m, o celkové délce 48.5cm a efektivní délce 40 cm (Polymicro CE and CEC Technologies, USA)

6. Metody

6. 1. Příprava standardních roztoků nukleotidů

Základní roztoky nukleotidů o koncentraci 10⁻² mol/l a 0,1 mol/l byly připraveny rozpuštěním pevných nukleotidů (AMP, ADP, ATP) v destilované vodě.

6. 2. Příprava standardního roztoku sacharidu

Základní roztok sacharidu o koncentraci 1mg/ml byl připraven rozpuštěním pevného sacharidu (sacharosy) v destilované vodě.

6. 3. Optimalizace odezvy detektoru ELSD pro stanovení sacharidů

Pro dosažení nejlepších výsledků jsme museli optimalizovat parametry detektoru, a to průtok plynu (dusíku) a teplotu detektoru.

Na optimalizaci průtoku plynu v detektoru byla použita sacharosa o koncentraci 1mg/ml a kolona Waters pherisorb 5 μ m NH₂ (250 x 2,1 mm), kterou protékala mobilní fáze 65% acetonitrilu o průtoku 0,3 ml/min a objemu nástřiku 4 μ l. Detektor byl ekvilibrován na počáteční průtok dusíku 3 l/min a každá další analýza byla provedena po snížení průtoku plynu o 0,5 l/min až na konečný průtok dusíku 1,0 l/min (3 l/min, 2,5 l/min, 2,0 l/min, 1,5 l/min, 1,0 l/min). Byly provedeny dva nástřiky po 4 μ l. Celková doba analýzy byla 5 min.

Optimalizace teploty detektoru byla provedena s totožnou kolonou jako při optimalizaci průtoku dusíku v detektoru i se stejným roztokem sacharosy. Detektor byl ekvilibrován na počáteční teplotu 40°C a pro každou další analýzu byla teplota zvýšena o 5°C postupně až po konečnou hodnotu 70°C (40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C). Byly opět provedeny dva nástřiky po 4 μ l. Celková doba analýzy byla 5 min.

6. 4. Extrakce nukleotidů metodou SPE s použitím kolony

Carbograph

Uhlíková kolona Carbograph 500 mg byla aktivována 7 ml solvatačního roztoku (roztok 80% ACN, 0,1 % TFA) a poté ekvilibrována 7 ml 10% MeOH. Na připravenou kolonu byly nanесeny 3 ml roztoku směsi standardních nukleotidů (100 μ l AMP, 100 μ l ADP, 100 μ l ATP o koncentraci jednotlivých roztoků 10^{-2} mol/l, 2700 μ l 10% MeOH) a prošlý roztok sbírán do zkumavky. Následně byly na kolonu nanесeny 3 ml elučního činidla, a to 10% MeOH, kdy se opět přečištěná frakce sbírala do zkumavky. Tento přečištěný roztok byl převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn do 10 ml destilovanou vodou.

Celý postup byl stejným postupem proveden ještě jednou s použitím 50% a 70% MeOH namísto 10% MeOH.

Kontrolní roztok byl připraven tak, že byly do 10 ml odměrné baňky napipetovány roztoky nukleotidů (100 μ l AMP, 100 μ l ADP, 100 μ l ATP o koncentraci jednotlivých roztoků 10^{-2} mol/l) a to celé bylo doplněno do 10 ml 50% MeOH.

Vzorky byly po extrakci analyzovány kapilární elektroforezou Agilent_{3D} s detekcí UV/VIS při 268 nm v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μ m, celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm. Základním elektrolytem (BGE) byla 40 mM kyselina citronová s přísávkem 0,8 mM CTAB, titrována na pH= 4,4 kyselinou gama-minomáselnou. Analýzy byly provedeny za podmínek vkládaného napětí 30 kV, interní teploty 25°C, tlaku -50 mBa, generovaného proudu 60 μ A a doby nástřiku 6 sekund. Všechny analýzy probíhaly pomocí tzv. Short-end analýzy, kdy je za pomoci specifického nastavení přístroje vzorek nástřikován na outlet a dochází tak k výraznému zkrácení doby analýzy.

6. 5. Extrakce sacharidů metodou SPE se sorbentem DEAE

Sephadex

Do kolony byl aplikován filtr smočený ve vodě a MeOH, na něj byl nanесen 1 ml gelu DEAE Sephadex a opět smočený filtr. Takto připravená kolona byla aktivovaná a ekvilibrována aplikací 10 ml destilované vody a poté 5 ml 10 mM HCOONH₄. Na aktivovanou kolonu byly poté nanесeny 3 ml roztoku nukleotidů a sacharosy (100 μ l AMP, 100 μ l ADP, 100 μ l ATP o koncentraci jednotlivých roztoků 10^{-2} mol/l, sacharosa o koncentraci 0,5 mg/l, 2700 μ l 10 mM HCOONH₄) a pročištěná frakce byla odebírána do zkumavky jako flow through (FT). Poté po nanесení 5 ml destilované vody byla

odebrána frakce wash (W) a nakonec byla provedena dvojitá eluce 2 x 4 ml 6% HCOOH, které byly odebírány do dvou zkumavek (E1, E2). Jednotlivé frakce byly převedeny do 10 ml odměrné baňky a doplněny do 10 ml 10mM HCOONH₄.

Kontrolní roztok byl připraven tak, že byly do 10 ml odměrné baňky napipetovány 3 ml roztoku nukleotidů a sacharosy (100 μl AMP, 100 μl ADP, 100 μl ATP o koncentraci jednotlivých roztoků 10⁻² mol/l, sacharosa o koncentraci 0,5 mg/l) a to celé bylo doplněno do 10 ml 10 mM HCOONH₄.

Jednotlivé frakce byly poté analyzovány HPLC s detekcí ELSD. Byla použita kolona Waters Spherisorb 5 μm NH₂ za podmínek izokratické eluce 65% ACN o průtoku 0,3 ml/min a objemu nástřiku 4 μl. Detektor ELSD byl nastaven a ekvilibrován na teplotu detektoru 50°C s průtokem dusíku 1,5 l/min a jednotlivé analýzy trvaly 5 minut ve 3 opakování.

6. 6. Extrakce nukleotidů metodou SPE se sorbentem DEAE Sephadex

Extrakce nukleotidů (AMP, ADP, ATP) byla provedena s obdobným postupem extrakce, ale s rozdíly použitých elučních činidel, jiného složení vzorku a odebírány byly pouze frakce eluce. Byly také použity odlišné analytické koncovky.

Příprava kolony pro extrakci spočívala v aplikaci smočeného filtru (destilovaná voda, MeOH) na kolonu, nanesení 1 ml gelu DEAE Sephadex a aplikaci dalšího smočeného filtru na vrstvu gelu. Takto připravená kolona byla aktivována a ekvilibrována 10 ml destilované vody 5 ml a poté 10 mM HCOONH₄. Na kolonu byl nanesen vzorek nukleotidu AMP (100 μl standardního roztoku AMP o koncentraci 10⁻² mol/l ve 2900 μl 10 mM HCOONH₄). K promytí kolony bylo naneseo 5 ml destilované vody. K eluci bylo použito eluční činidlo 6% HCOOH, které bylo pipetováno na kolonu ve dvou dávkách po 4 ml. Po první dávce činidla byla tedy odebírána první eluční frakce (E1) a po druhé byla odebrána druhá eluční frakce (E2). Obě tyto frakce byly převedeny do 5 ml odměrných baněk a doplněny 6% HCOOH. Tento postup byl ještě dvakrát opakován.

Kontrolní vzorek byl připraven tak, že do 5 ml odměrné baňky bylo napipetováno 100 μl standardního roztoku AMP a celé bylo doplněno 6% HCOOH. Totéž bylo provedeno na jiné koloně pro vzorek ADP a poté i pro ATP.

Ve druhé fázi byl zopakován celý předchozí postup s jiným elučním činidlem, a to s 1 M HCOONH₄. Čili jsme získali eluční frakce jednotlivých nukleotidů za použití

elučního činidla 6% HCOOH a eluční frakce s obsahem jednotlivých nukleotidů za použití elučního činidla 1 M HCOONH₄.

Absorbance těchto frakcí byly měřeny v křemenné kyvetě UV/VIS spektrofotometrem v rozmezí vlnových délek 200-300 nm.

Pro detekci všech tří nukleotidů najednou s použitím analytické koncovky kapilární elektroforézy jsme připravili vzorek, ve kterém se nacházely všechny tři nukleotidy (AMP, ADP, ATP) a provedli stejný postup extrakce. Rozdílem od předchozího postupu bylo, že jsme koncové frakce ředili do 250 ml odměrných baněk pro snížení vodivosti analytů pod hodnotu vodivosti základního elektrolytu pro CE.

Nejdříve jsme tedy opět připravili kolony pro extrakci (aplikace filtru, nanesení 1 ml gelu DEAE Sephadex, aplikace druhého filtru na vrstvu gelu a poté aktivace a ekvilibrace 10 ml destilované vody a 5 ml 10 mM HCOONH₄) a následně jsme nanесли roztok standardních nukleotidů (100 μl AMP, 100 μl ADP, 100 μl ATP o koncentraci jednotlivých roztoků 0,1 mol/l ve 2700 μl 10 mM HCOONH₄) a odebrali získanou frakci do zkumavky (FT). Poté jsme nanесли 5 ml destilované vody na promytí kolony a odebrali další frakci (W). Jako eluční činidlo jsme použili 1 M HCOONH₄, nanесли 4 ml tohoto činidla na kolonu a odebrali eluční frakci (E). Frakce jsme převedli do 250 ml odměrných baněk a doplnili destilovanou vodou. Celý postup jsme opakovali ještě jednou.

Kontrolní vzorek byl připraven tak, že jsme do 250 ml odměrné baňky napipetovali směs standardních nukleotidů (100 μl AMP, 100 μl ADP, 100 μl ATP o koncentraci jednotlivých roztoků 0,1 mol/l v 5 ml 1M HCOONH₄) a doplnili do 250 ml destilovanou vodou.

Vzorky byly po extrakci analyzovány kapilární elektroforézou Agilent_{3D} s detekcí UV/VIS při 268 nm v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm, celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm. Základním elektrolytem (BGE) byla 40 mM kyselina citronová s přísávkem 0,8 mM CTAB, titrována na pH= 4,4 kyselinou gama-minomáselnou. Analýzy byly provedeny za podmínek vkládaného napětí 30 kV, interní teploty 25°C, tlaku -50 mBa, generovaného proudu 60 μA a doby nástřiku 6 sekund. Všechny analýzy probíhaly pomocí tzv. Short-end analýzy, kdy je za pomoci specifického nastavení přístroje vzorek nástřikován na outlet a dochází tak k výraznému zkrácení doby analýzy.

6. 7. Extrakce ϵ ZMP a ϵ ZTP metodou SPE se sorbentem DEAE

Sephadex

Nejdříve jsme připravili kolony pro extrakci (aplikace filtru, nanesení 1 ml gelu DEAE Sephadex, aplikace druhého filtru na vrstvu gelu a poté aktivace a ekvilibrace 10 ml destilované vody a 5 ml 10 mM HCOONH_4) a následně jsme nanесли 3 ml roztoku ϵ ZMP a ϵ ZTP (100 μl směsi ϵ ZMP a ϵ ZTP o koncentraci 2×10^{-4} mol/l ve 2900 μl 10 mM HCOONH_4), poté jsme kolonu promyli 5 ml destilované vody a nanесли dvakrát 4 ml elučního činidla 1 M HCOONH_4 . Odebírali jsme všechny frakce (FT, W, E1, E2), které jsme poté převedli do 5 ml odměrných baněk a doplnili destilovanou vodou.

Všechny vzorky jsme analyzovali pomocí HPLC-UV/VIS na koloně Gemini NX 3 μm (150 x 2,00 mm). Jako MF (A) byl použit 20 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ titrovaný na pH= 10 roztokem amoniaku, MF (B) byl MeOH. Výsledná isokratická eluce byla provedena 7% MeOH o průtoku 0,2 ml/min, tlaku 17,5 MPa, teplotě kolony 40°C a teplotě vzorku 15°C a objemu nástřiku 5 μl . Jednotlivé analýzy trvaly 10 minut a absorbance byla měřena při vlnové délce 268 nm.

7. Výsledky a diskuse

Cílem experimentální části bylo vypracovat vhodný postup separační metody SPE (Solid Phase Extraction), abychom byli schopni efektivně a kvantitativně izolovat cytokininové (CK) nukleotidy od všech interferujících látek z rostlinných pletiv. Jelikož se CK nukleotidy v rostlinách vyskytují pouze ve stopovém množství a spolu s nimi se v pletivech vyskytují tisíce dalších molekul, bylo by náročné sestavit vhodnou purifikační metodu bez předchozích analýz s použitím standardních látek. Z toho důvodu jsme zvolili jako standardní látky AMP, ADP a ATP u kterých jsme předpokládali, že vzhledem k podobné chemické struktuře a vlastnostem se budou při extrakci chovat jako CK nukleotidy. Volba právě těchto standardních látek byla zejména z toho důvodu, že s použitím konkrétních CK nukleotidů by všechny experimenty byly finančně velmi nákladné.

Vzhledem ke své polaritě jsou hlavními interferujícími látkami ve vodném extraktu sacharidy. Jsou to látky polární, stejně jako CK nukleotidy a při extrakci do vodného roztoku se budou tedy extrahovat spolu s nimi i mnoha dalšími látkami, jako například organickými kyselinami, peptidy a proteiny. Tudíž bylo v první fázi naším

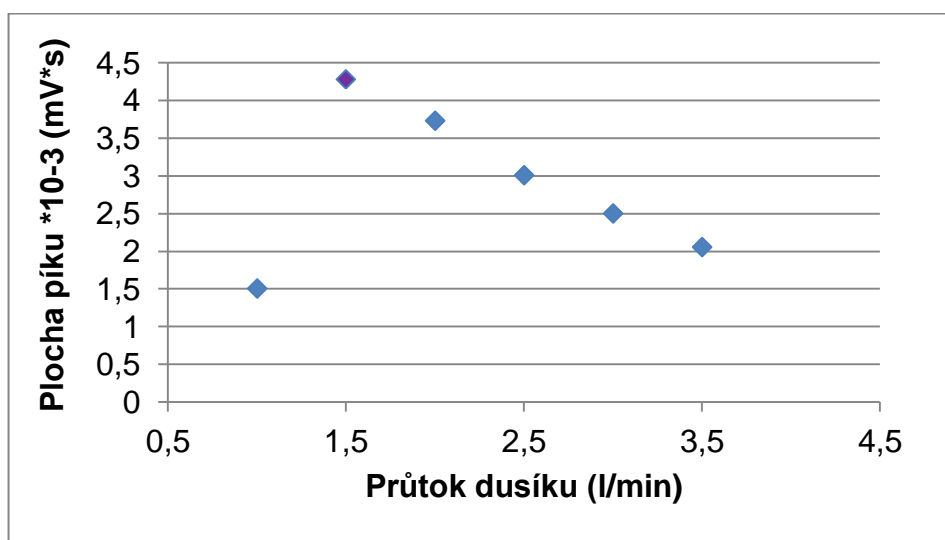
úkolem oddělení sacharidů od standardních látek (AMP, ADP, ATP) a takto bychom se tedy zbavili převážného množství intererujících molekul.

Jako standardní látku ze skupiny sacharidů jsme zvolili sacharosu, protože se v rostlinném pletivu vyskytuje v největším zastoupení.

7. 1. Optimalizace ELSD detektoru

7. 1. 1. Optimalizace průtoku plynu ELSD

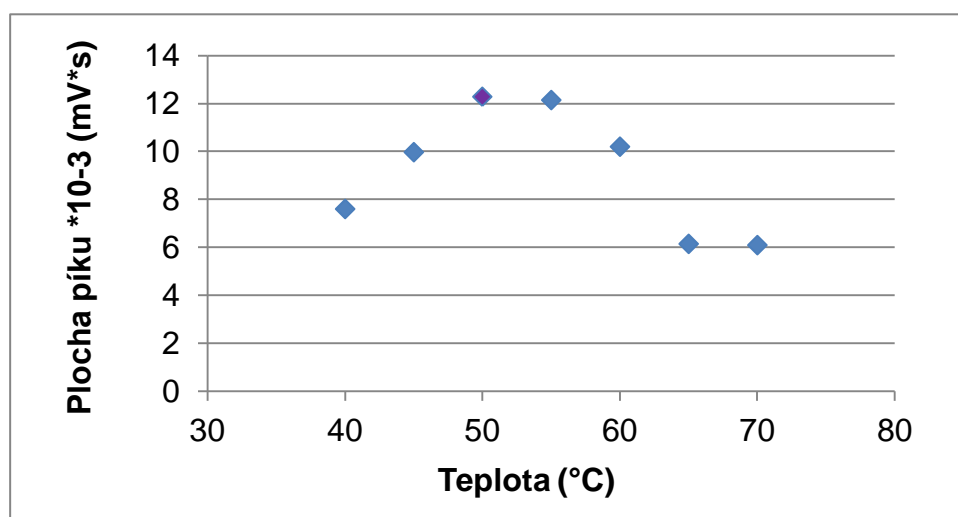
Abychom byli schopni po extrakci sacharidy stanovit, bylo zapotřebí najít vhodné podmínky pro HPLC/ELSD detekci. Na optimalizaci průtoku plynu (dusíku) byla použita kolona Waters pherisorb 5 μm NH_2 (250 x 2,1 mm), kterou protékala mobilní fáze 65% ACN o průtoku 0,3 ml/min. Bylo tedy využito izokratické eluce o délce 5 minut a měřili jsme od počátečního nastavení průtoku dusíku na 3 l/min postupným snižováním o 0,5 l/min až na konečný 1 l/min. Výsledné hodnoty integrovaných ploch chromatografických píků byly průměrovány. Z grafického znázornění (Obr. 8) je patrné, že největší signál poskytuje detektor při průtoku dusíku 1,5 l/min.



Obr. 8: Graf závislosti ploch píků na průtoku plynu v detektoru. Mobilní fáze 65% ACN, kolona Waters pherisorb 5 μm NH_2 (250 x 2,1 mm), objem nástřiku 4 μl roztoku sacharosu (1mg/ ml), měření při průtoku dusíku v detektoru v rozmezí od 1-3 l/min.

7. 1. 2. Teplotní optimalizace ELSD

Na teplotní optimalizaci byl zvolen průtok dusíku 1,5 l/min, který se ukázal jako nejvýhodnější v předchozím experimentu. Pro optimalizaci byly použity stejné experimentální podmínky jako v předchozím případě. Odezva detektoru byla měřena v teplotním rozsahu 40-70°C a výsledné hodnoty integrovaných ploch chromatografických píků byly průměrovány. Z grafického znázornění (Obr. 9) můžeme vidět, že se hodnoty plochy píků zvyšovaly po teplotu 50°, kde jsme zaznamenali nejvyšší hodnotu plochy a poté se snižující se teplotou se zmenšovaly i plochy píků. Teplota 50°C se tedy ukázala jako nejvýhodnější při měření.



Obr. 9: Graf závislosti ploch píků na teplotě detektoru. Mobilní fáze 65% ACN, kolona Waters pherisorb 5 µm NH₂ (250 x 2,1 mm), průtok dusíku 1,5 l/min, objem nástřiku 4 µl roztoku sacharosy (1mg/ ml), měření při teplotě detektoru v rozmezí od 40-70°C.

7. 2. Extrakce nukleotidů metodou SPE na kolonách Carbohydr

Po optimalizaci přístroje HPLC/ELSD jsme přešli již k samotné separační technice. Metoda SPE s použitím kolony Carbohydr byla již úspěšně použita pro separaci krátkých alifatických difosfátů (Tarkowská, osobní sdělení).

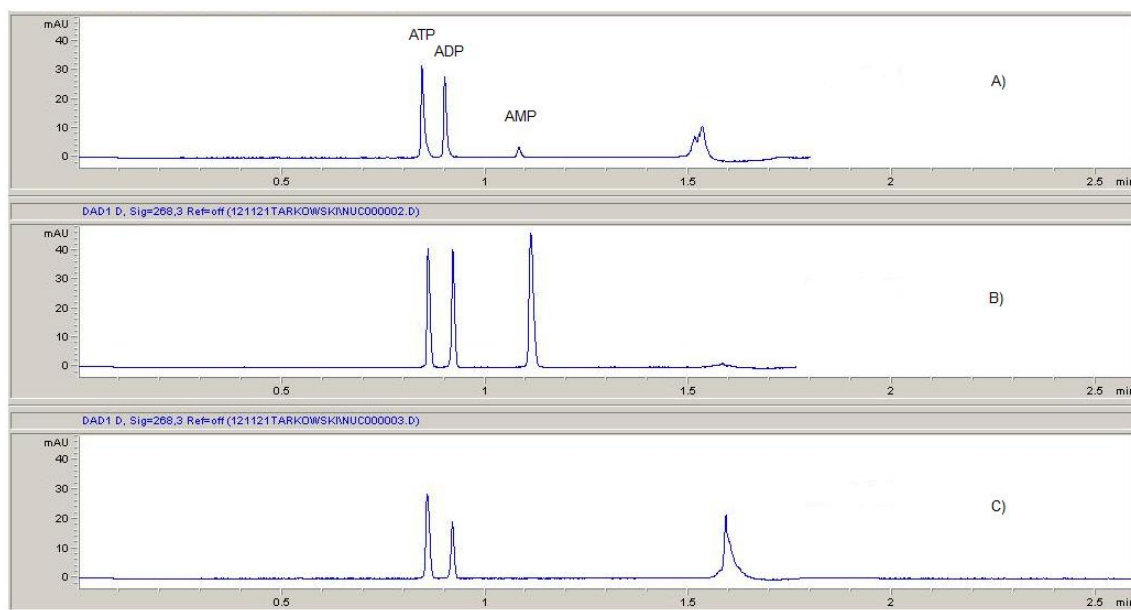
My jsme tedy předpokládali, že CK nukleotidy (mono-, di-, trifosfáty) budeme pomocí této metody schopni separovat od sacharidů.

Pomocí metody SPE s použitím uhlíkové kolony Carboglyph 500 mg jsme po aktivaci a ekvilibraci kolony přečistili směs nukleotidů (AMP, ADP, ATP). Jako eluční činidla jsme pro eluci nukleotidů použili 10%, 50% a 70% MeOH. Vzorokly byly poté analyzovány na kapilární elektroforéze Agilent_{3D} s detekcí UV/VIS při 268 nm v křemenné kapiláře a všechny analýzy byly provedeny pomocí tzv. Short-end analýzy.

Z tabulky (Tab. 2) a elektroferotického záznamu (Obr. 10) je zřejmé, že návratnosti nukleotidů po extrakci jsou v porovnání s výsledky kontroly velice nízké a jejich vazebné interakce s uhlíkovým sorbentem jsou natolik silné, že nejsme schopni je z kolony danými elučními činidly (10%, 50%, 70% MeOH) eluovat. Při použití 10% MeOH nedošlo k eluci ani jedné z látek, při zvýšení koncentrace organického činidla (50% MeOH) jsme mohli pozorovat o něco vyšší návratnosti, nicméně i po dalším zvýšení organického podílu v elučním činidle (70% MeOH) jsme nebyli schopni kvantitativně eluovat všechny tři látky (AMP, ADP, ATP) najednou a ve vysokých návratnostech. Usoudili jsme, že interakce zkoumaných molekul (AMP, ADP, AMP) a uhlíkového sorbentu kolony Carboglyph 500mg jsou natolik vysoké, že nejsme schopni je eluovat z kolony, a tudíž je tato metoda nevhodná i pro účinnou separaci CK nukleotidů.

Tab. 2: Návratnosti molekul ATP, ADP a AMP za použití metody SPE a kolony Carboglyph při eluci 10%, 50%, 70% MeOH.

Návratnost (%)			
Eluční činidlo	ATP	ADP	AMP
10% MeOH	0	0	0
50% MeOH	90	51	0
70% MeOH	88	68	6



Obr. 10: Elektroforetická separace nukleotidů. A) Přečištěná směs ATP, ADP a AMP v 70% MeOH. B) Kontrolní vzorek, který nebyl přečištěn na koloně (směs ATP, ADP, AMP v 50% MeOH). C) Přečištěná směs ATP, ADP a AMP v 50% MeOH. Analýza na CE Agilent_{3D} s detekcí UV/VIS při 268 nm v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm , celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm. Základním elektrolytem (BGE) byla 40 mM kyselina citronová s přidavkem 0,8 mM CTAB, titrována na pH= 4,4 kyselinou gama-minomáselnou. Všechny analýzy probíhaly pomocí tzv. Short-end analýzy.

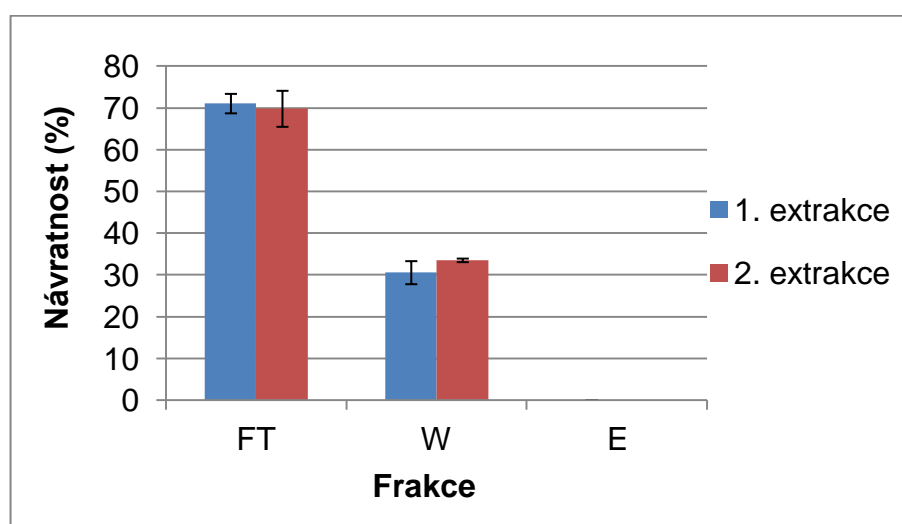
7. 3. Extrakce sacharosy a nukleotidů s použitím SPE a sorbentem DEAE Sephadex

Sorbent typu gel DEAE Sephadex funguje na principu iontoměniče, konkrétně jako anex a má proto schopnost poutat k sobě anionty. Naše zkoumané molekuly mají tyto iontové vlastnosti a měli by se tedy v první fázi poutat na koloně a poté by měly být tyto vazebné interakce vyrušeny elučním činidlem a nukleotidy by měly být tímto způsobem eluovány z kolony ven. Naopak sacharidy, jež nejsou anionty, by neměly se sorbentem nijak interagovat a mělo by dojít k samovolné eluci z kolony již v prvních frakcích bez nutnosti použití elučního činidla.

7. 3. 1. Extrakce sacharosy a analýza pomocí HPLC/ELSD

Pomocí metody SPE s použitím sorbentu DEAE Sephadex jsme po aktivaci a ekvilibraci kolony nanесли směs nukleotidů (AMP, ADP, ATP) a sacharosy a podle daného postupu (viz. Metody) jsme provedli extrakci a odebrali frakce flow through (FT), wash (W) a elution (E). Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

Z výsledného grafu (Obr. 11) můžeme vidět, že veškerá sacharosa prošla přes kolonu se sorbentem bez zachycení, asi 70% sacharosy protéklo přímo, zbytek byl z kolony odstraněn v promývacím kroku.



Obr. 11: Grafické znázornění návratnosti sacharosy v jednotlivých frakcích po extrakci SPE DEAE Sephadex. Frakce FT (flow through)- odebrán extrakt po nanesení analytu (směs ATP, ADP, AMP a sacharosy) na kolonu, frakce W (wash) po promytí 5 ml destilované vody a frakce E (elution) po eluci 6% HCOOH.

Frakce analyzovány pomocí HPLC s detekcí ELSD. Byla použita kolona Waters Spherisorb 5 μm NH₂ za podmínek izokratické eluce 65% ACN o průtoku 0,3 ml/min a objemu nástřiku 4 μl . Detektor ELSD byl nastaven a ekvilibrován na teplotu detektoru 50°C s průtokem dusíku 1,5 l/min a jednotlivé analýzy trvaly 5 minut. Byly provedeny dvě totožné extrakce (1. extrakce, 2. extrakce).

7. 3. 2. Extrakce nukleotidů a analýza pomocí UV/VIS Spektrofotometru

Po úspěšné eluci sacharosy v prvních frakcích FT (flow through) a W (wash) jsme tedy přešli k extrakci jednotlivých nukleotidů (AMP, ADP, ATP). Zde jsme předpokládali, že v důsledku interakce se nukleotidy zachytí na sorbentu DEAE Sephadex a bude je možné eluovat z kolony ven až po nanesení vhodného elučního činidla, kdy dojde k přerušení vazeb. Takovým to vhodným elučním činidlem je 6% HCOOH, která se rutinně používá pro extrakci monofosfátů (pracovní postup pro izolaci cytokininových nukleotidů, Laboratoř růstových regulátorů UP).

Provedli jsme tedy extrakci, kdy jsme odebírali pouze frakce eluce po nanesení 6% HCOOH na sorbent DEAE Sephadex a analyzovali je v křemenných kyvetách v UV/VIS spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 200-300 nm.

Z výsledného grafu (Obr. 12) je zřejmé, že toto eluční činidlo není vhodné pro eluci všech tří nukleotidů. V případě AMP jsme dosáhli návratnosti ve frakci eluce 86%, u ADP pouhých 6% a v případě ATP jsme nenaměřili žádné hodnoty. Toto eluční činidlo je tedy pro difosfáty a trifosfáty velice slabé a není schopné přerušit vazbu mezi nukleotidem a sorbentem DEAE Sephadex.

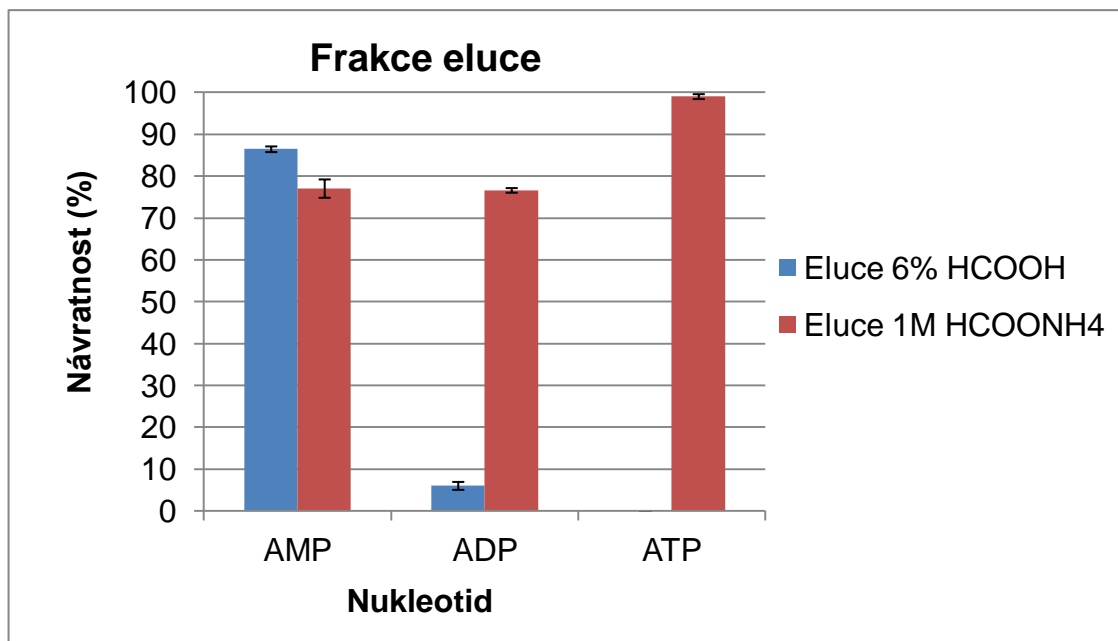
Přešli jsme tedy k použití silnějšího elučního činidla, a to 1 M amonné soli HCOONH₄ (Åstot *et al.*, 1998).

Po provedení totožné extrakce s rozdílem pouze v použití odlišného činidla jsme opět odebrali pouze frakce eluce a poté je analyzovali v křemenných kyvetách v UV/VIS spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 200-300 nm.

Výsledkem bylo zjištění, že v případě AMP jsme dosáhli tímto postupem extrakce návratnosti 77%, u ADP také 77% a u ATP celých 99% (Obr. 12).

Použití 1 M amonné soli HCOONH₄ je tedy účinné při rozrušení vazeb mezi nukleotidy a sorbentem DEAE Sephadex a je tedy vhodné na extrakci jak monofosfátů, tak i difosfátů a trifosfátů.

V případě AMP a ADP se domníváme, že zbylých asi 20% bylo eluováno z kolony již ve frakcích flow through a wash, které jsme ovšem v tomto měření neodebírali a neanalyzovali.



Obr. 12: Grafické znázornění návratnosti jednotlivých nukleotidů (AMP, ADP, ATP) ve frakci eluce po extrakci SPE DEAE Sephadex v závislosti na použitém elučním činidle. V první fázi byla provedena eluce nukleotidů (AMP, ADP, ATP) za použití elučního činidla 6% HCOOH. Ve druhé fázi byly jednotlivé nukleotidy eluovány za použití 1 M HCOONH₄. Absorbance elučních frakcí byly měřeny v křemenných kvetách v UV/VIS spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 200-300 nm.

7. 3. 3. Extrakce a analýza nukleotidů kapilární elektroforézou

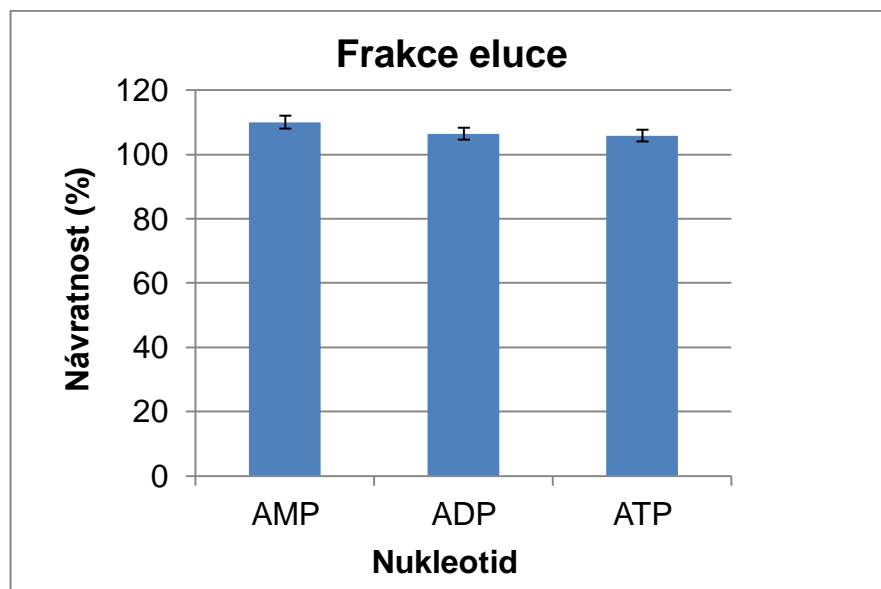
Abychom potvrdili zjištění, že je vhodné spojení SPE DEAE Sephadex s použitím 1 M HCOONH₄ jako elučního činidla pro účinnou extrakci nukleotidů, zvolili jsme jako další analytickou koncovku kapilární elektroforézu s UV/VIS detekcí.

Provedli jsme extrakci všech nukleotidů najednou (AMP, ADP, ATP) na jedné koloně naplněné gelem DEAE Sephadexem a po promytí jsme jako eluční činidlo nanесли na kolonu 1 M HCOONH₄. Odebírali jsme eluční frakce, které jsme poté analyzovali na kapilární elektroforéze.

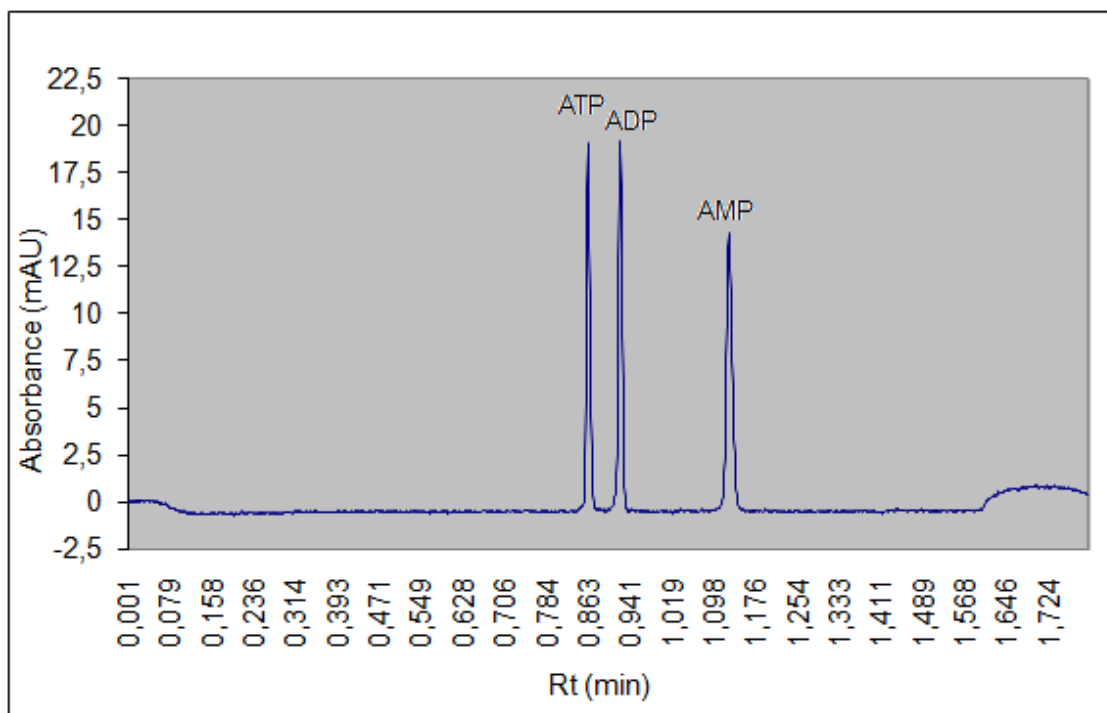
Ve výsledném grafu (Obr. 13) můžeme vidět, že jsme pomocí kapilární elektroforézy potvrdili předchozí výsledky získané na UV/VIS spektrofotometru. V případě AMP byla návratnost nukleotidů po extrakci 110%, u ADP 106% a ATP dosahovalo návratnosti 106%. Tyto výsledky přesahující 100% mohly být naměřeny z toho důvodu, že pro kontrolní vzorek byly připravovány nové roztoky standardních

látek (AMP, ADP, ATP), a tudíž mohlo dojít k nepřesnosti vážení či jiné manuální chybě.

S těmito výsledky se tedy tento separační protokol SPE DEAE Sephadex s použitím 1 M HCOONH₄ jako elučního činidla se potvrdil jako výhodný pro extrakci nukleotidů.



Obr. 13: Grafické znázornění návratností jednotlivých nukleotidů (AMP, ADP, ATP) ve frakci eluce metodou CE. Byla provedena extrakce nukleotidů na SPE DEAE Sephadexu a odebírány frakce po eluci 1 M HCOONH₄. Vzorky byly po extrakci analyzovány na kapilární elektroforéze Agilent_{3D} s detekcí UV/VIS při 268 nm v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm, celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm. Základním elektrolytem (BGE) byla 40 mM kyselina citronová s přidavkem 0,8 mM CTAB, titrována na pH= 4,4 kyselinou gama-minomáselnou. Všechny analýzy probíhaly pomocí tzv. Short-end analýzy.



Obr. 14: Elektroforetická separace nukleotidů. Měření elučních frakcí jednotlivých nukleotidů (ATP, ADP, AMP), získaných extrakcí SPE DEAE Sephadex s použitím 1 M HCOONH₄ jako elučního činidla. Vzorky byly po extrakci analyzovány na kapilární elektroforéze Agilent_{3D} s detekcí UV/VIS při 268 nm v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm, celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm. Základním elektrolytem (BGE) byla 40 mM kyselina citronová s přidavkem 0,8 mM CTAB, titrována na pH= 4,4 kyselinou gama-minomáselnou. Všechny analýzy probíhaly pomocí tzv. Short-end analýzy.

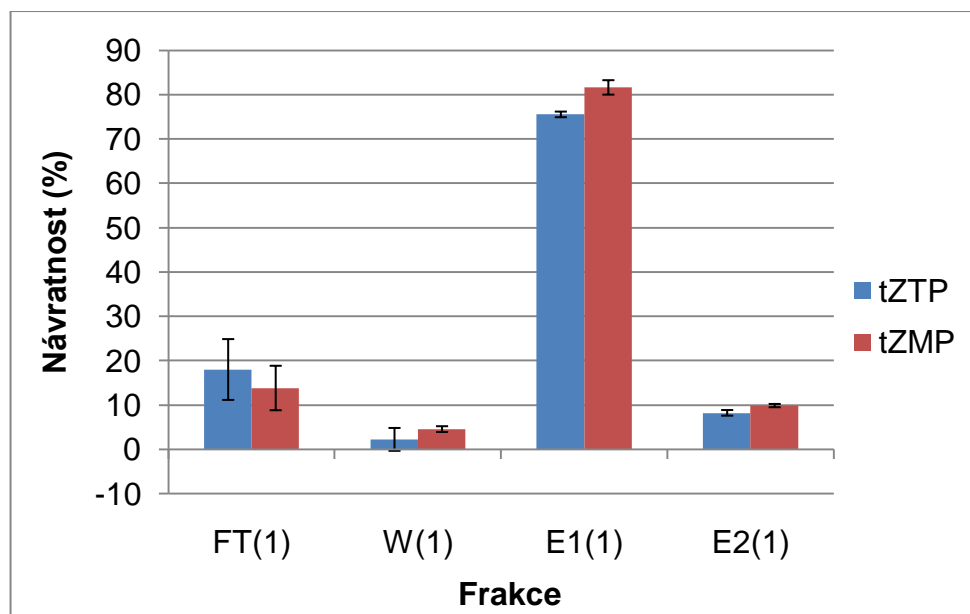
7. 3. 4. Extrakce tZMP, tZTP a jejich analýza pomocí HPLC-UV/VIS

Po ověření, že je metoda SPE se sorbentem Sephadex vhodná pro extrakci nukleotidů (AMP, ADP, ATP) s použitím 1 M HCOONH₄ jako elučního činidla, přistoupili jsme k analýzám vlastních cytokininových nukleotidů, a to tZMP a tZTP.

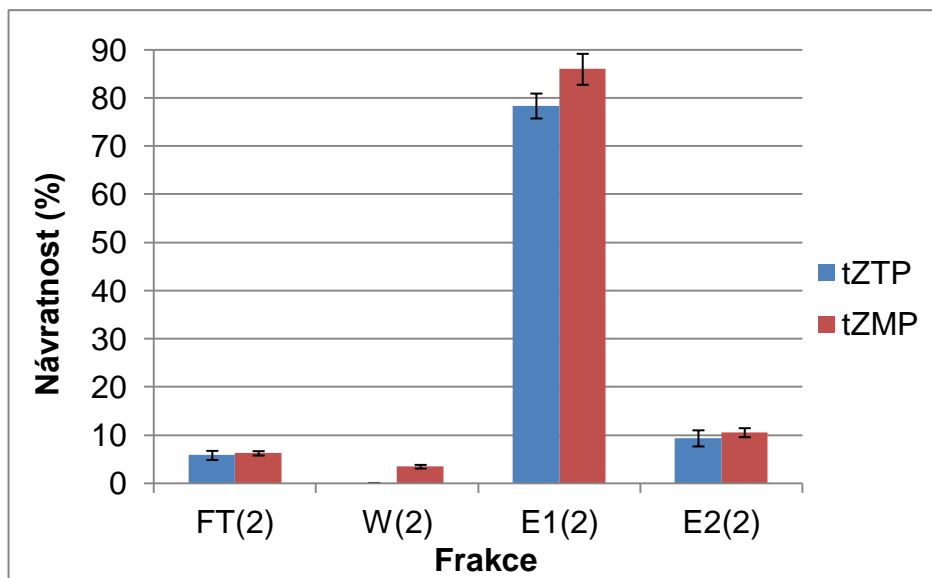
Cílem bylo potvrdit předchozí zjištění, že budeme schopni na koloně se sorbentem DEAE Sephadex účinně extrahovat CK nukleotidy a kvantitativně je eluovat z kolony ve frakci eluce (E).

V tomto experimentu jsme odebírali všechny jednotlivé frakce (FT, W, E1, E2) a experiment byl proveden ve dvou opakováních. Průměrné hodnoty všech analýz jsme zanesli pro jednotlivé extrakce do dvou grafů (Obr. 15, Obr. 16).

V grafech (Obr. 15, Obr. 16) 1. a 2. extrakce můžeme vidět, že se nám potvrdilo předchozí zjištění, že je vhodné eluční činidlo 1 M HCOONH₄ a většina podílu CK nukleotidů je eluována právě ve frakcích eluce (E1, E2). Nicméně můžeme pozorovat, že i v dříve odebraných frakcích (FT, W) došlo k eluci určitého podílu CK nukleotidů. A tím se potvrdila domněnka z předchozích analýz purinových nukleotidů (AMP, ADP, ATP), že se část molekul za daných experimentálních podmínek na sorbentu nezachytí.



Obr. 15: Grafické znázornění návratností tZMP a tZTP po 1. extrakci SPE DEAE Sephadex. Analýza frakce FT získané po nanesení vzorku směsi tZMP a tZTP v 10 mM HCOONH₄ na kolonu DEAE Sephadex, frakce W odebrané po promytí 5 ml destilované vody a elučních frakcí E1 a E2 po aplikaci 2 x 4ml 1 M HCOONH₄. Frakce byly analyzovány na HPLC-UV/VIS. Byla použita kolona Gemini NX 3 μm (150 x 2,00 mm). Mobilní fáze 20 mM CH₃COONH₄ (pH 10)/MeOH (93:7, v/v) o průtoku 0,2 ml/min a objem nástřiku 5 μl. Absorbance byly měřeny při vlnové délce 268 nm.



Obr. 16: Grafické znázornění návratností tZMP a tZTP po 2. extrakci SPE DEAE Sephadex. Analýza frakce FT získané po nanesení vzorku směsi tZMP a tZTP v 10 mM HCOONH₄ na kolonu DEAE Sephadex, frakce W odebrané po promytí 5 ml destilované vody a elučních frakcí E1 a E2 po aplikaci 2 x 4ml 1 M HCOONH₄. Frakce byly analyzovány na HPLC-UV/VIS. Byla použita kolona Gemini NX 3 μm (150 x 2,00 mm). Mobilní fáze 20 mM CH₃COONH₄ (pH 10)/MeOH (93:7, v/v) o průtoku 0,2 ml/min a objem nástřiku 5 μl. Absorbance byly měřeny při vlnové délce 268 nm.

Závěr

Teoretická část této bakalářské práce zpracovává téma cytokininy, jejich biologickou aktivitu a metabolismus. Dále pak extrakci metodou SPE, možnosti analýzy cytokininů se zaměřením na kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu.

Cílem v experimentální části bylo vypracování vhodné metody SPE pro izolaci cytokininových nukleotidů z rostlinných pletiv a jejich oddělení od sacharidů. Vzhledem k náročnosti této problematiky se nám ale nepodařilo v daném časovém úseku splnit tento cíl. Vypracovaný purifikační postup byl aplikován pouze na směsi modelových sloučenin (sacharosa a nukleotidy) ve vodných roztocích. S rostlinným extraktem jsem doposud nepracovala. Po zpracování výsledků jsme došli k následujícím zjištěním:

- Kolony Carbohydrate nejsou vhodné pro extrakci purinových nukleotidů z rostlinných pletiv kvůli silné interakci CK nukleotidů s uhlíkovým sorbentem.
- DEAE Sephadex je vhodný sorbent pro oddělení sacharidů od purinových nukleotidů.
- DEAE Sephadex je vhodný sorbent pro purifikaci CK nukleotidů. Kvantitativně váže CK nukleotidy a při použití 1M soli HCOONH_4 jako elučního činidla je možné eluovat i silně vázané trifosfáty. Dříve používané eluční činidlo (6% HCOOH) tuto schopnost nemá.
- Návratnosti (recovery) SPE (DEAE Sephadex) purifikace se pro $t\text{ZMP}$ a $t\text{ZTP}$ pohybují mezi 75-86%.

Dále ze získaných výsledků vyplývá, že bude zapotřebí navýšit objem SPE sorbentu a objem elučního činidla pro dosažení vyšší návratnosti daného purifikačního kroku. Následující experimenty budou věnovány vývoji dalšího purifikačního kroku ve snaze docílit co největšího stupně přečištění. Využit bude monolitický sorbent funkcionalizovaný kyselinou boritou (boronátová afinitní extrakce).

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
AtIPT	isopentenyltransferasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzyladenin
CKX	cytokinindehydrogenasa
CTAB	cetyltrimethylammoniumbromid
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DEAE Sephadex	dimethylaminoethyl Sephadex
DHZ	dihydrozeatin
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-bisoxazin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EOF	elektroosmotický tok
FAD	flavinadenindinukleotid
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GFP	green fluorescent protein
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií
IAA	kyselina indolactová
iP	isopentenyladenin
iPMP	isopentenylmonofosfát
iP9G	N ⁶ (2-isopentenyl)adenin-9-glukosid
iPR	isopentenyladenosin
IPT	isopentenyltransferasa
iPDP	isopentenyldifosfát
iPTP	isopentenytrifosfát

LC	kapalinová chromatografie
LOG	ribosid-5'-monofosfát fosforibohydrolasa (Lonely guy)
MVA	mevalonát
RP	chromatografie v systému reverzních fází
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie v systému reverzních fází
SPE	extrakce na pevné fázi
TFA	kyselina trifluoroctová
<i>t</i> RNA-IPT	<i>t</i> RNA isopentenyltransferasa
<i>t</i> Z	<i>trans</i> -zeatin
<i>t</i> ZMP	<i>trans</i> -zeatinmonofosfát
<i>t</i> ZTP	<i>trans</i> -zeatintrifofát
<i>t</i> ZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
UHPLC-MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s kombinovanou hmotnostní spektrometrií
Z	zeatin
ZR	zeatin ribosid

Seznam použité literatury

Ashikari M., Sakakibara H., Lin S.Y., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E.R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**, 741-745.

Ástot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G. (1998) Precolumn derivatization and capillary liquid chromatographic/frit-fast atom bombardment mass spectrometric analysis of cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Mass Spectrom.* **33**, 892-902.

Barciszewski J., Siboska GE., Pedersen BO., Clark BF., Rattan SI. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett.* **393**, 197–200.

Barták P., Bednář P., Stránský Z., Boček P., Vespalec R. (2000) Determination of dissociation constants of cytokinins by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **878**, 249-259.

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.

Bieleski R.L. (1964) Problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**, 431–442.

Bilyeu K., Cole J., Laskey J., Riekhof W., Esparza T., Kramer M., Morris R. (2001) Molecular and Biochemical Characterization of a Cytokinin Oxidase from Maize. *Plant Physiol.* **125**, 378–386.

Björkman P. O., Tillberg E., (1996) Acetylation of cytokinins and modified adenine compounds: A simple and non-destructive derivatization method for gas chromatography - Mass spectrometric analysis. *Phytochem. Anal.* **7**, 57-68

Brugière N., Humbert S., Rizzo N., Bohn J., Habben JE. (2008) A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. Cytokinin biosynthesis in maize. *Plant Mol.Biol.* **67**, 215–229.

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.

Dobrev P. I., Kamínek M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **950**, 21–29.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431–2452.

Frébortová J., Fraaije MW., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu KD., English JT., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121–130.

Frébortová J., Novák O., Frébort I., Jorda R. (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *Plant J.* **61**, 467–481.

Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.* **268**, 450–461.

Gaudinová A., Dobrev PI., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Friedecký D., Motyka V. (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Plant Growth Regul.* **24**, 188–200.

Ge L., Yong J.W.H., Tan S.N., Yang X.H., Ong E.S. (2004) Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **1048**, 119-126

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, capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* **829**, 26–34.

Ge L., Yong J.W.H., Tan S.N., Ong E.S. (2006) CE for cytokinin analyses: A review. *Electrophoresis* **27**, 4779-4791

Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **49**, 161–169.

Hauserová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajdúch M., Vydra D., Fuksová K., Strnad M. (2005) Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *J. Chromatogr. A* **1100**, 116-125.

Heldt H. W., *Plant Biochemistry* (2005), pp. 471-472, Academic press, USA

Hewett E. W., Wareing P. F. (1973) Cytokinins in *Populus x robusta* (Schneid): Light effects on endogenous levels, *Planta* **114**, 119-129

Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75–83.

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.

Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J., Wareing P. F. (1975) A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.

Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004) N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822–47832.

Imbault N., Moritz T., Nilsson O., Chen H. J., Bollmark M., Sandberg G. (1993) Separation and identification of cytokinins using combined capillary liquid chromatography/ mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 201-210

Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 677–685.

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

Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **279**, 14049–14054.

Klouda P. (2003) *Moderní analytické metody*, pp. 34–36, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, Česká republika.

Krall L., Raschke M., Zenk MH., Baron C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315–318.

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

Letham D.S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* **8**, 569–573.

Liu Z., Yuan BF., Feng YQ. (2012) Tandem solid phase extraction followed by online trapping-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry for sensitive detection of endogenous cytokinins in plant tissues. *Phytochem. Anal.* **23**, 559-568.

Luštinec J., Žárský V., Úvod do fyziologie vyšších rostlin (2005), pp. 191-196, Karolinum, ČR

Massonneau A., Houba-Hérin N., Pethe C., Madzak C., Falque M., Mercy M., Kopečný D., Majira A., Rogowsky P., Laloue M. (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *J. Exp. Bot.* **55**, 2549-2557.

Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392–1392.

Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. *Plant J.* **37**, 128–138.

Morris R.O., Blevins D.G., Dietrich J.T., Durley R.C., Gelvin S.B., Gray J., Hommes N.G., Kaminek M., Mathews L.J., Meilan R., Reinbott T.M., Sayavedrasoto L., Aust. J. Plant (1993) Cytokinins in plant-pathogenic bacteria and developing cereal-grains. *Physiol.* **20**, 621-637.

Morris RO., Bilyeu KD., Laskey JG., Cheikh NN. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 328–333.

Nordström A., Tarkowski P., Tarkowská D., Norbaek R., Åstot C., Dolezal K., Sandberg G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8039–8044.

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

Pacáková V., Štulík K., Vlasáková V., Březinová A. (1997) Capillary electrophoresis of cytokinins and cytokinin ribosides. *Journal of Chromatography A* **764**, 331-335.

Podlešáková K., Tarkowská D., Pěnčík A., Oklešťková J., Turečková V., Floková K., Tarkowski P. (2012) Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem. listy* **106**, 373-379

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998) Fyziologie rostlin, pp. 241–260, Academia Praha.

Sakakibara H. 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431–439.

Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., et al. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9972–9977.

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

Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**, 674–688.

Šmehilová M., Galuszka P., Bilyeu K., Jaworek P., Kowalska M., Šebela M., Sedlářová M., English J., Frébort I. (2009) Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *J. Exp. Bot.* **60**, 2701–2712.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 26405–26410.

Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J. Exp. Bot.* **53**, 971-977.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866–41872.

Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Ástot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(1)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol. Plant.* **117**, 579–590.

Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy* **98**, 834–841.

Tarkowski P., Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N. (2009) Analytical methods for cytokinins. *Anal.Chem.* **28**, 323-335

Tarkowski P. (2011) Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace. Habilitační práce.

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

Vyroubalová S., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* **151**, 433–447.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 1–20.

Yang Y.Y., Yamaguchi I., Kato Y., Wieler E.W., Murofushi N., Takahashi N. (1993) Qualitative and semi-quantitative analyses of Cytokinins using LC/APCI-MS in combination with ELISA. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 21-25.

Young C. S., Dolan J. W. (2003):

<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/082003/47198/article.pdf> (22. 7. 2013)