

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Imunomagnetická separácia bunkových kompartmentov

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Dorota Koničková
Študijný program:	B1501 Experimentální biologie
Študijný obor:	Experimentální biologie
Forma štúdia:	Prezenčné
Vedúci práce:	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Termín odovzdania práce:	2018

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Dorota Koníčková
Názov práce	Imunomagnetická separácia bunkových kompartmentov
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratoľ rastových regulátorů
Vedúci práce	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Táto bakalárska práca zhŕňa poznatky v oblasti izolácie vakuol zo suspenznej bunkovej kultúry a celých rastlín <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp Landsberg <i>erecta</i>. Dopĺňa poznatky spojené s experimentami naväzovania magnetických mikročastíc na ich povrch. Taktiež ukazuje metódy stanovenia čistoty izolovaných frakcií pomocou western blottingu. V závere sa zaoberá stanovením fytohormonálnych hladín auxínov a cytokinínov v týchto bunkových kompartmentoch metódami kvapalinovej chromatografie spojennej s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS).
Kľúčové slova	Imunoafinitná chromatografia, protilátky, magnetické častice, bunkové kompartmenty, vakuoly, fytohormóny, LC-MS
Počet strán	59
Počet príloh	2
Jazyk	Slovenský (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Dorota Koničková
Title of thesis	Immuno-magnetic separation of subcellular compartments
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	This bachelor thesis summarizes the knowledges in the filed of isolation vacuoles from suspension cell culture and plants <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Landsberg <i>erecta</i>. It complements the knowledges associated with the experiments of binding the magnetic microparticles on their surface. This work also shows methods for determining the purity of isolated fractions by western-blotting and phytohormone levels of auxins and cytokinins in this subcellular compartments by liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC-MS).
Keywords	Immunoaffinity chromatography, antibodies, magnetic particles, cell compartments, vacuols, plant hormones, LC-MS
Number of pages	59
Number of appendices	2
Language	Slovak (English)

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu vypracovala samostatne,
pod vedením doc. Mgr. Ondřeja Nováka, Ph.D za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

podpis

POĎAKOVANIE

Chcela by som sa poďakovať svojmu vedúcemu práce doc. Mgr. Ondřejovi Novákovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Vladimírovi Skalickému za odborné vedenie, trpezlivosť, cenné rady, ochotu a ústretovosť pri vypracovávaní tejto práce.

Ďalej by som sa chcela poďakovať RNDr. Martinovi Kubešovi, Ph.D. za ochotu a pomoc pri práci ako aj konzultáciu ohľadom protoplastovej kultúry a výsadby rastlín *Arabidopsis thaliana* a Mgr. Jane Oklešťkovej, Ph.D. za pomoc pri aplikácii magnetických častíc a konzultácii výsledkov. V neposlednom rade by som sa chcela poďakovať pracovníkom Laboratoře růstových regulátorů za pomoc pri práci v laboratóriu.

Táto diplomová práca bola realizovaná s podporou Grantovej agentúry Českej republiky (17-21581Y) a Internej grantovej agentúry Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2018_023).

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK.....	7
1 ÚVOD A CIELE PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1 Rastlinné hormóny.....	11
2.1.1 Auxíny	11
2.1.1.1 Auxínový signál.....	13
2.1.1.2 Biosyntéza a metabolizmus auxínov.....	13
2.1.1.3 Auxínový transport a distribúcia.....	15
2.1.2 Cytokiníny	16
2.1.2.1 Cytokinínový signál.....	17
2.1.2.2 Biosyntéza a metabolizmus cytokinínov	18
2.1.2.3 Cytokinínový transport a distribúcia.....	19
2.1.3 Homeostáza fytohormónov na bunkovej úrovni.....	20
2.1.3.1 Vakuoly.....	20
2.1.3.2 Ostatné bunkové kompartmenty a fytohormóny.....	21
2.2 Separácia rastlinných organel	22
2.2.1 Biochemické izolácie.....	22
2.2.2 Imunoafinitná izolácia	23
2.2.2.1 Protilátky pre imunoafinitnú purifikáciu	23
2.2.2.2 Imunoafinitné nosiče.....	25
2.3 Metódy analýzy rastlinných hormónov.....	25
2.3.1 Extrakcia a izolácia fytohormónov	25
2.3.2 Metódy detekcie fytohormónov.....	26
3 PRAKTICKÁ ČASŤ	29
3.1 Biologický materiál	29
3.2 Chemikálie.....	29
3.3 Pomôcky a prístroje	32
3.4 Metódy a postupy	33
3.4.1 Izolácia vakuol zo suspenznej kultúry buniek <i>Ath-Ler</i>	33
3.4.2 Výsev semien <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3.4.3 Izolácia vakuol zo 40 dní starých rastlín <i>Ath-Ler</i>	35
3.4.4 SDS-PAGE a western blotting	36
3.4.5 Extrakcia a purifikácia pre LC-MS/MS analýzu auxínov a cytokinínov.....	37
3.4.6 UHPLC–MS/MS	39
4 VÝSLEDKY	41
4.1 Izolácia vakuol	41
4.1.1 Aplikácia magnetických mikročastíc.....	42
4.2 Overenie čistoty frakcií vyizolovaných vakuol.....	43
4.3 Optimalizácia purifikácie fytohormónov zo vzoriek izolácie vakuol.....	43
4.4 Stanovenie cytokinínov a auxínov v protoplastoch a izolovaných vakuolách.....	45
5 DISKUSIA.....	48
6 ZÁVER	51
7 ZOZNAM LITERATÚRY	52
Príloha A – Návrhnosť fytohormónov pridaných do rôzne riedených izolačných pufrov	58
Príloha B – Voľba optimálneho množstva izolovaných vakuol.....	59

ZOZNAM SKRATIEK

1-NAA – kyselina 1-naftyloctová
2,4,5-T – kyselina 2,4,5-trichlórfenoxyoctová
2,4-D – kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
4-Cl-IAA – kyselina 4-chlór-indol-3-ylactová
ABCB – ATP-binding CASSETTE subfamily B glykoproteíny
ABCG14 – ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER subfamily G14
ABP1 – AUXIN BINDING PROTEIN 1
AFB – auxin signaling F-box protein
AHK – histidín kináza u *Arabidopsis*
AHP – histidín fosfotransferáza u *Arabidopsis*
APCI – chemická ionizácia atmosférického tlaku
ARF – AUXIN RESPONSE FACTOR
ARP – regulátor odpovede u *Arabidopsis*
Ath-Ler – *Arabidopsis thaliana* ekotyp Landsberg *erecta*
Aux – auxín
Aux/IAA – AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE
AUX1/LAX – AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX aminokyselinová permeáza
BA – N⁶-benzyladenín
CKs – cytokiníny
CKX – cytokinín oxidáza/dehydrogenáza
CYP735A – cytochróm P450 monooxygenáza
cZ – *cis*-zeatín
cZ7G – *cis*-zeatín N7-glukosid
cZ9G – *cis*-zeatín N9-glukosid
cZOG – *cis*-zeatín O-glukosid
cZR – *cis*-zeatín ribosid
cZRMP – *cis*-zeatín ribosid 5'-monofosfát
cZROG – *cis*-zeatín ribosid O-glukosid
DHZ – dihydrozeatín
DHZ7G – dihydrozeatín N7-glukosid
DHZ9G – dihydrozeatín N9-glukosid
DHZOG – dihydrozeatín O-glukosid
DHZR – dihydrozeatín ribosid
DHZRMP – dihydrozeatín ribosid 5'-monofosfát
DHZROG – dihydrozeatín ribosid O-glukosid
DMAPP – dimethylallyldifosfát

EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová
 EI – elektrónový dopad
 ENT – EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER
 ESI – ionizácia elektrosprejom
 FAB – bombardovanie rýchlym atómom
 GH3 – gretchen hagen 3
 HMBPP – 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-difosfát
 HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
 IAA – kyselina indol-3-ylactová
 IAA-Glc – indol-3-acetyl-1-O- β -D-glukóza
 IAAsp – *N*-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-asparagová kyselina
 IAC – imunoafinitná chromatografia
 IAGlu – *N*-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-glutamová kyselina
 IAOx – indol-3-ylacetaldoxim
 IBA – kyselina indol-3-ylmaslová
 IBR5 – INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSES
 IgG-HRP – kozia sekundárna protilátka proti králičiemu IgG konjugovaná s chrenovou peroxidázou
 ILR1 – IAA LEUCIN RESISTANT 1
 iP – N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenín
 iP7G – N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenín-N7-glukosid
 iP9G – N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenín-N9-glukosid
 iPR – izopentenyladenín ribosid
 iPRMP – izopentenyladenín ribosid 5'-monofosfát
 IPT – izopentenyltransferáza
 IPyA – indol-3-ylpyrohroznová kyselina
 LC – kvapalinová chromatografia
 LOG – cytokinín fosforibohydroláza 'LONELY GUY'
 LSB – vzorkovací pufor
 MALDI – laserová desorpčná ionizácia
 MeOH – methanol
 MEP – methylerythritol fosfát
 MES – 2-(*N*-morfolino)ethansulfónová kyselina
 MS – hmotnostná spektrometria
mT – topolíny s N^6 substituovaným benzylovým zvyškom hydroxylovaným v polohe *meta*
 MVA – mevalonátová dráha
 NAA – 1-naftalénoctová kyselina
oT – topolíny s N^6 substituovaným benzylovým zvyškom hydroxylovaným v polohe *orto*

oxIAA – 2-oxindol-3-ylactová kyselina
 PAA – kyselina fenyloctová
 PBI – protoplastovací pufo
 PES – protoplastovací enzymatický roztok
 PIF – fytohormón-interagujúci faktor
 PILS – PIN LIKES proteíny
 PIN – PIN FORMED proteíny
 pT – topolíny s N^6 substituovaným benzylovým zvyškom hydroxylovaným v polohe *para*
 PUPs – PURINE PERMEASES
 QqQ – trojitý kvadрупólový analyzátor
 RT – laboratórna teplota
 SAURs – SMALL AUXIN UP RNAs
 SCF^{TIR/AFB} – Skp1-Cullin-F-box
 SDS – dodecylsulfát sodný
 SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovom géli za prítomnosti dodecylsírany sodného
 SKP2A – S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A
 TAA1/TARs – TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED
 TBS – soľno-trisový pufo
 TBS-T – tris pufovací fyziologický roztok s prídavkom Tweenu[®] 20
 TIR1 – transport inhibitor response 1
 TIR1/AFB – TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX
 Tra – tryptamín
 tRNA IPT – tRNA izopentenyltransferáza
 tZ – *trans*-zeatín
 tZ7G – *trans*-zeatín N7-glukosid
 tZ9G – *trans*-zeatín N9-glukosid
 tZOG – *trans*-zeatín O-glukosid
 tZR – *trans*-zeatín ribosid
 tZRMP – *trans*-zeatín ribosid 5'-monofosfát
 tZROG – *trans*-zeatín ribosid-O-glukosid
 UGT84B1 – UDP-glukotransferáza
 UHPLC – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
 W5 – preplachovací pufo
 WAT1 – WALLS ARE THIN1
 WB – premývací pufo
 YUCCA – flavín monooxygenáza

1 ÚVOD A CIELE PRÁCE

Rastlinné hormóny alebo fytohormóny, sú neoddeliteľnou súčasťou každej rastliny. Jedná sa o organické zlúčeniny, na základe ktorých rastlina vyhodnocuje svoj rast, vývin, rozmnožovanie a smrť. V rastline sa tvoria v malých koncentráciách, pričom sú vylučované do medzibunkového priestoru, translokované do inej časti rastliny, kde vyvolávajú svoj efekt.

Je dokázané, že fytohormóny sa nachádzajú v rôznych koncentráciách aj v jednotlivých bunkových kompartmentoch, počnúc od jadra, cez chloroplasty, vakuoly až mitochondrie. Z tohto dôvodu bola vypracovaná štúdia, na základe ktorej sa optimalizujú postupy pre izoláciu jednotlivých bunkových kompartmentov či už biochemickou alebo imunomagnetickou metódou. Po vykonaní týchto postupov sa následne môže pokračovať so stanovovaním hladín a skupín fytohormónov v nich.

Táto bakalárska práca sa zaoberá izoláciou vakuol a následnými vyššie spomenutými metodikami. Snahou bolo vyizolovať bunkové kompartmenty v intaktnej forme. Dôležitým krokom taktiež zostáva optimalizácia a opakovanie postupov s čo najväčšou správnosťou a presnosťou, čo zahŕňa vytvorenie homogénnej protoplastovej kultúry bez kontaminácií či predčasnej lýzy buniek a dodržanie teplôt roztokov v diskontinuálnom hustotnom gradiente.

Ciele práce:

- Vypracovanie literárneho rešeršu zameraného na problematiku rastlinných hormónov, metodiky separácie vybraných organel, využitia chromatografických metód a hmotnostnej spektrometrie pri stanovení fytohormónov;
- Príprava imunomagnetických nosičov pre izoláciu vybraných bunkových kompartmentov (vakuol) zo suspenznej kultúry *Arabidopsis thaliana*;
- Zoznámenie sa s metódami izolácie vakuol a následná charakterizácia izolovaných bunkových kompartmentov (vakuol);
- Stanovenie vybraných skupín fytohormónov (auxíny, cytokiníny) v izolovaných kompartmentoch pomocou LC-MS.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rastlinné hormóny

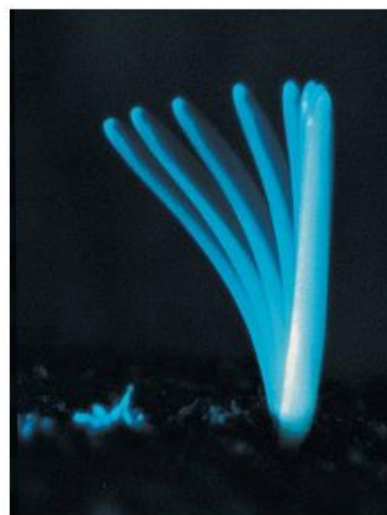
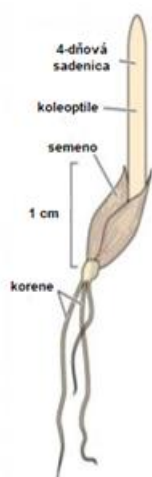
Rastlinné hormóny, známe aj pod pojmom fytohormóny, sú prirodzene sa vyskytujúcou skupinou organických substancií, ktoré sú syntetizované v jednej časti rastliny, následne sa translokujú do ďalšej, pričom regulujú fyziologické procesy v rastline ako rast, vývoj, plasticitu, senescenciu, reakciu na enviromentálne podnety už vo veľmi nízkych koncentráciách pomocou špecializovaného systému vnímania a transdukcie signálu (Davies, 2010; Tarkowska *et al.*, 2014). Tie sa pohybujú vo všeobecnosti rádovo od 10^{-6} do 10^{-9} mol/l (Pavlová, 2005), čo vykazuje podobnosť so živočíšnymi hormónmi. Ďalšou podobnosťou so živočíšnou ríšou je ich mechanizmus účinku (Macháčková, 1998) spočívajúci v tom, že fytohormóny prenášajú signál väzbou na receptory lokalizované na cytoplazmatickej membráne, v endoplazmatickom retikule, cytoplazme alebo v jadre (Chen *et al.*, 2002; Luštinec a Ľárský, 2005). Prenášaná informácia a následná odpoveď závisí na chemickej štruktúre látky a type receptora, na ktorý sa molekula viaže. Väzbou molekuly na receptor sa receptor aktivuje čím sa spustí kaskáda reakcií, ktoré vedú k odpovedi (Luštinec a Ľárský, 2005). Odlišným sú miesta produkcie. U živočíchov sa tvoria v endokrinných žľazách, ktorými rastlina nedisponuje, zatiaľ čo u rastlín sa vytvárajú vo viacerých častiach rastlinného tela, ktoré potom ovplyvňujú viaceré fyziologické procesy. Tieto procesy môžu byť často riadené viacerými fytohormónami naraz či už synergicky napríklad indukcia bunkového delenia alebo antagonisticky v prípade apikálnej dominancie (Macháčková, 1998).

Medzi klasické skupiny fytohormónov zaradujeme: auxíny, cytokiníny, etylén, gibberelíny, kyselinu abscisovú, brassinosteroidy a kyselinu jasmonovú (Taiz a Zeiger, 2010). Neskôr bola objavená aj ďalšia rodina fytohormónov – strigolaktóny. Sú však známe aj ďalšie skupiny látok napr. oligosacharidy, fenolické látky a polyamíny, ktoré pôsobia ako rastlinné regulátory a pravdepodobne majú účinok podporujúci rast (Tarkowska *et al.*, 2014).

2.1.1 Auxíny

Auxíny boli prvou objavenou skupinou rastlinných hormónov. Ich hlavný predstaviteľ – kyselina indol-3-ylactová (IAA) bola objavená približne pred 70 rokmi (zhrnuté v Ljung, 2013). Už v druhej polovici 19. storočia Charles Darwin a jeho syn Francis študovali rast rastlín, pričom dospeli k záveru, že je regulovaný signálom z jednej časti rastliny do druhej,

na čo rastlina fyziologicky reaguje rastom. Tento signál nazvali auxínom (z gréckeho slova „auxein“, čo znamená rásť) (Tarkowska *et al.*, 2014). Zaujímali sa predovšetkým o fototropizmus – ohyb rastlín smerom k svetlu. Zistili, že rastlina má orgán citlivý na svetlo, hlavne modré svetlo, nazývajúci sa koleoptile (Taiz a Zeiger, 2010; Obr. 1 a 2). Výsledkom ich štúdie bolo, že auxín stimuluje rast buniek viac na zatienenej časti koleoptile než na jej ožiarenej časti (Darwin a Darwin, 1880).



Obr. 1. Koleoptile (Taiz a Zeiger, 2010).

Obr. 2. Zakrivenie koleoptile za modrým svetlom (Briggs, 2014).

Účinok auxínov na rastlinný organizmus je dobre preskúmaný. Stimulujú zväčšovanie buniek, bunkové delenie, a to hlavne v kambiu, diferenciáciu cievneho pletiva – floému a xylému, tvorbu laterálnych koreňov, predlžovanie stonky, apikálnu dominanciu, senescenciu, ovplyvňujú fototropizmus a gravitropizmus rastliny, dozrievanie a rast plodov, a v neposlednom rade aj embryogenézu a kvitnutie (Davies, 2010; Estelle *et al.*, 2011). V niektorých prípadoch, ako je rast koreňa však môže byť pôsobenie auxínov inhibičné, predovšetkým z dôvodu ich vysokej koncentrácie. Vo veľa prípadoch, ako už bolo vyššie spomenuté, však pôsobia s radou ďalších fytohormónov, predovšetkým cytokinínov (Davies, 2010).

Dnes rozoznávame okrem IAA ďalšie tri prirodzene aktívne auxíny: kyselina indol-3-ylmaslová (IBA), 4-chlór-indol-3-ylacetát (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA) (Korasick *et al.*, 2013). Ďalšou významnou skupinou auxínov sú ich umelo pripravené štruktúrne analógy, tzv. syntetické auxíny. Medzi ich zástupcov patrí napríklad kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D), 2,4,5-trichlórfenoxyoctová (2,4,5-T) a 1-naftyloctová (1-NAA). V tomto prípade ide o rastové regulátory vykazujúce pri nízkych koncentráciách rovnakú alebo veľmi podobnú auxínovú biologickú aktivitu: schopnosť stimulácie rastu

buniek v koleoptile a koreňovom meristéme, a tak ovplyvňujú tvorbu koreňov (definované podľa Went, 1934).

2.1.1.1 Auxínový signál

Auxín funguje tak, že spúšťa transkripčnú odpoveď na úrovni cieľových génov prostredníctvom jeho účinkov na transkripčný faktor ARF (aktivitu faktoru odpovedajúceho na jeho signály – AUXIN RESPONSE FACTOR). Pri nízkych hladinách IAA pôsobia transkripčné faktory Aux/IAA (AUXIN/INDOLE 3-ACETIC ACID INDUCIBLE) s ARF ako represor. Avšak v prítomnosti IAA sa proteíny TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/ AUXIN SIGNALING F-BOX) viažu na transkripčné represory Aux/IAA a umožňujú ich polyubiquitináciu a následnú proteozomálnu degradáciu. Polyubiquitinácia transkripčných represorov Aux/IAA vyžaduje komplex E3 ubiquitín ligázu Skp1-Cullin-F-box ($SCF^{TIR/AFB}$). Tento komplex viaže substrát Aux/IAA spôsobom závislým na auxíne prostredníctvom proteínu TIR1 alebo AFB F-box. Biochemické štúdie odhalili, že oba TIR1/AFB aj Aux/IAA proteíny sú potrebné pre vysoko afinitnú väzbu auxínu, čo naznačuje, že tieto proteíny môžeme nazývať auxínové korepresory, pričom auxín vystupuje ako molekulové „lepidlo“, ktoré stabilizuje systém TIR1/AFB-Aux/IAA (Lavy a Estelle, 2016).

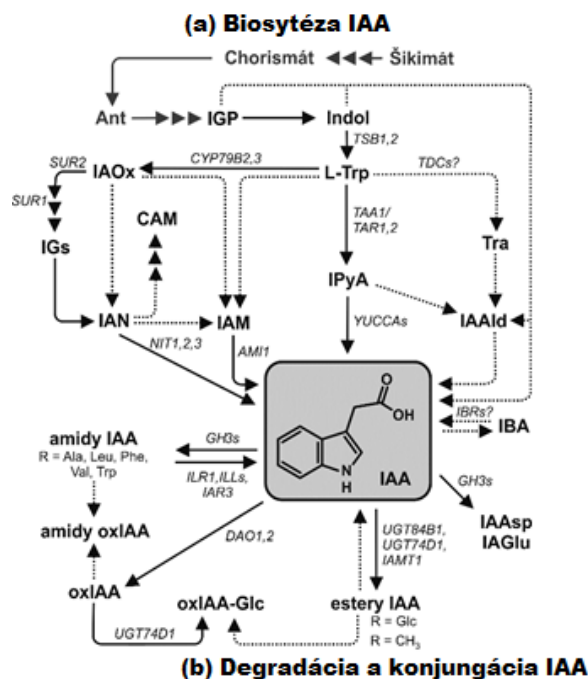
Zatiaľ čo signálna TIR1/AFB dráha je na molekulárnej úrovni plne vysvetlená (Wang a Estelle, 2014), funkcie ostatných faktorov hrajúcich úlohu v odpovedi na auxínové stimuly neboli doposiaľ celkom pochopené (Powers a Strader, 2016). Jedná sa napríklad o F-box protein S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A), ktorý by mohol prepojiť auxíny s reguláciou bunkového delenia: SMALL AUXIN UP RNAs (SAURs), proteíny, ktoré sú pravdepodobne zapojené do delenia buniek: INDOLE 3-BUTYRIC ACID RESPONSE 5 (IBR5), ktorý defosforyluje mitogénom aktivované proteínkinázy a reguluje tak schopnosť reagovať na auxínové podnety a AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1).

2.1.1.2 Biosyntéza a metabolizmus auxínov

Z chemického hľadiska sú IAA, IBA a 4-Cl-IAA syntetizované deriváty indolu vyskytujúce sa v listových primordiách, mladých listoch alebo v klíčiach semenách (Davies, 2010). Existujú 2 hlavné biosyntetické dráhy IAA (Obr. 3), a to: nezávislá na L-tryptofáne (L-Trp) a Trp-závislá dráha (Korasick *et al.*, 2013). Na tvorbe IAA z L-Trp sa podieľajú 4 biosyntetické dráhy pomenované podľa ich prvých medziproduktov: indol-3-

ylacetaldoxim (IAOx), indol-3-ylacetamid (IAM), indol-3-ylpyrohroznová kyseliny (IPyA) a tryptamín (Tra). Predpokladá sa, že biosystetické dráhy sú lokalizované na plastidoch a v cytozole, v závislosti na štúdiách lokalizácie enzýmov a prítomnosti tranzitných peptidov, ktoré sa na nich podieľajú. Samotná biosyntéza je silne regulovaná rozpustnými cukrami a sprostredkovaná fytochróm-interagujúcim faktorom (PIF) (Ljung, 2013). Nedávno bolo objasnené, že najdôležitejšou biosyntetickou dráhou pre tvorbu IAA v *Arabidopsis thaliana* je dvojkroková reakcia $L\text{-Trp} \rightarrow \text{IPyA} \rightarrow \text{IAA}$ (zhrnuté v Zhao, 2012). V prvom kroku sa za účasti enzýmov TAA1/TArS z proteínovej rodiny TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED premieňa L-Trp na IPyA, z ktorej je následnou dekarboxyláciou a oxidáciou vytvorená IAA za pôsobenia flavínových monooxygenáz z rodiny YUCCAs. Bolo popísané, že YUCCA enzýmy v rôznych rastlinných druhoch plnia odlišné funkcie. U *Arabidopsis* regulujú vývojové procesy, ako je embryogenéza, kvitnutie, rast listov, plodov a vaskulárny vývoj, na rozdiel od kukurice, kde jemu podobný gén reguluje vegetatívny a reprodukčný vývoj (Ljung, 2013).

Hladina IAA v rastlinách aj v bunkách je prísne regulovaná. Biosyntéza, následná modifikácia či metabolizácia a transport patria medzi hlavné mechanizmy zapojené v udržaní homeostázy. IAA môže byť deaktivovaná niekoľkými spôsobmi, napr. katabolickou oxidáciou (dekarboxyláciou, nedekarboxyláciou) alebo konjugáciou na cukry a aminokyseliny (Korasick *et al.*, 2013; Normanly, 2010). Konjugáty majú transportnú, zásobnú a deaktiváciu funkciu, čím zaisťujú udržovanie auxínovej homeostázy (Ludwig-Müller, 2011). Bolo preukázané, že nadmerná expresia jednej z UDP-glukosyltransferáz (UGT84B1) vedie k akumulácii indol-3-ylacetyl-1-O- β -D-glukózy (IAA-Glc) a súčasne sa prejaví narušením gravitropizmu (Jackson *et al.*, 2002). Zatiaľ čo nevratná oxidácia IAA bola na úrovni génov popísaná len nedávno (Zhao *et al.*, 2013; Porco *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016a), proteínová rodina GH3 (GRETCHEN HAGEN 3) zodpovedná za konjugáciu aminokyselín nielen s IAA je dlhodobo študovaná (Staswick *et al.*, 2005). V prítomnosti špecifických aminohydroláz (napr. IAA-LEUCIN RESISTANT 1, ILR1) sú konjugáty s niektorými aminokyselinami (napr. s leucínom) spätne degradované na voľnú IAA (Ludwig-Müller, 2011), avšak u *Arabidopsis* najviac abundantné aminokyselinové konjugáty (IAA-aspartát, IAAsp; IAA-glutamát, IAGlu) nepodliehajú hydrolýze a sú teda súčasťou katabolických procesov (Östin *et al.*, 1998).



Obr. 3. Schéma metabolismu kyseliny indol-3-yloctovej (IAA); upravené podľa Pěnčík et al. (2018).

(A) IAA môže byť syntetizovaná L-tryptofán (Trp)-nezávislou dráhou, štyrmi Trp-závislými dráhami alebo konvertovaná β -oxidáciou z kyseliny indol-3-ylmaslovej (IBA); (B) aktivita voľnej IAA je potom kontrolovaná jej oxidáciou, metyláciou či konjugáciou s cukrami alebo aminokyselinami – Ant kyselina anthranilová; CAM, kamalexin; IAAld, indol-3-ylacetaldehyd; IAM, indol-3-ylacetamid; IAN, indol-3-ylacetonitril; IAOx, indol-3-ylacetaldoxim; IGP, indol-3-ylglycerol fosfát; IGs, indol-3-ylmethyl glukosinoláty; IPyA, kyselina indol-3-ylpyrohroznová; Tra, tryptamín; IAAsp, N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-asparagová kyselina; IAGlu, N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-glutamová kyselina; oxIAA, 2-oxindol-3-yloctová kyselina; oxIAA-Glc, 2-oxindol-3-acetyl-1-O- β -D-glukóza. Enzýmy a gény zapojené v IAA metabolizme: AMI, amidáza; CYP79B, cytochrom P450 monooxygenáza; DAO, dioxygenase for auxin oxidation 1; GH3, gretchen hagen 3; IAMT, methyl transferáza; IAR, IAA-alanin resistant; IBR, IBA response; ILL, IAA-leucin resistant-like; ILR, IAA-leucin resistant; NIT, nitriláza; SUR, superroot; TAA, tryptofán aminotransferáza u Arabidopsis; TAR, tryptofan aminotransferase related; TDC, tryptofán dekarboxyláza; TSB, tryptofán syntáza β ; UGT, uridin 5'-difosfoglukosyltransferáza; YUCCA, flavín monooxygenáza.

2.1.1.3 Auxínový transport a distribúcia

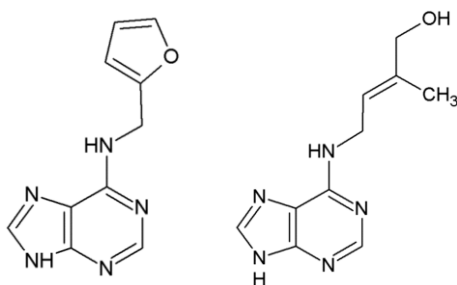
Auxíny sú prirodzenou zložkou floému, kde je ich množstvo fyziologicky vyvážené (Baker, 2000). V xyléme sa vyskytujú len zvyšky endogénnej IAA, preto je nepravdepodobné, že xylém slúži ako transportná cesta na dlhé vzdialenosti. Naopak IAA, ktorá sa dostane do floému, je pasívne prijímaná a radou transportérov vypudzovaná v mieste potreby, a to aj na dlhé vzdialenosti (Davies, 2010). Jedná sa o značne komplexný proces. Diaľkový transport IAA z koreňov do pletív je dôležitý pre vývojové procesy, ako je vývoj laterálnych koreňov a ich vetvenie, zatiaľ čo transport na krátke vzdialenosti je považovaný za dôležitý z hľadiska nastavenia maxim a minim IAA gradientov v rôznych pletivách (Ljung, 2013). Pre transport z bunky do bunky je využívaný polárny aktívny transport, ktorý je kombináciou

chemiosmotickéj sily, hydrolýzy ATP a auxínových prenášačov (Reemmer a Murphy, 2014). Hlavnými proteínovými prenášačmi auxínov podieľajúcich sa na polárnom transporte sú AUXIN RESISTANT 1 a LIKE AUX (AUX1/LAX) zo subrodiny aminokyselinových permeáz prispievajúcich k jednosmernému vtoku auxínov (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2008), transmembránové proteíny z rodiny PIN-FORMED (PIN) špecificky vynášajúce molekuly auxínu von z bunky, P-glykoproteíny patriace do rodiny ABCB (ATP-BINDING CASSETTE subfamily B) transportérov a PIN-LIKES (PILS) proteíny so štruktúrnou podobnosťou k proteínom PIN zabudovaným v membráne endoplazmatického retikula (Barbez *et al.*, 2012).

2.1.2 Cytokiníny

Prirodzene sa vyskytujúce cytokiníny sú organické zlúčeniny, štruktúrne N^6 deriváty adenínu, charakteristické schopnosťou indukovať bunkové delenie v prítomnosti auxínu. Cytokiníny sa radia medzi stimulatory, pretože sú účinné už v nízkych koncentráciách – 10^{-10} - 10^{-15} mol/g čerstvej hmoty (Tarkowski *et al.*, 2004). Okrem prirodzene sa vyskytujúcich cytokinínov rozoznávame aj skupinu syntetických močovínových a tiomočovínových derivátov, medzi ktoré patria napríklad thidiazuron alebo N,N'-difenyľmočovina.

Historicky prvým objaveným cytokinínom bol však 6-furfurylaminopurín (kinetín; Obr. 4) profesorom Skoogom a jeho kolektívom (Skoog *et al.*, 1970), izolovaný z autoklávovanej DNA sledích spermii tímom Millera (1955). Ďaleko významnejším predstaviteľom však je *trans*-zeatín (*tZ*; Obr. 4) (Davies, 2010), ktorý bol izolovaný z nezrelého endospermu kukurice (Skoog *et al.*, 1970). Spolu s N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenínom (iP), *cis*-zeatínom (cZ), dihydrozeatínom (DHZ) patria medzi izoprenoidné cytokiníny. Medzi aromatické cytokiníny zaradujeme N^6 -benzyladenín (BA) a topolíny s N^6 -substituovaným benzylovým zvyškom hydroxylovaným v polohách *ortho*, *meta* a *para* (oT, mT, pT). iP a tZ zohrávajú hlavnú fyziologickú úlohu v mnohých rastlinných druhoch, zahrňujúc *A. thaliana* (Osugi a Sakakibara, 2015). Prirodzene sa cytokiníny vyskytujú v štyroch hlavných metabolických formách. Nukleotidy, ktoré sa produkujú počas biosyntézy *de novo*, a následne môžu byť prevedené na voľné bázy, charakteristické najvyššou aktivitou, ribosidy významné transportné formy a v neposlednom rade O- a N-glukosidy, ktoré sa vyskytujú v inaktívnej forme (Jiskrová *et al.*, 2016).



Obr. 4. Chemické štruktúry kinetínu (vľavo) a trans-zeatínu (vpravo).

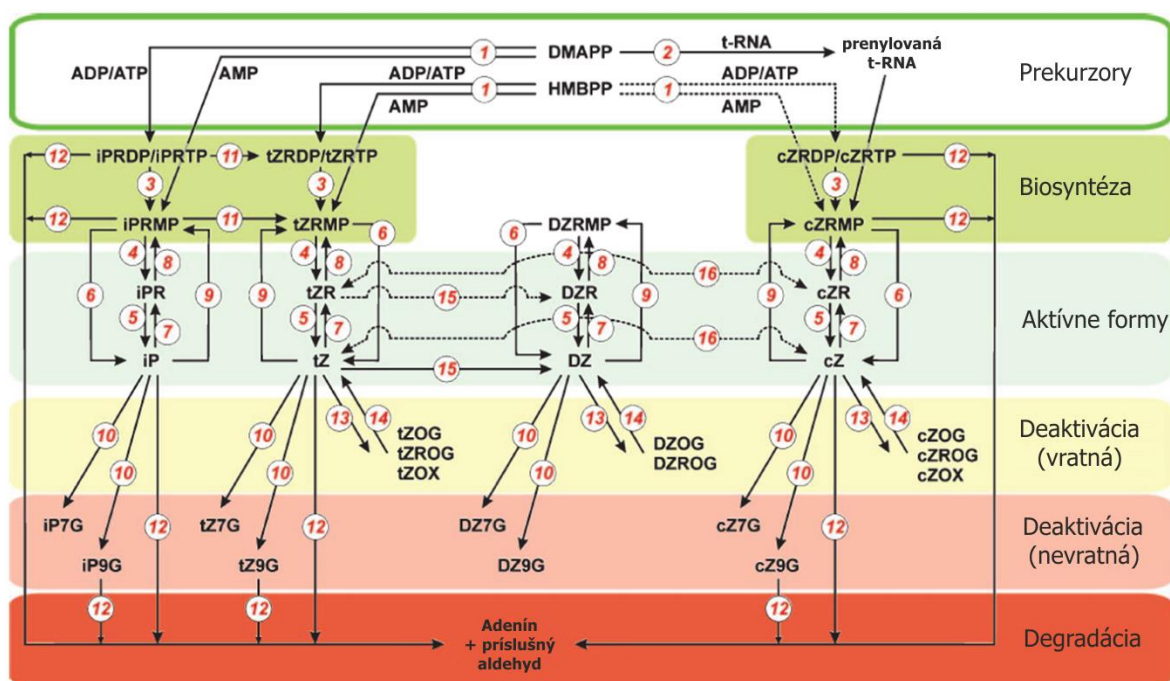
V rastlinnom organizme majú cytokiníny vplyv na bunkové delenie, morfogénu, rast bočných pupeňov, rozširovanie listov, oddľujú senescenciu, zvyšujú odolnosť voči stresom, riadia vývoj chloroplastov a u niektorých druhov rastlín regulujú otváranie prieduchov (Davies, 2010). Taktiež sú vhodným cieľom genetických manipulácií, ktoré prinášajú výhody biotechnologických aplikácií. Medzi najvýznamnejšie patrí schopnosť sprostredkovať obranné reakcie k enviromentálnym stresom, ako je salinita alebo sucho (Zalabák *et al.*, 2013; Jiskrová *et al.*, 2016).

2.1.2.1 Cytokinínový signál

Biologickú aktivitu a schopnosť viazať sa na receptory priamo ovplyvňujú štruktúrne modifikácie postranných reťazcov chemickej štruktúry (Jiskrová *et al.*, 2016). Prirodzené aj syntetické cytokiníny sú rozoznávané cytokinínovými receptormi, často s rozdielnou afinitou. Cytokinínový signál je sprostredkovaný viacstupňovým dvojkomponentným systémom (TCS), ktorý sa skladá z hybridnej histidín kinázy (HK, HISTIDIN KINASE), spojovacieho prvku (HPt, HISTIDIN PHOSPHOTRANSFER) a regulátoru odpovede (RR, RESPONSE REGULATOR). Nedávne štúdie ukázali, že cytokinínové receptory u *Arabidopsis* AHK sú lokalizované nielen na plazmatickej membráne (Kim *et al.*, 2006), ale takisto aj na endoplazmatickom retikule (Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011; Wulfetange *et al.*, 2011). Po naviazaní cytokinínu na AHK doménu dochádza k autofosforylácii, a potom pomocou proteínov AHP k prenosu fosfátovej skupiny na proteíny ARP umiestnené v jadre, ktoré aktivujú transkripciu. Výsledkom je odpoveď na cytokinínový signál, ktorý zahŕňa expresiu regulujúcich génov, napr. spätnú inhibíciu a degradáciu cytokinínov, bunkový cyklus alebo antagonistický vzťah medzi cytokinínmi a auxínmi (Zürcher a Müller, 2016).

2.1.2.2 Biosyntéza a metabolismus cytokinínov

Metabolické dráhy cytokinínov sa môžu klasifikovať do 3 typov: modifikácie adenínovej časti, enzýmy ovplyvňujúce N^6 -bočný reťazec a štiepenie (Obr. 5). Pri modifikácii adenínovej časti sú procesy sprostredkované purínovými metabolickými dráhami, no neexistuje enzým plne špecifický pre cytokiníny (modifikácia pomocou enzýmov 5'-nukleotidáza, adenosín nukleosidáza, purín-nukleosid phosphoryláza, adenosín kináza a adenín phosphoribozyltransferáza) na rozdiel od enzýmov modifikujúcich bočný reťazec, kde špecifické enzýmy pre cytokiníny existujú (zeatín izomeráza, zeatín reduktáza, hydroxyláza) (Davies, 2010). Izoprenoidné postranné reťazce iP a tZ pochádzajú prevažne z methylerythritol fosfátu (MEP), zatiaľ čo veľká časť cZ je odvodená z mevalonátovej dráhy (MVA). Biosyntéza aromatických CKs nebola doposiaľ vysvetlená.



Obr. 5. Schéma cytokinínového metabolismu – biosyntézy, deaktivácie a degradácie (upravené podľa Spíchal, 2012). iP, N^6 -izopentenyladenín, iPR, N^6 -izopentenyladenosín, iPRMP, N^6 -izopentenyladenosín monofosfát, iPRDP, N^6 -izopentenyladenosín difosfát, iPRTP, N^6 -izopentenyladenosín trifosfát, iP7G, N^6 -izopentenyladenín- N^7 -glukosid; iP9G, N^6 -izopentenyladenín- N^9 -glukosid a podobne pre trans-/cis-zeatín (tZ/cZ) a dihydrozeatín (DZ); tZOG, trans-zeatín-O-glukosid, tZROG, trans-zeatín-O-glukosid ribosid a podobne pre DHZ a cZ; tZOX, trans-zeatín-O-xylosid, cZOX, cis-zeatín-O-xylosid; DMAPP, dimetylallyldifosfát; HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-difosfát. Príslušné enzýmy sú značené červenými číslami: (1) adenosín fosfát-izopentenyltransferáza; (2) tRNA-izopentenyltransferáza; (3) fosfatáza; (4) 5'-ribonukleotid fosforyláza; (5) adenosín nukleosidáza; (6) cytokinín fosforibohydroláza 'Lonely guy'; (7) purín nukleosid fosforyláza; (8) adenosínkináza; (9) adenín fosforybosl-transferáza; (10) N-glukosyltransferáza; (11) cytochróm P450 monooxygenáza; (12) cytokinín oxidáza/dehydrogenáza (CKX); (13) zeatín-O-glukosyltransferáza/zeatín-O-xylosyltransferáza; (14) β -glukosidáza; (15) zeatín reduktáza; (16) zeatín izomeráza.

Cytokinínová biosyntéza je regulovaná tromi kľúčovými enzýmami: (1) *adenosín fosfát-izopentenyltransferáza* (IPT) katalyzujúci formovanie iP ribonukleotidov; (2) *cytochróm P450 monooxygenáza* (CYP735A) hydroxylujúci postranný izopentenylový reťazec; a (3) *fosforibohydroláza* LONELY GUY (LOG) konvertujúca nukleosidové monofosfáty na aktívnu formu CK (voľné bázy). Ďalšou dráhou biosyntézy CK je tRNA prenylácia adenínu na 3'konci antikodónu, katalyzovaná enzýmom tRNA-IPT vedúca k produkcii cZ foriem (Golovko *et al.*, 2002). Tieto štrukturálne zmeny vedú k reverzibilnej alebo ireverzibilnej strate aktivity CK a k určeniu funkcie a kompartmentalizácii príslušného cytokinínového metabolitu. Enzýmy všeobecného purínového metabolizmu môžu taktiež konvertovať adenínový kruh cytokinínu na príslušný nukleozid, prípadne nukleotid (Spíchal, 2012). Finálna degradácia cytokinínov býva realizovaná katalýzou cytokinín oxidázou/dehydrogenázou (CKX), ktorá využíva ireverzibilnú oxidáciu na exocyklickom dusíku za vzniku adenínu a aldehydu odpovedajúcemu postrannému reťazcu (Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2004)

2.1.2.3 Cytokinínový transport a distribúcia

Transport cytokinínov z koreňov do nadzemných častí rastliny, predovšetkým listov, je sprostredkovaný xylémom (Davies, 2010). Tam prechádzajú do floému a následne do cieľových orgánov (Macháčková, 1998; Pavlová, 2005). Molekulárny mechanizmus toho kroku bol však dlhodobo nevysvetliteľný. Nedávno bola dokázaná existencia ATP viažuceho kazetového transportéru (ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER subfamily G14, ABCG14) v *Arabidopsis*, ktorý je nevyhnutný pre translokáciu cytokinínov (hlavne tZ) syntetizovaných koreňmi, pričom podporuje aj rast výhonkov (Zhang *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2016). ABCG14 je lokalizovaný na úrovni buniek na plazmatickej membráne, v rastline je exprimovaný primárne v pericykle a stelárnych bunkách koreňa. U C3 a C4 rastlín pôsobí ako efluxné čerpadlo nakoľko jeho prítomnosť priamo koreluje s transportom cytokinínov. Vyradenie ABCG14 výrazne zhoršuje translokáciu tZ typov cytokinínov z koreňov na výhonky, čo narušuje prirodzený rast a vývoj rastlín. Vo všeobecnosti teda môžeme povedať, že sa jedná o transportér prenosu na dlhé vzdialenosti (Zhang, 2014). Ďalšími objavenými transportérmi cytokinínov sú aj purínové permeázy (PURINE PERMEASES, PUP1 a PUP2) a ekvilibračné nukleozidové transportéry (EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER, ENT). Tieto 2 naposledy spomenuté transportéry sa vyskytujú na plazmatickej membráne (Šmehilová *et*

al., 2016), no nie je žiaden potvrdzujúci dôkaz, že účinkujú aj endogénne, ako je to v prípade ABCG14 (Ko *et al.*, 2014).

2.1.3 Homeostáza fytohormónov na bunkovej úrovni

Rastlinné aj živočíšne bunky sú základnou stavebnou jednotkou organizmu. Radia sa spolu do kmeňa eukaryotických buniek, čo znamená, že ich stavba je značne zložitejšia v porovnaní s prokaryotickou bunkou. Na rozdiel od prokaryotických buniek sú zložitejšie v stavbe ale aj vo vnútrobunkovom usporiadaní, kde nachádzame rôzne kompartmenty. Stavbou sa živočíšne a rastlinné bunky značne od seba nelíšia. Jediným rozdielom je prítomnosť bunkovej steny na povrchu rastlinných buniek. Medzi kompartmentami nachádzame vnútornú kostru bunky – cytoskelet, mitotický aparát, centriolu, deliace vretienko, chromozómy, jadierko a jadro, ktoré zodpovedajú za správne rozdelenie buniek v rámci bunkového cyklu. Rozdiely, ktoré sú zreteľné medzi rastlinnou a živočíšnou bunkou sú tie, že rastlinná bunka vo svojom usporiadaní obsahuje plastidy a vakuoly. Ostatné organely ako mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, ribozómy, poprípade inklúzie ako zásobné látky nachádzame v oboch prípadoch.

2.1.3.1 Vakuoly

Vakuoly sú jedinečné, multifunkčné organely rastlinnej bunky, ohraničené membránou nazývanou tonoplast (Procházka *et al.*, 1998). Vakuola zaberá najväčšiu časť (80-90%) plne diferencovanej rastlinnej bunky. Avšak zastúpenie tohto kompartmentu v bunke sa mení v závislosti na štádiu vývoja a druhu rastliny (Taiz a Zeiger, 2010). U rastlín plnia rôzne, biologicky významné funkcie – upravujú pH, skladujú zásobné látky, živiny, sekundárne metabolity (nikotín, alkaloidy z cytoplazmy), pigmenty, najmä antokyany, prebiehajú tu detoxifikačné procesy, slúžia k inaktivácii xenobiotík, toxínov a fenolických látok (Procházka *et al.*, 1998; Trentmann a Haferkamp, 2013). Ďalšími významnými funkciami sú udržiavanie homeostázy a rast bunky (Reisen *et al.*, 2005).

Tonoplast zabezpečuje akumuláciu iónov, cukrov a proteínov vo vakuolárnom obsahu v oveľa vyšších koncentráciách, ako sú v okolitej cytoplazme. Vysoká koncentrácia osmoticky aktívnych látok poskytuje hnaciu silu pre príjem vody vakuolou čím sa vytvára tlak tonoplastu na bunkovú stenu nazývaný turgor, čo je ďalšou významnou funkciou tohto oddielu. Tento tlak je dôležitý na predlžovanie a rast buniek. Turgor ďalej poskytuje štrukturálnu tuhosť potrebnú pre vzpriamený rast bylín, nakoľko nemajú potrebné lignifikované pletivo, ako je tomu u drevín (Taiz a Zeiger, 2010).

Vakuoly sa taktiež zúčastňujú na premene makromolekúl tak, ako to robia im príbuzné lyzozómy u živočíchov. Ich degradačné enzýmy uniknú vo fáze senescencie do cytozolu, čím pomáhajú recyklovať cenné živiny do „živých“ častí rastliny, nakoľko obsahujú hydrolytické enzýmy zahrňujúce proteázy, hydrolázy a glykosilázy (Taiz a Zeiger, 2010) čím umožňujú priebeh väčšiny hydrolytických procesov (Taiz a Zeiger, 2010; Ramos *et al.*, 2011).

Okrem obsahu uvedeného vyššie, niektoré dôkazy ukazujú, že vakuoly sú organely pre akumuláciu hormonálnych metabolických produktov, ktoré sa podieľajú na udržiavaní homeostázy. O-glukosidy cytokinínu zeatínového typu sa hromadia vo vakuolách tabaku (Zhang *et al.*, 2015), metabolit giberelínu A8-glukosid je preferenčne umiestnený vo vakuolách jačmeňa a jeden z hlavných metabolitov kyseliny salicylovej, jej glukosyl ester, je nabohtený vo vakuolách suspenznej kultúry buniek tabaku.

Jiskrová *et al.* (2016) nedávno ukázali distribúciu odlišných foriem CKs medzi vakuolami, cytozolom a extracelulárnym priestorom. Len 10% celkového obsahu cytokinínov bolo vo vnútri bunky (3% v cytoplazme, hlavne vo forme aktívnych CK bází a ribozidov a 7% CKs vo vakuole), zatiaľ čo väčšina cytokinínov bola akumulovaná ako inaktívne metabolity (glukosidy) v extracelulárnom priestore. Neprítomnosť aktívnych foriem CKs v apoplaste môže byť vysvetlená lokalizáciou mnohých CKX izoformami (Werner *et al.*, 2003). Súčasne CKX7 hrá úlohu v cytoplazme (Köllmer *et al.*, 2014) a CKX1 s CKX3 vo vakuole (Werner *et al.*, 2003). V neposlednej rade auxín a jeho metabolity sa nachádzajú v rastlinných vakuolách, pričom zohrávajú dôležitú úlohu pri transporte cez tonoplast a tým udržiavajú homeostázu (Zhang *et al.*, 2015). Transport cez tonoplast je sprostredkovaný auxín-vakuolárnym transportérom WAT1, ktorý je lokalizovaný priamo na tonoplaste pričom exportuje auxín z vakuoly do cytoplazmy ako protónový symportér (Ranocha *et al.*, 2013).

2.1.3.2 Ostatné bunkové kompartmenty a fytohormóny

Biosyntéza CKs je v bunke sprostredkovaná IPTs a tRNA-IPTs lokalizovanými hlavne v plastidoch, neskôr v mitochondriách a cytozole (Kasahara *et al.*, 2004). Stále nie je známe, ako sú cytokinínové nukleotidy (di- a trifosforylované formy) transportované z plastidov do cytoplazmy, ale bola popísaná lokalizácia ribonukleotid fosfohydroláz, nukleozidáz, fosfatáz a 'Lonely guy' (LOG) enzýmov aj v cytoplazme (Chen a Kristopeit, 1981; Kuroha *et al.*, 2009) a predpokladá sa tu prebiehajúca aktivácia CKs. Lokalizácia CYP735As a tRNA-IPT9 nebola doposiaľ objasnená. Šmehilová *et al.* (2016) publikovali lokalizáciu

glukosyltransferáz v cytozole, a tým potvrdili, že tu prebieha inaktivácia. Transportný mechanizmus *O*- a *N*-glukosidov z bunky cez plazmatickú membránu zostáva však stále neobjasnený. Taktiež existuje len veľmi málo informácií o lokalizácii spätnej aktivácie CKs kontrolovanej β -glukosidázou. Objasnený je transport cytokinínov (iP a tZ) do bunky, ktorý je zaistený prostredníctvom membránových prenášačov PUPs (Bürkle *et al.*, 2003) a ENT (Li *et al.*, 2003).

2.2 Separácia rastlinných organel

Samotné izolácie bunkových kompartmentov sú komplexným procesom. Úplné oddelenie je v istom zmysle veľmi náročné. Môžeme síce získať obohatené frakcie, no musíme brať do úvahy aj biochemické podmienky bunky. Taktiež veľkú úlohu zohrávajú fyzikálne a chemické vlastnosti. Po prvé, subcelulárne štruktúry, ktoré chráni pevná bunková stena sú zvyčajne krehké, čo obmedzuje výnosy neporušených štruktúr po rozrušení bunkovej steny. Po druhé, teplota, ochranné prostriedky a čas sú rozhodujúcimi prvkami v záujme obohatiť štruktúru pred jej rozpoznaním alebo poškodením. Po tretie, fyzické interakcie a asociácie štruktúr, indukované uvoľňovanie intracelulárnych činidiel a zmena chemického prostredia sú faktory potrebné na izoláciu a prevenciu poškodenia (Taylor, 2017). Po samotnej izolácii je však vždy nutné overiť čistotu frakcie a na základe tejto informácie postupovať s experimentami.

2.2.1 Biochemické izolácie

Prvé izolácie bunkových organel boli uskutočnené De Duve a jeho spolupracovníkmi v roku 1955, pričom použili metódu subcelulárnej frakcionácie na tkanive z pečene potkanov. Postupy boli zamerané na rozrušenie tkanivových buniek fyzikálnymi ale aj chemickými metódami, ako je napríklad použitie detergentov alebo hypoosmotického šoku. Konvenčné metódy separácie organel zahrňujú diferenciálnu a hustotne-gradientovú centrifugáciu. Ich použitím sme schopní separovať rôzne populácie bunkových kompartmentov alebo organel z bunkových homogenátov na základe hmotnosti a hustoty (Lee *et al.*, 2010).

Diferenciálna centrifugácia pracuje pomocou postupného odstred'ovania bunkového alebo tkanivového homogenátu, aby sa získali subcelulárne organely. Metóda je založená na rôznej veľkosti a hustote organel, pričom väčšie a hustejšie organely sedimentujú za nižšej odstredivej sily. Nevýhodou však je jej slabá rozlišovacia schopnosť, čo môže spôsobiť, že frakcie obsahujú rôzne typy organel s podobnou sedimentačnou schopnosťou (Lee *et al.*, 2010).

Hustotne gradientová centrifugácia je metóda, ktorá oddeľuje organely na základe ich kontinuálneho alebo diskontinuálneho gradientu použitím rôznych médií (napr. sacharóza s rôznymi osmolaritami a viskozitami). Vo všeobecnosti je bunkový homogenát najskôr pridaný k hornej časti média a centrifugovaný. Po centrifugácii sa organely zhromažďujú v mieste gradientu, kde sa ich hustota rovná hustote okolitého média (tzv. izopiknický bod). Rýchlosť sedimentácie organel závisí jednak na ich tvare a veľkosti, no taktiež na ich hustote a obsahu lipidov a proteínov (Lee *et al.*, 2010). Táto metóda slúži ako nástroj pre poznatky v oblasti zloženia konkrétnej organely a umožňuje skúmanie subcelulárnych dráh prostredníctvom odhalení nových proteínových zložiek a bunkových kanálov. Taktiež umožňuje prevádzať porovnávacie štúdie medzi druhmi alebo medzi mutantnými a prirodzenými sa vyskytujúcimi typmi skúmanej rastliny (Robert *et al.*, 2007).

2.2.2 Imunoafinitná izolácia

Imunoafinitná purifikácia je metóda založená na interakcii protilátka – antigén a tvorbe veľkého množstva nekovalentných interakcií medzi nimi (elektrostatické a hydrofóbne interakcie, van der Waalsove sily, vodíkové väzby). Jedno z prvých použití imunoafinitnej chromatografie (IAC) bolo publikované na začiatku 50. rokov minulého storočia, kde bol použitý imobilizovaný hovädzí sérový albumín na p-aminobenzylcelulózu v dôsledku purifikácie protilátok (Campbell *et al.*, 1951). Odvtedy došlo k veľkému rozšíreniu aplikácii IAC na analytické, klinické a diagnostické účely (Abi-Ghanem a Bergham, 2012; Moser a Hage, 2010).

Princípom IAC je zmiešanie prečistenej protilátky naviazanej na inertnú pevnú fázu s roztokom antigénu za podmienok podporujúcich adsorpciu. Následne sa antigén zachytí, prebytočné nežiaduce látky sa odstránia premytím a purifikovaný antigén je uvoľnený prepnutím na podmienky podporujúce desorpciu (Abi-Ghanem a Bergham, 2012). K vylúčeniu cieľovej molekuly z afinitného média sa narušia nekovalentné interakcie buď špecificky – použitím kompetitívneho ligandu, alebo nešpecificky – zmenou pH, iónovej sily alebo polarizácie (GE Healthcare, 2007).

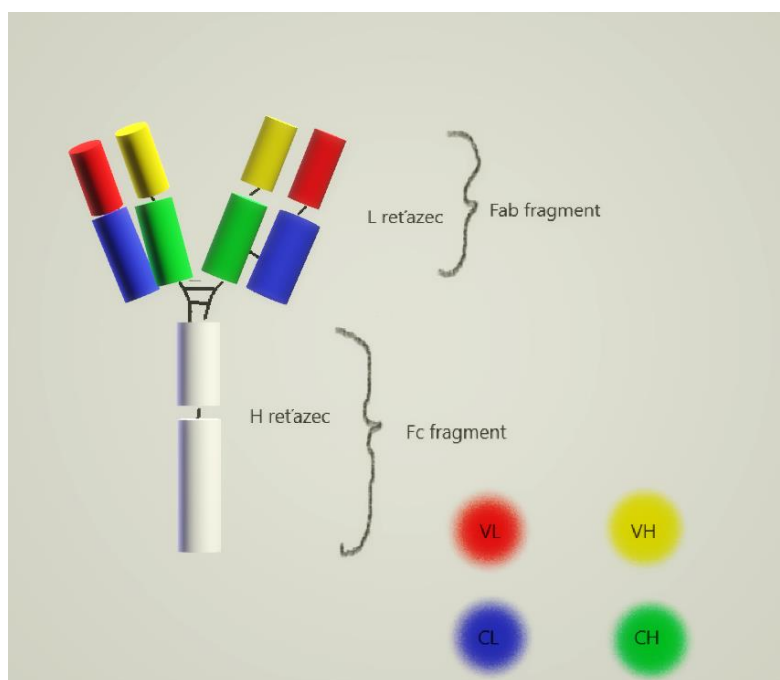
2.2.2.1 Protilátky pre imunoafinitnú purifikáciu

V IAC sa používa niekoľko typov protilátok. Medzi hlavné typy zaradíme monoklonálne a polyklonálne protilátky, avšak používané sú aj autoprotilátky a antiidiotypické protilátky. Vo všeobecnosti sú protilátky produkty plazmatických buniek, pričom chemicky sa jedná

o glykoproteíny nazývané imunoglobulíny (Bartůňková a Šedivá, 1997). Typická štruktúra molekuly imunoglobulínu v tvare Y je ukázaná na Obr. 6.

Monoklonálne protilátky sú produkované fúziou myelómovej bunkovej línie sleziny imunizovaného zvieraťa, pričom sa viažu na jeden antigénový determinant s rovnakou väzobnou afinitou. (Moser, Hage, 2010). Sú homogénne, monošpecifické, predstavujú chemické indivídium a sú účinné v nižších koncentráciách. Možno ich pripraviť prakticky v neobmedzenom množstve, a to aj proti neprečisteným antigénom. Prevažná väčšina patrí medzi neprecipitujúce protilátky, tj. také, ktoré netvoria s príslušným antigénom precipitujúce imunokomplexy, nakoľko netvoria trojrozmernú mriežkovú štruktúru (Ferenčík, 1989).

Polyklonálne protilátky vznikajú pri imunizácii experimentálneho zvieraťa antigénom. Ich špecifita závisí na fázi imunitnej odpovede zvieraťa, z ktorého sú získavané (Ferenčík, 1989). Produkované sú z viacerých bunkových línií tela a ako populácia môžu na jednom antigéne viazať viaceré epitopy s rôznou väzobnou afinitou (Moser a Hage, 2010).



Obr. 6. Štruktúra molekuly imunoglobulínu zložená z dvoch identických ľahkých (L) (25 kDa) a dvoch identických ťažkých reťazcov (H) (50 kDa) spojených disulfidickými väzbami. Všetky 4 reťazce pozostávajú z konštantných (C) a variabilných (V) domén. Horné ramená protilátky sú označované ako Fab oblasti. Na tieto rozvetvené časti sa viaže antigén, čím variabilná časť určuje špecifitu protilátky. Dolná časť molekuly nazývaná Fc oblasť je vysoko konzervovaná medzi triedami protilátok a sprostredkováva efektorové funkcie protilátok. VL – variabilná oblasť ľahkého reťazca; VH – variabilná oblasť ťažkého reťazca, CL – konštantná oblasť ľahkého reťazca, CH – konštantná oblasť ťažkého reťazca.

2.2.2.2 Imunoafinitné nosiče

V metóde imunoafinitnej chromatografie sa imunoglobulín viaže prevažne na pevný nosič, ktorým je buď CNBr-aktivovaná Sepharóza alebo komerčne dostupný Afi-gél 10, pričom imunoglobulín musí byť pred väzbou na gél prečistený (napr. pomocou dialýzy).

Špeciálnym typom afinitnej chromatografie, ktorá má uplatnenie predovšetkým v nanobiotechnológiách je afinitná chromatografia na magnetických nosičoch. Jedná sa o magnetické nanočastice prípadne mikročastice, ktoré sú v podobe prášku, nanotrubičiek alebo nanovlákieň, pričom o nanočasticiach hovoríme vtedy, ak aspoň jeden z rozmerov častice je menší ako 100 nm. Magnetické častice na biologickú separáciu pozostávajú z jedného alebo viacerých magnetických jadier s povrchovou maticou z polymérov oxidu kremičitého alebo hydroxylapatitu s termálne funkcionalizovanými skupinami. Magnetické jadro zvyčajne pozostáva buď z magnetitu (Fe_2O_3) alebo z magemitu (gamma Fe_2O_3) so supermagnetickými alebo feromagnetickými vlastnosťami (Pospiskova a Safarik, 2013).

Využitie imunomagnetickkej separácie v praxi už bolo preukázané napríklad pre stanovenie skupiny fytohormónov cytokinínov (Plačková *et al.*, 2017), kde bola použitá mikromagnetická imunoafinitná extrakcia založená na CK monoklonálnych protilátkach imobilizovaných na magnetických časticiach (Plačková *et al.*, 2017). Ďalšie použitie imunomagnetických častíc bolo pri izolácii intaktných mitochondrií s následným stanovením metabolitov (Chen *et al.*, 2016).

2.3 Metódy analýzy rastlinných hormónov

Náročnosť stanovenia rastlinných hormónov nie je spôsobená len ich nízkymi koncentráciami (*fmol–pmol/g* čerstvé hmoty) ale taktiež prítomnosťou rušivých, často interferujúcich látok v rastlinnej maticu (napr. pigmenty, lipidy, fenolické látky alebo proteíny) (Núñez *et al.*, 2012). Spoločne s ich chemickou, teplotnou a svetelnou nestálosťou či enzymatickým alebo oxidatívnym odbúrávaním behom extrakčných a izolačných krokov je presné stanovenie fytohormónov skutočnou analytickou výzvou (Tarkowská *et al.*, 2014).

2.3.1 Extrakcia a izolácia fytohormónov

Prvým krokom pri izolácii analytov z biologického materiálu je homogenizácia vzorky, rozbitie bunkových stien a ich uvoľnenie do extrakčného roztoku (Harrison, 2011). Extrakčné postupy navyše vyžadujú prácu za kontrolovaných podmienok (napr. znížená

teplota) s dôrazom na optimálne vysoký extrakčný výťažok i pre prípadné široké spektrum metabolitov študovaného analytu (Novák *et al.*, 2014).

Súčasťou prípravy vzoriek bola po mnoho rokov extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE) využívajúca rozdielnú rozpustnosť rastlinných hormónov a interferujúcich látok v niektorej zo zložiek extrakčných pufrov. V priebehu poslednej dekády bola klasická metóda LLE nahradená sofistikovanejšou, rýchlejšou a selektívnejšou extrakciou na tuhej fázi (SPE) pracujúcej na princípe rozdielných polarít a/alebo náboja stanovovaných analytov. Rastlinné hormóny môžeme na základe acido-bázických charakteristík rozdeliť na látky kyslej, neutrálnej a bázeickej povahy. Podľa ich hydrofobicity rozlišujeme látky silne polárne, stredne polárne a nepolárne. Táto chemická rôznorodosť zhoršuje ich účinnú izoláciu pomocou klasickej reverznej fázy (C18), a preto využitie kombinovaných iónových, polárnych i nepolárnych interakcií sa napr. pri izolácii cytokínových metabolitov ukázala ako správna cesta (Dobrev a Kamínek, 2002). Trendom poslednej doby je využitie sorbentov na polymernú bázu, napr. kopolyméru divinylbenzénu a *N*-vinylpyrolidónu (tzv. Oasis HLB) pri izolácii auxínov (Novák *et al.*, 2012). Problémy s neselektívnosťou SPE sorbentov rieši zapojenie imunoafinitných sorbentov založených na polyklonálnych alebo monoklonálnych protilátkach (viď *Kapitola 2.2.2*).

2.3.2 Metódy detekcie fytohormónov

Pre následnú finálnu kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu rastlinných hormónov je v súčasnosti najrozšírenejšou technikou plynová (GC) alebo kvapalinová (LC) chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou (MS). Vysoká separačná účinnosť chromatografických metód spoločne s citlivosťou a selektívnosťou tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS) uľahčuje stanovenie látok v komplikovaných biologických matriciach (Pan a Wang, 2009). Neustály vývoj týchto spojených techník (napr. využitie rýchlej LC chromatografie a rýchlych skenujúcich MS analyzátorov) umožňuje zvyšovať priechodnosť vzoriek (nižšia časová náročnosť) a znižovať limity detekcie (stanovenie attomolárnych hladín).

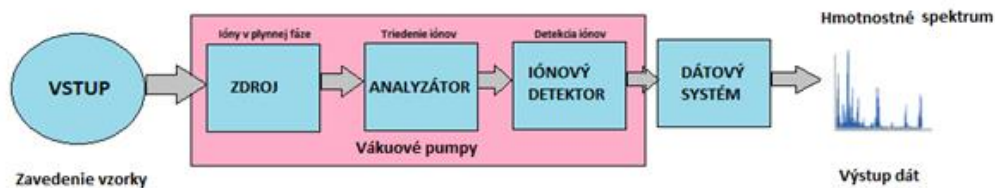
Kvapalinová chromatografia (LC) je analytická metóda používaná na rozdelenie zmesi analytov na jednotlivé zložky na základe interakcií analytov s mobilnou a stacionárnou fázou. Interakcie môžu byť založené na veľkosti molekúl, náboji, hydrofobicite, špecifických väzbových interakciách alebo sú ich kombináciou. Podľa typu

stacionárnej fáze rozoznávame niekoľko typov kvapalinovej chromatografie (adsorbčná, iónová, gélová, afinitná a rozdeľovacia chromatografia).

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je zdokonalením predchádzajúcich techník za účelom efektívnejšej a rýchlejšej separácie analytov. Je to plne automatizovaná metóda, ktorá sa vyznačuje veľkou rýchlosťou oddeľovania a účinnosťou v porovnaní s predchádzajúcimi spomenutými metódami (Salaš, 1988). Ďalším zdokonalením je ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC). Používajú sa kolóny naplnené pórovitými mikročiasťkami ($<1,8\mu\text{m}$), ktoré značne zvyšujú výkonnosť a rozlišovaciu silu, rýchlosť separácie v porovnaní s konvenčnými metódami. Nevýhodou je však nutnosť pracovať v širšom rozsahu tlakov, na druhej strane čas analýzy klesol až 10-násobne a spotreba rozpúšťadiel je minimálna. Pri výbere detektorov je takisto široký výber – napr. UV/VIS, fluorescenčného, fotodiódového, zachytávajúceho rozptýlené svetlo (ELSD) alebo hmotnostné spektrometre.

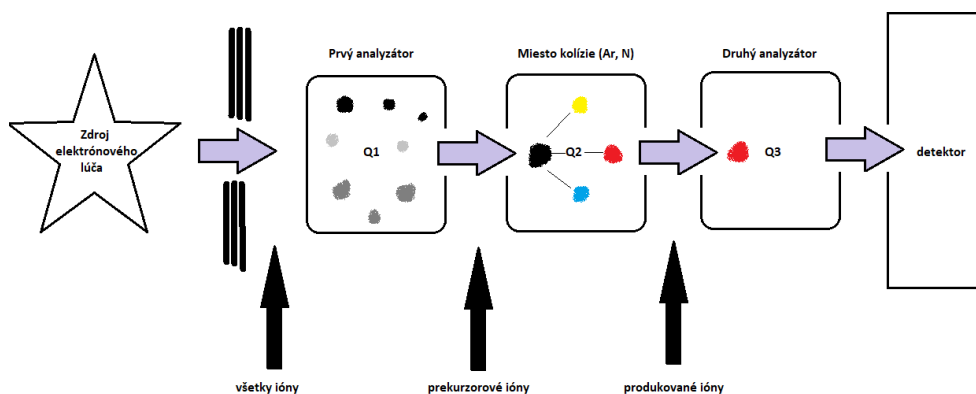
Hmotnostná spektrometria (MS) je v súčasnosti najrozšírenejším detekčným nástrojom pri stanovení fytohormónov. Ide o analytickú metódu, ktorá slúži k prevedeniu molekúl na ionizovanú plynnú fázu a separáciu vzniknutých iónov na základe podielu hmotnosti a náboja m/z (Klouda, 2003). Pôvodne hmotnostná spektrometria slúžila na presné určenie relatívnych hmotností a zastúpenie nuklidov v danom prvku. Teraz sa však používa ku stanoveniam a štruktúrnym analýzám dostatočne prchavých látok a stabilných organických a anorganických zlúčenín (Vodrážka, 1982).

Na meranie jednotlivých molekúl slúži hmotnostný spektrometer, ktorý premieňa molekuly na ióny tak, aby sa mohli pohybovať a byť separované vo vonkajšom elektrickom a magnetickom poli (*Obr. 7*). V metódach hmotnostnej spektrometrie bolo postupne vyvinutých mnoho typov ionizačných metód. Medzi klasické sa zaraďujú elektrónový dopad (EI) a bombardovanie rýchlym atómom (FAB). Z modernejších metód sú používané laserová desorpčná ionizácia (MALDI) a techniky ľahko kompatibilné s LC technikou ako sú chemické ionizácie atmosférického tlaku (APCI) a ionizácie elektrosprejom (ESI). Aby však ióny mohli byť detekovateľné, musia sa najsôr dostať do hmotnostného analyzátoru, ktorý je súčasťou hmotnostného spektrometra. Rozoznávame 6 základných analyzátorov – kvadrupólový hmotnostný analyzátor, analyzátor doby letu, magnetický sektorový analyzátor hmotnosti, elektrostatický analyzátor hmotnostného sektora, kvadrupólová „iónová pasca“ a iónovo cyklotrónová rezonancia. Existuje niekoľko typov analyzátorov, ktoré môžeme medzi sebou kombinovať a vytvárať tak tzv. hybridné nástroje.



Obr. 7. Schéma hmotnostného spektrometra (upravené podľa Gross, 2017). Malá vzorka je prevedená na ióny, pričom je tento proces sprevádzaný stratou elektrónov (deje sa tak v iónovom zdroji prístroja), ióny sú následne oddelené a roztriedené podľa ich hmotnosti a náboja v hmotnostnom analyzátore, oddelené ióny nakoniec dopadajú na detektor, čo vyvolá detekovateľnú zmenu prúdu.

Trojité kvadrupólový analyzátor (QqQ) je často používaný pri analýze rastlinných hormónov. Je to tandemová MS metóda, ktorá sa často používa, ak je k analýze potrebná vysoká citlivosť a špecifickosť alebo pri generovaní dodatočných fragmentačných údajov z požadovaných iónov (Holčapek *et al.*, 2012). Trojitý kvadrupólový analyzátor je konfigurovaný tak, že ióny, ktoré nás zaujímajú prechádzajú sekvenciou 3 kvadrupólových hromadných filtrov. Prvý a tretí kvadrupól pôsobia ako hromadné filtre a v druhom dochádza k fragmentácii analytu prostredníctvom interakcie s kolíznym plynom. Tento typ analyzátoru sa používa predovšetkým pri kvantitatívnych analýzach kvôli ich lineárnej detekčnej odpovedi, ako je napríklad stanovenie zlúčenín s nízkou koncentráciou.



Obr. 8. Schéma trojitého kvadrupólového analyzátoru (upravené podľa Faktor *et al.*, 2012).

3 PRAKTICKÁ ČASŤ

3.1 Biologický materiál

Pre nižšie zmienené experimenty bola použitá suspenzná kultúra a rastliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Landsberg *erecta* (*Ath-Ler*). Bunky suspenznej kultúry *Ath-Ler* boli pasážované v sterilnom prostredí v týždennom intervale tak, že boli odobrané 3 ml suspenznej kultúry, ktoré boli prenesené do 30 ml čerstvého média. Suspenzná kultúra bola inkubovaná v tme pri 23 °C , 131 rpm.

3.2 Chemikálie

2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (> 99 %) – Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Nemecko)

25% NH₄OH – Fluka Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

2-β-merkapt ethanol – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

98% HCOOH – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

99% kyselina octová – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Bromfenolová modř – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

CaCl₂* 2 H₂O – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Celluláza (2 U/mg) – Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Nemecko)

Deionizovaná voda

Dodecylsulfát sodný (SDS) – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Ethylenediaminetetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Ficoll® PM 400 – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Glycerol – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

HNO₃ – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

hovädzí sérový albumín (BSA) – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Inertné izotopicky značené štandardy cytokinínov pridávané do vzoriek v látkovom množstve: 0,25 pmol alebo 0,05 pmol CK bázi ([¹³C₅]cZ, [¹³C₅]tZ, [²H₃]DHZ, [²H₆]iP), CK ribosidov ([²H₅]tZR, [²H₃]DHZR, [²H₆]iPR) a CK N-glukosidov ([²H₅]tZ7G, [²H₅]tZ9G, [²H₃]DHZ9G, [²H₆]iP7G, [²H₆]iP9G); 0,5 pmol CK O-glukosidov ([²H₅]tZOG, [²H₇]DHZOG, [²H₅]tZROG) a CK nukletidov ([²H₅]tZRMP, [²H₃]DHZMP, [²H₆]iPRMP); 5 pmol auxínov ([¹³C₆]IAA, [¹³C₆]oxIAA, [¹³C₆]IAA_{sp}, [¹³C₆]IA_{glu}) – Olchemim (Olomouc, Česká republika)

KCl – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

KOH – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Kozia sekundárna protilátka proti králičiemu IgG konjugovaná s chrenovou peroxidázou (IgG-HRP) – Agrisera (Vännäs, Švédsko)

Králičie primárne protilátky proti markerovým proteínom organel: γ -podjednotka coat proteínu (Sec21p), vakuolárna H^+ -ATPase (V-ATP), H^+ -ATPase (H-ATP), sekrečnému Ras asociovanému proteínu (Sar1) – Agrisera (Vännäs, Švédsko)

Macerozyme (3,000 U/g) – Duchefa (Haarlem, Holandsko)

Magnetické mikročastice povrchovo ošetrené chitosanom A (pripravené podľa Plačková *et al.*, 2017)

Mannitol – Penta s.r.o. (Praha, ČR)

MeOH – Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko)

Merkaptoethanol – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

MgCl $_2$ * 6 H $_2$ O – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Murashige-Skoog médium – Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Nizozemsko)

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) – BioRad (Kalifornia, USA)

Na $_2$ HPO $_4$ * 12 H $_2$ O – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

NaCl – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

NaH $_2$ PO $_4$ * 2H $_2$ O – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

NaOH – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Neutrálne červené – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Persíran amónny (APS) – BioRad (Kalifornia, USA)

Ponceau S – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Sacharóza – Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

SuperSignal® West Pico chemiluminiscenčný substrát – Thermo Scientific (Rockford, USA)

Sušené nízkoťučné mlieko – Semper (Švédsko)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Roztoky a pufre:

- Vodné roztoky boli pripravované v deionizovanej vode.

0,2M sodno-fosfátový pufor, pH 7,5 (NaH $_2$ PO $_4$ * 2H $_2$ O, Na $_2$ HPO $_4$ *12H $_2$ O)

0,2M sodno-fosfátový pufor, pH 8,0 (NaH $_2$ PO $_4$ *H $_2$ O /l, NaHPO $_4$ *7 H $_2$ O/l)

0,5M EDTA (pH upravené na 8,0 pomocou nasýteného roztoku NaOH)

0,5M Tris-HCl (Tris, upravené na pH 6,8 pomocou HCl, skladované pri 4 °C)

1,5M Tris-HCl (Tris, upravené na pH 8,8 pomocou HCl, skladované pri 4 °C)

10% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS) (SDS, udržiavané pri RT)

10% (w/v) persíran amónny

1M Mannitol

2× koncentrovaný vzorkovací pufo (LSB) – 4% SDS, 10% 2-β-merkaptoethanol, 20% Glycerol, 0,004% bromfenolová modr, 125mM Tris, pH 6,8 (upravené pomocou HCl)

30% (wt/vol) Ficoll (na niekoľko minút zahriaté na 37 °C)

4% Ficoll (vakuolárny pufo, lyzačný pufo (v pomere 1,5 :1), udržiavané pri laboratórnej teplote (RT))

50mM MES, pH 5,6 (upravené pomocou 0,1M KOH)

Blokovací pufo (5% sušené nízkotučné mlieko, TBS-T)

Elektroforetický pufo (25mM Tris, 190mM Glycín, 0,1% SDS upravené na pH 8,8 pomocou HCl)

Lyzačný pufo (200mM Mannitol; 0,3% Ficoll; EDTA pH 8,0; 25mM sodno-fosfátový pufo pH 8,0; 0,005% neutrálna červen, udržiavané v teplote pri 37 °C)

Mobilné fáze (0,1% kyselina octová v MeOH; 0,1% kyselina octová v deionizovanej vode; 15mM kyselina mravčia)

Modifikované Bieleškeho činidlo (methanol : H₂O : kyselina mravčia; 15 : 4 : 1)

MS médium pre kultiváciu suspenznej kultúry *Ath-Ler* : 0,44% Murashige-Skoog soli a vitamíny, 3% sacharóza, hormóny: 23,2μM kinetín (zásobní roztok 10mg/ml)/ 1l média, 5,37μM NAA (zásobní roztok 10mg/ml)/ 1l média, pH = 5,8 upravené pomocou KOH

NH₄OH v 60% MeOH – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Premývací pufo (WB) (400mM Mannitol, 200mM MES pH 5,6)

Preplachovací pufo (W5) (112,6mM CaCl₂*2 H₂O, 5mM KCl, 2,05mM MES, 154mM NaCl, upravené pH na 5,7 pomocou 0,1M KOH)

Protoplastovací enzymatický roztok (PES) – (602,7mM Mannitol, 1,8mM CaCl₂*2 H₂O, 10mM KCl, 1,98mM MES, 1,97mM MgCl*6 H₂O, 0,1% BSA, pH upravené na 5,7 pomocou 0,1M KOH, 150 mg 2 U/mg Celluláza, 300 mg 3,000 U/g Macerozyme)

Protoplastovací pufo (PBI) (602,7mM Mannitol, 1,8mM CaCl₂*2 H₂O, 10mM KCl, 1,98mM MES, 1,97mM MgCl*6 H₂O, 0,1% BSA, pH upravené na 5,7 pomocou 0,1M KOH)

Roztok Ponceau-S (0.5% Ponceau-S, 1% kyselina octová)

Sodno-trisový pufo (TBS) (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5)

Transférový pufo (25mM Tris, 190mM Glycín upravené na pH 8,8 pomocou HCl)

Tris pufrovací fyziologický roztok s prídavkom Tweenu® 20 (TBS-T) (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7,5)

Vakuolárny pufor (450mM Mannitol, 25mM sodno-fosfátový pufor pH 7,5, 4mM EDTA, udržiavané na ľade)

3.3 Pomôcky a prístroje

Pomôcky:

100 µm sítko Collector Tissue Sieve (Thermo EC, Massachusetts, USA)

Amicon® Ultra centrifugal filters (0,5ml 3K) – Millipore (Carrigtwohill, Co.Cork, Ireland)

Analytické váhy Satorius Weighing Technology GmbH (Goettingen, Nemecko)

Bürkerova komôrka (0,100 mm/0,0025 mm²)

Centrifúga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge – ThermoScientific (Osterode, Nemecko)

Detekčná stanica na western-blotting – Luminiscent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japonsko)

Fuchs – Rosental komôrka (0,200 mm/ 0,0625 mm²)

Gumový balónik

Chromatografická kolóna KINETEX – Phenomenex (Torrance, USA)

Inkubátor Memmert IN 30 – Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Nemecko)

Laboratórne sklo – odmerný valec, kadičky, Petriho miska, kryštalizačná miska, Sklenené skúmavky – Fisherbrand (Fisher Scientific, New Hampshire, USA)

Magnetická miešačka MM7 (Lavet, ČR)

Micro Insert skúmavky

Micro Spin Filter (0,2 µm)

Mikro ultracentrifúga CS150NX (Hitachi, Japonsko), rotor S52ST-0360

Mikroskúmavky

Milli-Q Simplicity 185 – Millipore Corp. (Billerica, USA)

Nitrocelulozová membrána UltraCruz® Nitrocellulose Pure Transfer Membrane, 0.45 µm – Santa-Cruz (Texas, USA)

Oasis® HLB kolóny, 30 mg/1 ml – Waters (Milford, USA)

Oasis® MCX kolóny, 30 mg/1 ml – Waters (Milford, USA)

Pausterova pipeta

pH meter Oakton® pH 700 Benchtop Meter, elektróda polyplast Hamilton – Cole-Parmer (Vernon Hills, USA),

plastová serologická pipeta Costar® – Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Plastové ultracentrifugačné kyvety

Prístroje:

Rotačná miešačka na mikroskúmvky – Stuart rotator SB3 BioCote (Coventry, Spojené kráľovstvo)

Sada automatických pipiet – Eppendorf, Brand a k nim prislúchajúce špičky

Stolná centrifúga Microstar 17 VWR (Pensylvánia, USA)

Svetelný mikroskop Olympus IX51– U-TV0.5XC-3, 7 G04163. JAPAN, svetelný zdroj: Olympus TH4-200 (Olympus Corporation, Tokio, Japonsko)

Systém UPLC-MS/MS – AcquityTM Ultra Performance LC, Binary solvent manager, Sample manager – Waters (Milford, USA) s hmotnostným detektorom XevoTM TQ-S – Waters MS Technologies (Manchester, UK)

Trepačka MAXI MIX II Thermolyne – ThermoScientific (Osterode, Nemecko)

Vákuová komôrka VisiprepTM – Supelco-Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Vákuová rotačná odparka Rotavapor[®] R-200 – Buchi Labortechnik AG (Postfach)

Vialky – Labicom (Olomouc, ČR)

3.4 Metódy a postupy

3.4.1 Izolácia vakuol zo suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler*

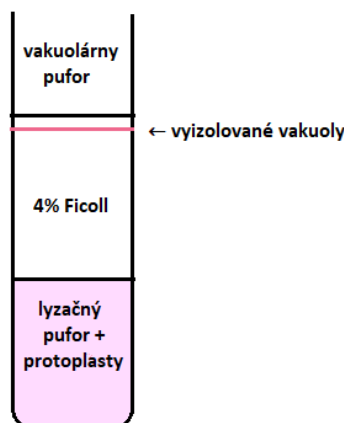
Pre izoláciu vakuol bola použitá štyri dni stará suspenzná bunková kultúra *Ath-Ler*. V prvom kroku boli z kultúry odvodené protoplasty podľa protokolu od Yo *et al.* (2007) s miernymi modifikáciami. Samotná izolácia vakuol bola realizovaná podľa protokolu Robert *et al.* (2007), ktorý bol optimalizovaný pre východzí materiál.

A. Príprava roztokov – Pre izoláciu protoplastov a vakuol boli použité čertvo pripravené roztoky, pričom PBI, W5, 30% (wt/vol) Ficoll, 0,2M sodium phosphate, pH 7,5 a 0,2M sodium phosphate, pH 8,0 boli pripravené deň vopred. Ostatné roztoky ako lyzačný pufor, vakuolárny pufor, 4% Ficoll a WB boli pripravované v deň izolácie.

B. Protoplastovanie – Prvým krokom bolo protoplastovanie. Do 50ml falkóny bolo odobraných 20 ml PBI, ktorý sa nechal zohriať na 37 °C. Po zohratí tohto roztoku boli doň pridané enzýmy – macerozyme a celulóza vytemperované na RT. Falkóna s obsahom bola umiestnená približne na pol hodinu do inkubátora predhriateho na 37 °C, pokiaľ sa enzýmy nerozpustili a nevytvorili tým PES. Následne bolo odobraných 10,5 ml 4-dennej suspenznej kultúry buniek do 15ml falkóny serologickou pipetou a bunky boli

sedimentované centrifugáciou pri 80 ×g 5 minút a RT. Následne bol supernatant odpipetovaný automatickou pipetou do čiastočného vysušenia sedimentovaných buniek. K takto pripraveným bunkám boli pripipetované 2 ml PES, zmes bola jemne prepipetovaná do kryštalizačnej misky spolu so zvyškom PES. Ďalším krokom bola aplikácia vákua na suspenznú kultúru buniek, po dobu 2 minút. Následne bola kryštalizačná miska prikrytá viečkom, zabalená do alobalu a na 10 minút premiestnená do inkubátoru vyhriateho na 37 °C. Po uplynutí tohto času bola kryštalizačná miska vytiahnutá z inkubátoru a ponechaná pri RT 4 hodiny. K suspenznej kultúre buniek v PES bolo pridané W5 vytemperované na laboratórnu teplotu v pomere 1:1 (20 ml) a zmiešané jemnými krúživými pohybmi. Táto zmes bola prepipetovaná serologickou pipetou cez navlhčené sitko o pórovitosti 100 µm do 50ml falkóny a scentrifugovaná pri otáčkach 200 ×g 3 minúty pri RT s akceleráciou 7 a deakceleráciou 3. Následne bol odpipetovaný supernatant a bolo pridaných 5 ml WB. Jemným preklápaním falkóny bol rozsuspendovaný pelet a odobraný alikvót (100 µl) pre počítanie protoplastov vo Fusch Rosenthal komôrke podľa vzorca $B = \frac{n \cdot z}{c \cdot V \cdot h}$ (kde B predstavuje počet buniek v 1 µl, n celkový počet napočítaných vakuol, z riedenie, c počet štvorcov, V plocha použitého štvorca a h hĺbka komôrky) a pozorovanie protoplastov pod svetelným mikroskopom. Obsah falkóny bol doplnený WB na objem 25 ml a scentrifugovaný pri RT, 80 ×g, 5 minút s rovnakou akceleráciou a deakceleráciou ako v predchádzajúcom kroku.

C. Izolácia vakuol – Samotné kroky izolácie začali bezprostredne po dobehnutí protoplastovania. Znovu bol odpipetovaný supernatant a k peletu bolo pridaných 10,5 ml lyzačného pufru vyhriateho na 37 °C. Roztok bol 5-8 × prepipetovaný serologickou pipetou so širokou špičkou, čím došlo k lýze protoplastov. Úspešnosť lýzy bola kontrolovaná pod svetelným mikroskopom. Zmes bola prepipetovaná do 4 ultracentrifugačných kyviet po 2,5 ml. K nim opatrným pripipetovaním bolo pridaných 1,5 ml 4% Ficollu laboratórnej teploty a 0,5 ml vychladeného vakuolárneho pufru tak, aby sa vytvorili fázy a rozhrania medzi jednotlivými roztokmi, čím vznikol hustotný gradient. Kyvety boli pevne uzavreté do kovových púzdiar, zavesené na výkyvný rotor, ktorý bol vložený do vopred nachladenej ultracentifúgy na 10 °C. Gradient bol centrifugovaný 50 minút pri otáčkach 71000 ×g (Obr. 9). Po scentrifugovaní bolo z každej kyvety odobraných 500 µl ružovej vrstvy na rozhraní vakuolárneho pufru a 4% Ficollu a spojené do 2ml mikroskúmavky.



Obr. 9. Schéma diskontinuálneho hustotného gradientu.

Pelet bol rozpustený v 50 μ l vakuolárneho pufru. Pre počítanie vakuol bolo odobraných 20 μ l vakuolárnej frakcie a prenesených na Bürkerovu komôrku. Vakuoly boli spočítané v 12 štvorcoch pri zväčšení 400 $\times$ komôrky a množstvo vakuol bolo prepočítané podľa vzorca uvedeného vyššie, čím sme zistili celkové množstvo vakuol vo vzorke.

D. Aplikácia magnetických mikročastíc – K vyizolovanej protoplastovej a vakuolárnej frakcii boli pridané magnetické mikročastice povrchovo ošetrovaných chitosanom A a chitosanom A s BSA v pomere 10 : 1. Inkubácia prebiehala 10 minút za RT. Následne bola pozorovaná interakcia pod svetelným mikroskopom.

3.4.2 Výsev semien *Arabidopsis thaliana*

Pred samotnou výsadbou bol zmiešaný substrát s vormezitom v pomere 1:1 ku ktorej bolo pridané hnojivo a takto pripravená zemina bola vložená do kvetináčov a zaliate vodou. Na zeminu boli následne nasýpané semená *Ath-Ler*. Takto pripravené kvetináče boli zakryté plastovým krytom a uložené do fytotronu so svetelnou periódou dlhého dňa (16 h svetlo, 8 h tma) s konštantnou teplotou 22 °C. Rastliny boli kultivované 40 dní, pričom im bola dodávaná výživa v podobe hnojiva a zálievky.

3.4.3 Izolácia vakuol zo 40 dní starých rastlín *Ath-Ler*

Po 40 dňoch rastu, boli rastliny pozberané pričom k izolácii boli použité len zdravé zelené listy ružice. Na prípravu protoplastov bolo použitých 2 g materiálu. Listy boli opláchnuté v destilovanej vode a nakrájané na tenké prúžky. Aby nedošlo k vyschnutiu rezov boli ihneď vložené do 100 μ m sitka umiestneného do 6 jamkovej doštičky s PBI. Po odsatí prebytočného pufru do buničiny boli rezy listov vložené do 30 ml PES predhriateho

na 37 °C. Pre zvýšenie výťažku protoplastov bola zmes listov a PES ponechaná 10 minút vo vákuu. Po tomto kroku a aj pri samotnej izolácii vakuol bolo postupované obdobne ako pri izolácii zo suspenznej kultúry buniek.

3.4.4 SDS-PAGE a western blotting

Pri tomto postupe boli dodržané obecné používané kroky, a to : príprava vzorky → gélová elektroforéza → prenos na membránu → zablokovanie nešpecifických väzieb → naviazanie protilátok → detekcia → snímanie → analýza.

A. Príprava vzorky – Vyizolovaná vakuolárna frakcia bola zakoncentrovaná pomocou filtrov Amicon ultra (0,5 ml, 3K) počas centrifugovania pri 14000 ×g po dobu 30 minút. Po pridaní 2x koncentrovaný LSB v pomere 1 : 1 bol obsah prepipetovaný do novej skúmavky a zamrazený pri teplote -20 °C. Týmto spôsobom bola získaná približne 10× zakoncentrovaná vzorka, ktorá bola použitá v ďalších krokoch.

B. SDS-PAGE – Gél na SDS-PAGE bol pripravený deň dopredu. Pre separáciu proteínov bol použitý 4% zaostrovací a 12% deliaci polyakrylamidový gél pripravený podľa protokolu (Laemmli, 1970). Pred nanosením na gél boli vzorky proteínov zahriate (95 °C, 5 min) a stočené 5 minút pri 9000 ×g. Do jamiek gelu boli nanesené jednotlivé vzorky o objeme 20 µl a 3 µl markera molekulových hmotností. Elektroforéza bola spustená na 30 minút pri napätí 90 V a následne na 120 V do konca separácie (cca 100 min). Po prebehnutí elektroforézy bol gél premývaný 5 minút v destilovanej vode.

C. Western-blotting – Následne bola zostavená aparatura potrebná k prenosu proteínov na nitrocelulózovú membránu. Pripravený polyakrylamidový gél s rozdelenými proteínmi bol premývaný po dobu 10 minút v transférovom pufri. Do krabičky s transferovým pufrom boli poskladané na seba jednotlivé komponenty v poradí pórovitá poduška, 2× filtračný papier, gél, nitrocelulózová membrána, 2× filtračný papier a pórovitá poduška. Všetko bolo uzatvorené do plastového držiaka a vložené do kazety s elektródami, ktorá bola umiestnená do vane s chladiacim blokom určenej na western blotting a zaliata transférovým pufrom. Prenos proteínov prebiehal pri 90 mA a 4 °C cez noc za neustálého premiešavania pufru.

D. Imunodetekcia proteínov – Na ďalší deň bola membrána vyňatá a prenesená na pár sekúnd do roztoku nešpecifického farbiva Ponceau S pre kontrolu prenosu proteínov. Obyčajnou ceruzkou boli naznačené jednotlivé línie vzoriek na membráne.

Farbivo bolo následne odfarbené v roztoku tris pufrovacieho fyziologického roztoku s prídavkom Tweenu® 20 (TBS-T). Na zablokovanie membrány bol použitý blokovací pufor. V tomto roztoku bola membrána ponechaná po dobu 1 hodiny pri kontinuálnom miešaní. Po inkubácii bola membrána rozstrihaná podľa nanoseného markera v oblasti cieľových proteínov a opláchnutá v TBS-T pričom následne na ňu boli aplikované primárne protilátky s nasledujúcim riedením – V-ATP 1:2000, Sec21p 1:1000, H-ATP 1:1000, Sar1 1:1000. Pri aplikácii protilátok na membránu sa postupovalo tak, že na dno Petriho misky bol opatrne umiestnený parafilm, na ktorý bol aplikovaný roztok (cca 1 ml) 1% nízkotučného sušeného mlieka a príslušnej primárnej protilátky, na ktorý bola položená premytá membrána. Membrána bola v primárnej protilátke inkubovaná po dobu 60 minút. Po inkubácii bola membrána premytá 1× v TBS-T (5 min) a 2× v roztoku tris pufrovacieho fyziologického roztoku (TBS) (5 min) a následne umiestnená do roztoku 1% nízkotučného sušeného mlieka a sekundárnej protilátky IgG-HRP riedenej 1:5000 taktiež na 60 minút za stáleho miešania. Po inkubácii v sekundárnej protilátke sa postupovalo obdobne ako u primárnej protilátky. Membránu bolo taktiež nutné premyť 1× v TBS-T (10 min) a 2× v TBS (10 min). Membrána bola spätne poskladaná do pôvodného stavu a premiestnená na fóliu, rovnomerne poliata chemiluminiscenčným substrátom a inkubovaná 5 minút. Prebytočná kvapalina bola tlakom na fóliu vytlačená a membrána bola umiestnená do detekčného zariadenia (Luminiscent image analyzer LAS-4000).

3.4.5 Extrakcia a purifikácia pre LC-MS/MS analýzu auxínov a cytokinínov

A. Optimalizácia purifikácie vzoriek pre izoláciu vakuol – Podľa štandardných roztokov vakuolárneho pufru, 4 % Ficollu a ich rôznych hodnôt riedenia (5×, 2×, 0×) boli vzorky okyselené 1M kyselinou mravčou (5× a 2×) a 5M kyselinou mravčou (0×) na hodnotu pH <2,7. Podľa *Tab. 1* boli do mikroskúmaviiek napipetované a následne okyselené

Tabuľka 1. Okysel'ovanie vzoriek kyselinou mravčou

Riedenie	Hodnoty pH		
	5× (1 ml vzorka + 4 ml 1M HCOOH)	2× (1 ml vzorka + 1 ml 1M HCOOH)	0×
Vakuolárny pufor	1,93	2,10	2,67 + 20 µl 5M HCOOH
4% Ficoll	1,94	2,16	2,69 + 30 µl 5M HCOOH

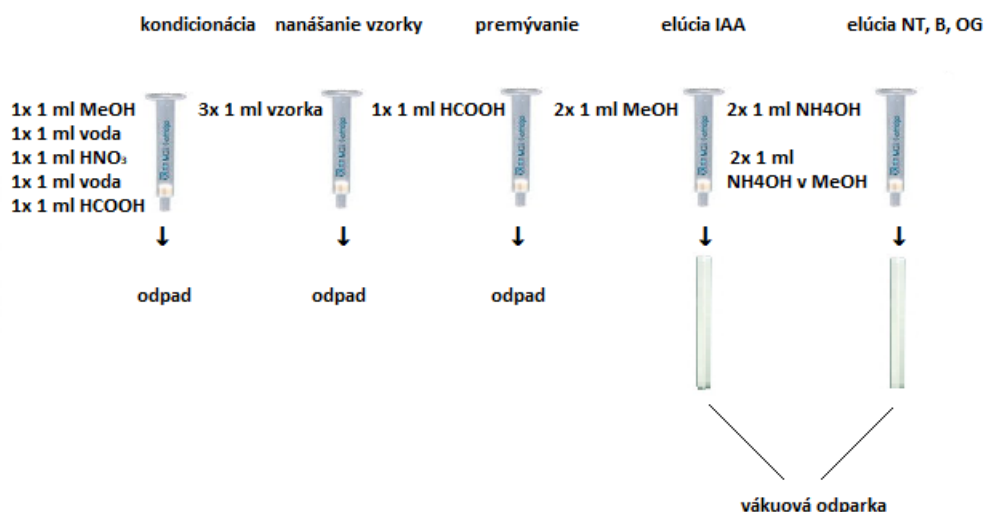
vzorky, ku ktorým bol pridaný mix inertných štandardov cytokinínov (0,25 pmol CK bází, ribosidov, N7/N9-glukosidov a 0,5 pmol O-glukosidov a nukleotidov) a auxínov (5 pmol/vzorka).

B. Príprava vzoriek z protoplastov a vakuol pre stanovenie fytohormónov – Hlboko zamrazené vzorky protoplastov a vakuol z -80 °C boli postupne rozmrazené na ľade. Po rozmrznutí boli zhomogenizované na trepačke a vložené do kvapalného dusíku a znova rozmrazené. Ku vzorkám vakuol (1,25 ml) a protoplastov (0,07 ml) bolo následne pridaných 0,5 ml modifikovaného Bielskeho činidla a izotopicky značené interné štandardy auxínov (5 pmol) a cytokinínov (0,25 pmol CK bází, ribosidov, N7/N9-glukosidov a 0,5 pmol O-glukosidov a nukleotidov). Takto pripravené vzorky boli ponechané 30 minút na kolotoči pre mikroskúmvky nachladeného na 4 °C. Ďalším krokom bola centrifugácia pri 20000 ×g, 4 °C. Supernatant bol prepipetovaný do sklenených skúmaviek a objem do doplnený 1M HCOOH na 3 ml.

Tento postup bol aplikovaný aj na experiment s rôznym počtom nanášaných vzoriek vakuol (250 000, 500 000, 1 000 000) v roztoku o neznámom pomere vakuolárneho pufru a 4% Ficollu.

C. Príprava vákovej komôrky – Prvým krokom bolo dôkladné vypláchnutie celej vákovej komôrky ethanolom. Na viečko vákovej komôrky boli následne nasadené z hornej strany zátky a zo spodnej strany plastové ihly, ktoré boli takisto predom namočené v ethanole. Po zapnutí vákovej pumpy bol zo šputov aj z ihliel odsatý prebytočný ethanol a na špunty boli následne nasadené MCX kolóny (30 mg/1 ml).

D. SPE purifikácia pre stanovenie cytokinínov a auxínov – Izolácia pomocou Oasis[®] MCX kolóny (30 mg/1 ml) prebiehala v 6 krokoch tak, ako ukazuje *Obr. 10*. Prvým krokom bola kondicionácia kolón vždy 1× nanesením methanolu, destilovanej vody, 50% kyseliny dusičnej, destilovanej vody a 1M kyseliny mravčej, pričom výstupy z kolón boli odvedené do odpadu. Druhým krokom bolo nanášanie vzorky v 3 po sebe sa opakujúcich cykloch, kde takisto výstup z kolón nebol zachytávaný. V treťom kroku boli kolóny premývané 1× 1M kyslinou mravčou. V nasledujúcich krokoch už prebiehala samotná elúcia, preto bolo nutné výstupy z kolón zachytávať do sklenených, vopred popísaných skúmaviek. Ako prvé sa eluovali auxíny, preto bol v 2 po sebe nasledujúcich krokoch na kolóny nanesený 80% methanol. Druhé sa eluovali cytokiníny, ktoré boli zachytávané do novej sklenej skúmavky. Najskôr bol na kolóny nanesený 1× 0,35M hydroxid amónny a následne 2× obdobne hydroxid amónny v 60% methanole. Takto prečistené vzorky v sklenených skúmavkách boli odparené vo vákovej odparke do sucha.



Obr. 10. Schéma SPE purifikácia pomocou Oasis® MCX (30 mg/ml).

E. Filtrácia a prenos – Po odparení všetkej kvapaliny zo vzoriek boli vzorky rozpustené v 40 μ l 5% (pre cytokininy) alebo v 50 μ l 10% methanole (pre auxíny), následne boli zvortexované a umiestnené na 5 minút do ultrazvuku. Vzorky boli prenesené do skúmaviek Micro Spin Filter (0,2 μ m) a zcentrifúgované po dobu 5 minút pri 7500 $\times$ g. Po tomto kroku došlo k preneseniu vzoriek do Micro Insert skúmaviek a uzavretiu do vialiek. Takto pripravené vzorky boli detekované na hmotnostnom spektrometri.

3.4.6 UHPLC–MS/MS

Detekcia analytov prebiehala na systéme UHPLC-MS/MS ionizáciou látok elektrosprejom v pozitívnom móde ESI(+) za optimalizovaných MS podmienok. Parametre hmotnostného spektrometra boli nastavené nasledovne: teplota zdroja (150 °C), desolvačná teplota (600 °C), prietok desolvačného plynu (dusík) 1000 l/h, napätie v kapiláre 1 kV. Stanovenie endogénnej hladiny fytohormónov v izolovaných vakuolách prebiehalo pomocou viacnásobného monitorovania reakcie (MRM) protonovaného prekursora a príslušných produkovaných iónov (Novák *et al.*, 2012; Novák *et al.*, 2017). Kvantifikácia metabolitov bola uskutočnená pomocou izotopovej zried'ovacej metódy a všetky dáta boli spracované programom MassLynx™ (verzia 4.1, Waters, Milford, USA).

A. Stanovenie auxínov (podľa Novák *et al.*, 2012) – Pre separáciu auxínov bola použitá chromatografická kolóna KINETEX (C18, 1,7 μ m, 50 $\times$ 2,1mm) vytemperovaná na 30 °C. Mobilnou fázou bol methanol (A) a redestilovaná voda (B), oboje s prídavkom 0,1% kyseliny octovej. Celkový čas každej analýzy bol 15 minút pri prietoku 0,2 ml/min. Pred každým meraním bola kolóna kondicionovaná na počiatočné podmienky analýzy (10:90, A:B). Vzorky boli uložené v autosampleri pri 4 °C. Gradientová elúcia prebiehala

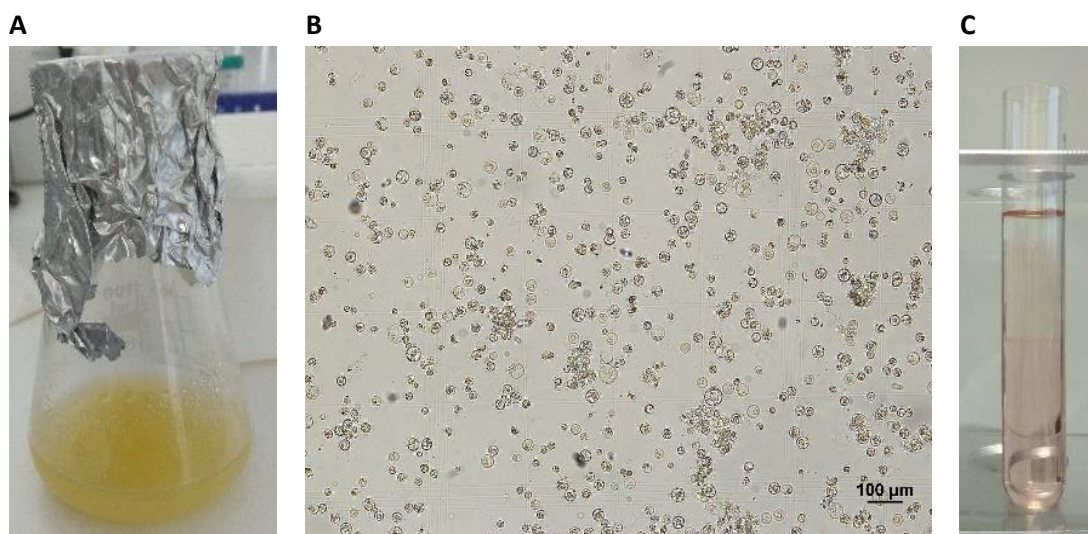
v tomto poradí: 2x bol gradient metódy (0 min – 10% A, 10 min – 50% A, 11 min – 55% A, 12,5 min – 100% A, 13,5 min – 10% A) spustený bez nástreku vzorky, následne boli aplikované vzorky po 10 µl.

B. Stanovenie cytokíninov (podľa Novák *et al.*, 2017) – Nástreky každej vzorky na reverznú kolónu činil 10 µl (Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 150 × 2,1 mm). Kolónový termostat bol nastavený na 45 °C. Separácia vzoriek prebiehala 20 minút v gradiente methanolu (A) a 15 mM mravčane amónnom (pH 3,95, B) pri rýchlosti 0,35 ml/min: 0 min – 10% A:B, 10 min – 23% A, 15 min – 36% A. Na konci elúcie bola kolóna premytá 100% A (2 min) a ekvilibrovaná na počiatočné podmienky (10:90, A:B) po dobu 3 minút.

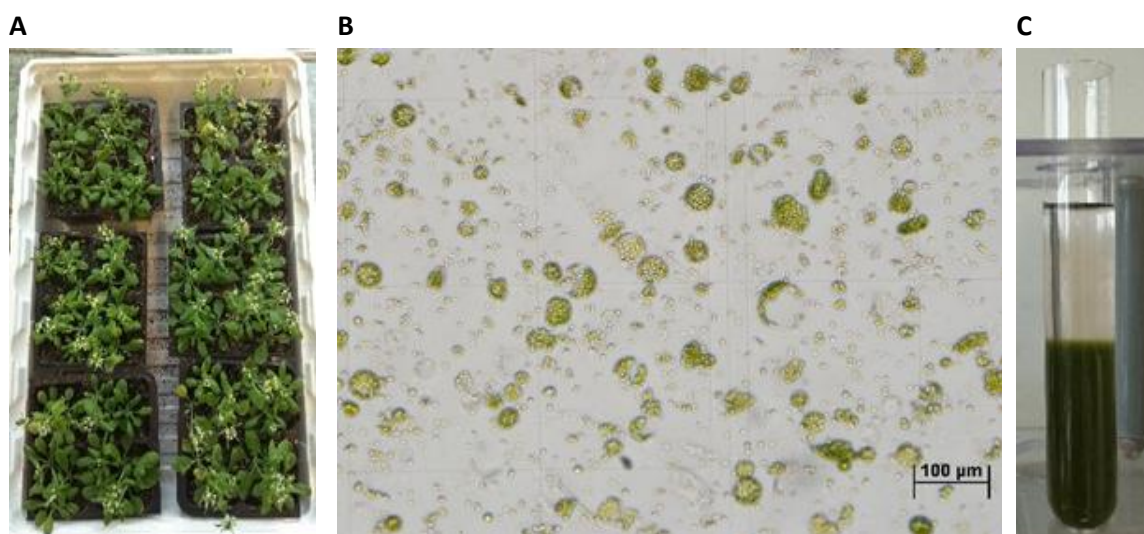
4 VÝSLEDKY

4.1 Izolácia vakuol

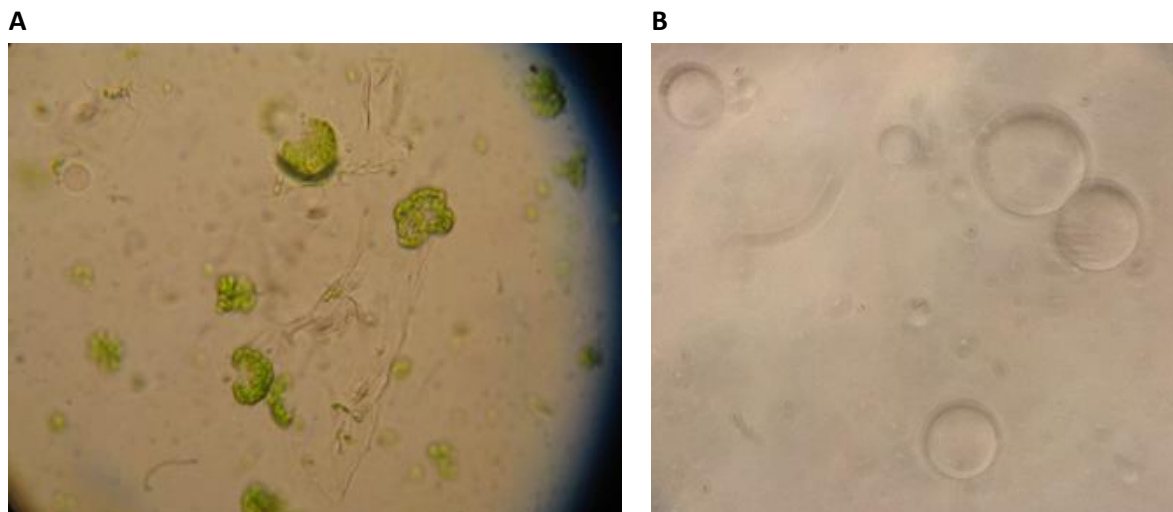
Vakuoly boli izolované zo suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler* (Obr. 11) v 5 biologických opakovaní, z čoho bolo získaných 51 209 533 protoplastov a vyzolovaných približne 10,6 milióna vakuol. Izolácie z celých rastlín *Arabidopsis* ekotyp *Ler* (Obr. 12) boli urobené len v 2 biologických opakovaní z dôvodu časovej náročnosti pestovania rastlín. Z týchto izolácií bolo získaných približne 1 800 000 protoplastov a 100 000 vakuol.



Obr. 11. 4-denná suspenzná kultúra buniek *Ath-Ler* – (A) suspenzná kultúra buniek, (B) protoplastová kultúra, zväčšenie 100x, (C) diskontinuálny hustotný gradient (v poradí od spodu: lyzačný pufor s protoplastovou kultúrou, 4% ficoll, vakuolárny pufor).



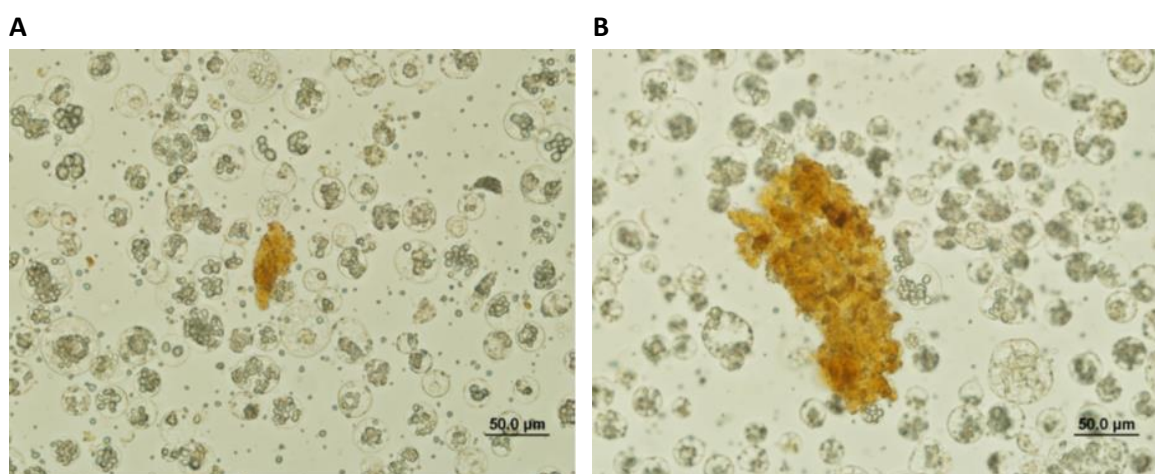
Obr. 12. 40-denný rastlinný materiál *Ath-Ler*. (A) *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Ler*, (B) protoplastová kultúra, zväčšenie 200x, (C) diskontinuálny hustotný gradient (v poradí od spodu: lyzačný pufor s protoplastovou kultúrou, 4% ficoll, vakuolárny pufor).



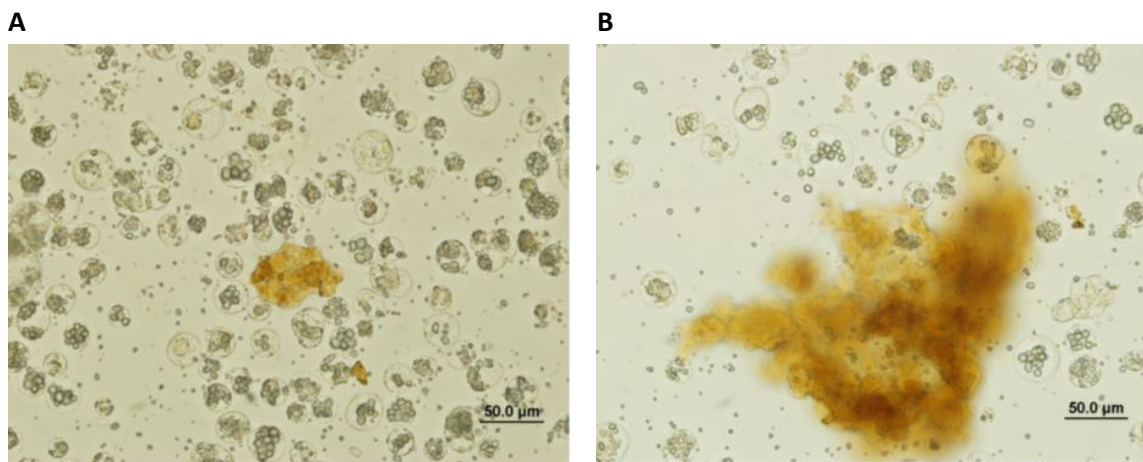
Obr. 13. (A) Lýza protoplastov po pridání lyzačního pufru (obrázek vznikol spojením 2 fotografií o rôznej hladine ostrosti), (B) vyizolované vakuoly, zväčšenie 200x.

4.1.1 Aplikácia magnetických mikročastíc

Pokus bol urobený na protoplastovej kultúre buniek, aby bola vylúčená ich nešpecifická interakcia. Ako je viditeľné z Obr. 14 a Obr. 15, pravdepodobne nedochádzalo k žiadnej nešpecifickej väzbe medzi protoplastovou kultúrou a magnetickými mikročasticami. Ďalej na vyizolované vakuoly boli aplikované magnetické mikročastice bez protilátky, no neúspešne, nakoľko vakuoly pri vzájomnej interakcii s časticami popraskali. Dôvodom mohli byť rozmery častíc, ale aj ich nepravidelný tvar, ktorý mohol spôsobiť rozbitie vakuol o hranu častíc. Z týchto dôvodov nebolo možné pokračovať v experimente s naväzovaním protilátky špecificky na antigén na povrch izolovaných vakuol.



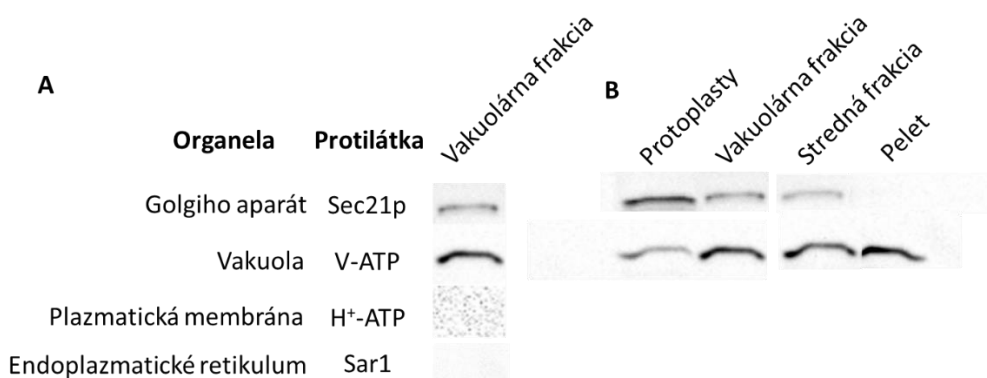
Obr. 14. Naviazanie magnetických mikročastíc povrchovo ošetrovaných chitosanom A na protoplastovú kultúru *Ath-Ler*. (A) zväčšenie 100x, (B) zväčšenie 200x.



Obr. 15. Naviazanie magnetických mikročastíc povrchovo ošetrovaných chitosanom A a BSA na protoplastovú kultúru *Ath-Ler*. (A) zväčšenie 100x, (B) zväčšenie 200x.

4.2 Overenie čistoty frakcií vyizolovaných vakuol

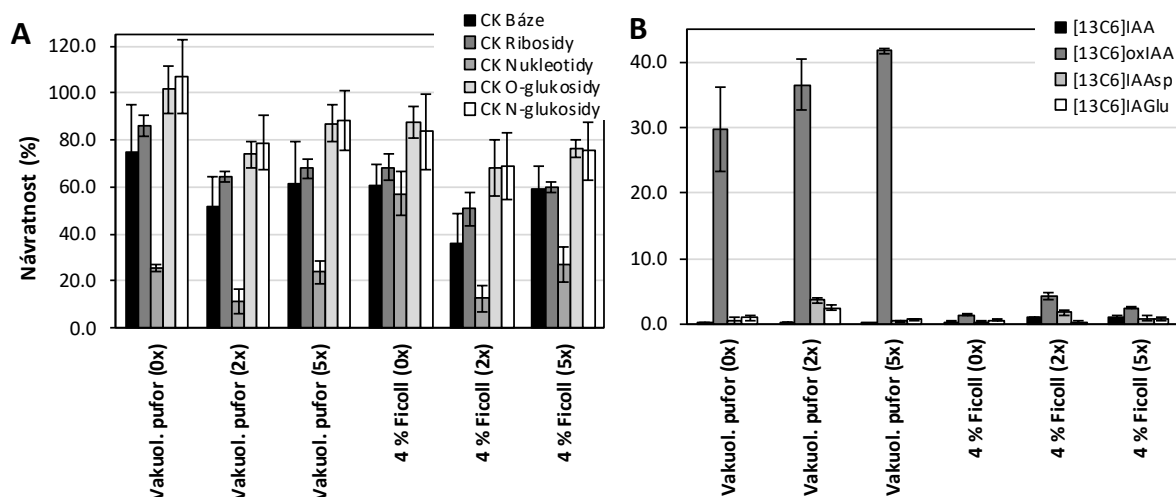
V tomto pokuse bola otestovaná prítomnosť možných kompartmentov, ktoré by potenciálne mohli kontaminovať izolované vakuoly. Overenie čistoty vakuolárnych kompartmentov vo vzorke izolovaných vakuol a vo vzorke protoplastov bolo prevedené pomocou western-blottingu. Ako je viditeľné z Obr. 16 neboli detekované len čisté markery vakuolárnej frakcie, ale aj markery frakcie z Golgiho aparátu pri použití príslušných protilátok.



Obr. 16. Čistota izolovaných vakuol zo suspenznej kultúry *Ath-Ler* (A) Schéma znázorňujúca prítomnosť markerov kompartmentov rastlinnej bunky vo vakuolárnej frakcii, (B) Schéma ukazujúca rozdelenie markerov vakuol a Golgiho aparátu vo frakciách gradientu s porovnaním so vzorkou protoplastov.

4.3 Optimalizácia purifikácie fytohormónov zo vzoriek izolácie vakuol

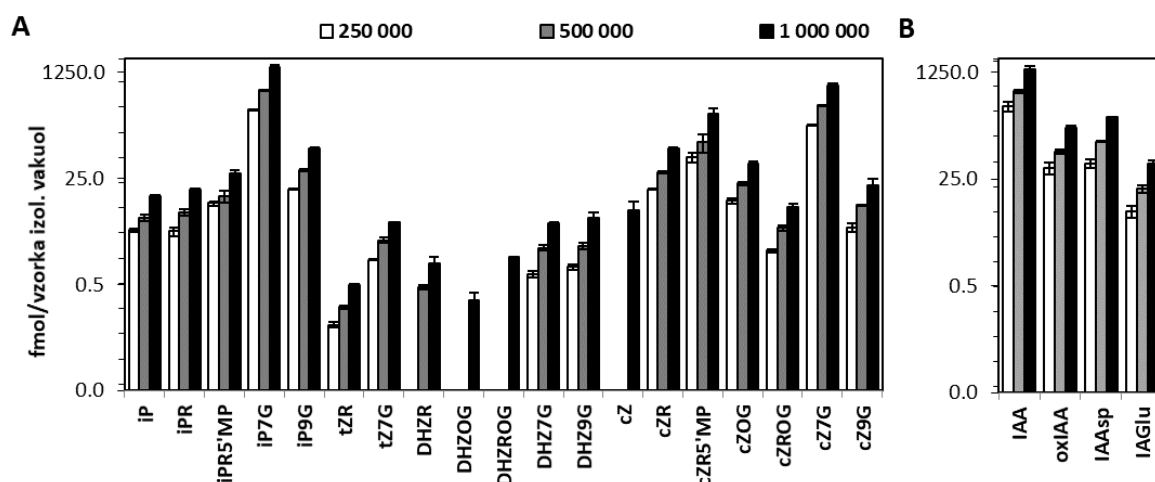
Na zistenie fytohormonálnych hladín auxínov a cytokinínov bola prevedená SPE purifikácia pomocou Oasis[®] MCX kolón (podľa Dobrev a Kamínek, 2002). Aby bolo zistené optimálne množstvo nanášania vzoriek vo vakuolárnom pufri a 4% Ficollu, bol urobený experiment na zistenie návratnosti fytohormónov z týchto pufrov (Obr. 17; Príloha A). Z výsledkov je zrejmé, že návratnosť SPE metódy pri zisťovaní cytokinínových hladín (Obr. 17A) je veľmi dobrá pri rôznych riedeniach týchto pufrov (Tab. 1), na rozdiel od návratnosti pri zisťovaní



Obr. 17. Návratnosť(%) cytokinínových (A) a auxínových (B) značených štandardov pridaných do rôzne riedených (0×, 2×, 5×) izolačných pufov (vakuolárny pufo. a 4% Ficoll) a izolovaných pomocou SPE postupu (Oasis® MCX). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD (n=3).

auxínových profilov (Obr. 17B). Najvyššiu hodnotu pre 2-oxindol-3-ylactovú kyselinu (oxIAA) vykazuje vakuolárny pufo. pri 5-násobnom riedení. Konečné riedenie (3×) bolo kompromisom pre dobrú návratnosť ako cytokinínových, tak auxínových metabolitov v zmesi vakuolárneho pufo. a 4% Ficollu, ktorého zloženie ale nie je možné určiť.

Experiment bol zopakovaný pri metóde nanášania rôzneho množstva vakuol zo suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler* v týchto pufoch (Obr. 18). V tomto prípade v oboch prípadoch fytohormonálnych hladín cytokinínov aj auxínov je výťažnosť SPE izolácie porovnateľná. Výsledky ukazujú dvojnásobný nárast hladín detekovaných hormonálnych metabolitov pri narastajúcom množstve nanesených vakuol (Príloha B). Optimálne množstvo nanášania vakuol na kolónu je vo väčšine prípadov už 250 000 (Obr. 18).

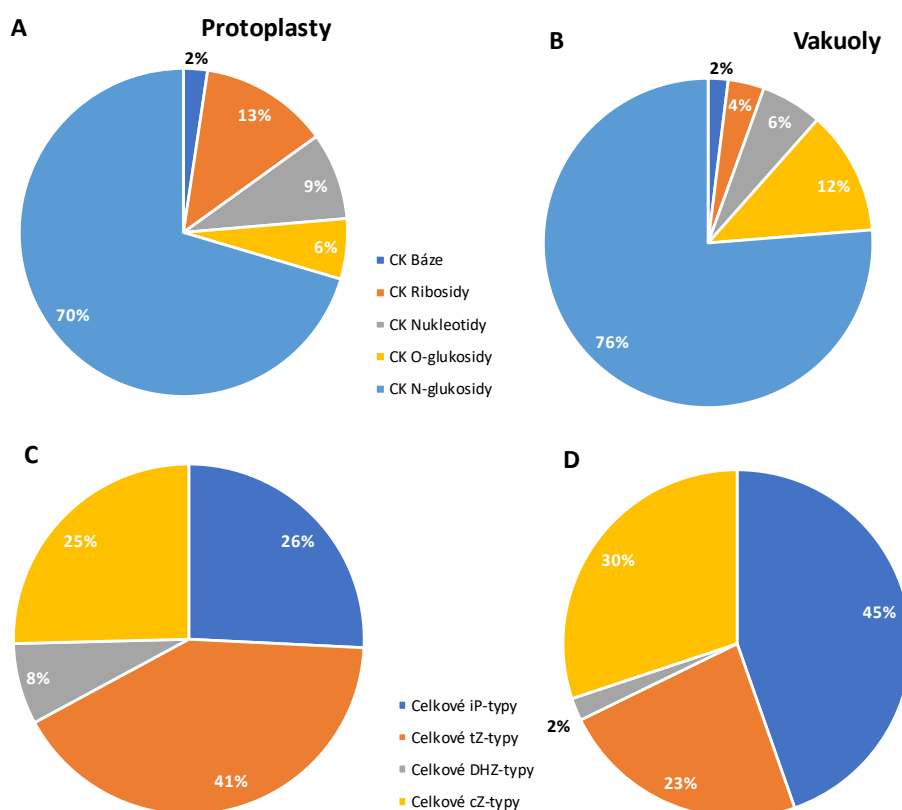


Obr. 18. Voľba optimálneho množstva izolovaných vakuol zo suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler* nanesených na kolónu Oasis MCX. (A) Cytokinínový profil a (B) auxínový profil v fmol prepočítaných na vzorku obsahujúcu 250 000, 500 000 a 1 000 000 izolovaných vakuol. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD (n=3).

4.4 Stanovenie cytokinínov a auxínov v protoplastoch a izolovaných vakuolách

V ďalšom experimente boli analyzované vzorky protoplastov (celkovo 1 800 000/vzorka) a vakuol (100 000/vzorka) izolovaných z celých rastlín a suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler*. V Tab. 2 sú uvedené zistené koncentrácie cytokinínových a auxínových profilov, ktoré boli stanovené v fmol-pmol hladinách, pričom sú prepočítané na 100 000 protoplastov/vakuol na vzorku. Bol zistený aj rádrový rozdiel v koncentračných hladinách cytokinínov a auxínov u vakuol izolovaných z celých rastlín v porovnaní s vakuolami izolovanými zo suspenznej kultúry buniek.

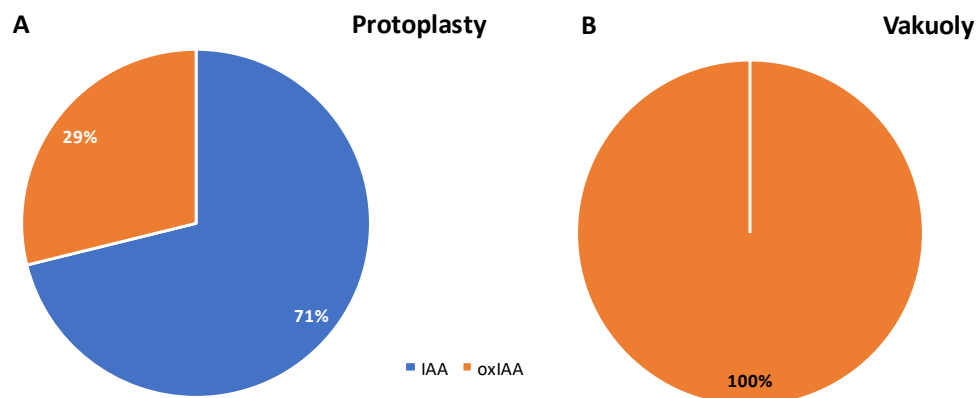
Porovnaním distribúcie cytokinínových metabolitov vo vzorke z protoplastov a vakuol z celých rastlín *Ath-Ler* bolo zistené, že v protoplastoch aj vakuolách sú najviac zastúpené *N*-glukosidy (70% v protoplastoch a 76% vo vakuolách) (Obr. 19A,B). V protoplastoch boli najviac zastúpené CK metabolity odvodené od *tZ* typov (Obr. 19C), pričom vo vakuolách sa v najväčšom množstve vyskytovali *iP* typy (Obr. 19D). Pri stanovovaní distribúcie auxínov vo vzorke z protoplastov z celých rastlín bolo zistené, že najviac zastúpené v protoplastoch je IAA (71% v protoplastoch) (Obr. 20A). Okrem IAA však boli v protoplastoch detekované hladiny oxIAA (1400 ± 293 fmol/100 000 protoplastov, Tab. 2).



Obr. 19. Distribúcia cytokinínov (ich metabolitov a CK typov) v izolovaných protoplastoch a vakuolách izolovaných z celých rastlín *Arabidopsis* ekotyp *Ler*.

Tabuľka 2. Koncentrácia auxínov a cytokinínov (fmol/100 000 protoplastov/vakuol, priemer $\pm$ SD, n=3)

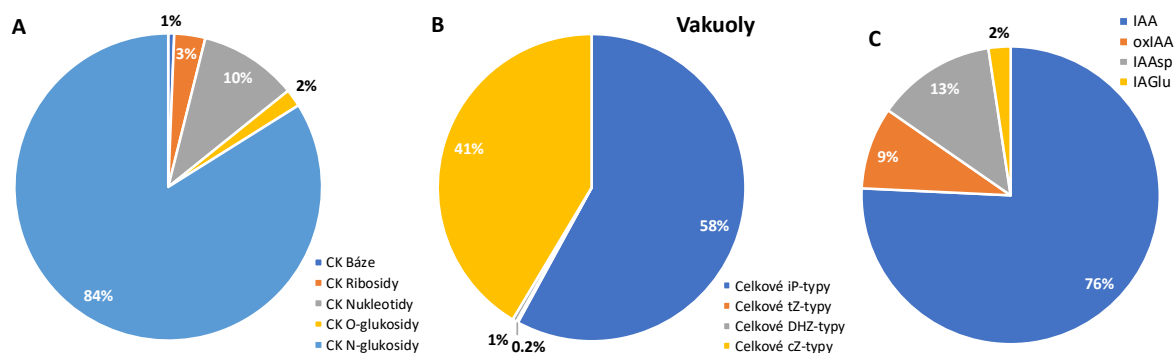
Fytormóny	Arabidopsis thaliana ekotyp Ler		Suspennzná kultúra buniek Ath-Ler
	Protoplasty	Vakuoly	Vakuoly
AUXÍNY			
IAA	3452,9 $\pm$ 838,7	n.d.	141,3 $\pm$ 17,7
oxIAA	1400,2 $\pm$ 293,0	856,5 $\pm$ 33,2	16,6 $\pm$ 0,9
IAA _{sp}	n.d.	n.d.	24,1 $\pm$ 0,5
IA _{glu}	n.d.	n.d.	4,5 $\pm$ 0,5
CYTOKINÍNY			
iP	13,7 $\pm$ 4,3	30,37 $\pm$ 2,74	1,27 $\pm$ 0,10
iPR	38,8 $\pm$ 4,4	28,04 $\pm$ 2,69	1,66 $\pm$ 0,08
iPRMP	3,97 $\pm$ 0,62	5,16 $\pm$ 0,59	3,02 $\pm$ 0,30
iP7G	108,8 $\pm$ 15,3	621,0 $\pm$ 22,6	152,1 $\pm$ 8,96
iP9G	5,12 $\pm$ 0,68	23,39 $\pm$ 0,59	7,46 $\pm$ 0,42
Celkové iP-typy	170,4 $\pm$ 22,8	708,0 $\pm$ 27,7	165,5 $\pm$ 9,6
tZ	n.d.	n.d.	n.d.
tZR	5,79 $\pm$ 0,47	2,90 $\pm$ 0,27	0,048 $\pm$ 0,003
tZRMP	0,64 $\pm$ 0,28	1,06 $\pm$ 0,22	n.d.
tZOG	13,5 $\pm$ 2,03	169,4 $\pm$ 4,0	n.d.
tZROG	3,38 $\pm$ 0,46	4,12 $\pm$ 0,35	n.d.
tZ7G	192,2 $\pm$ 24,9	137,4 $\pm$ 12,7	0,49 $\pm$ 0,01
tZ9G	57,7 $\pm$ 7,2	52,5 $\pm$ 8,5	n.d.
Celkové tZ-typy	273,3 $\pm$ 34,5	367,1 $\pm$ 17,1	0,54 $\pm$ 0,01
DHZ	1,93 $\pm$ 0,37	n.d.	n.d.
DHZR	1,56 $\pm$ 0,10	2,59 $\pm$ 0,16	0,11 $\pm$ 0,03
DHZRMP	n.d.	n.d.	n.d.
DHZOG	0,22 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,01	0,028 $\pm$ 0,009
DHZROG	0,77 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,14	0,14 $\pm$ 0,01
DHZ7G	43,8 $\pm$ 6,1	26,9 $\pm$ 2,81	0,47 $\pm$ 0,02
DHZ9G	1,31 $\pm$ 0,20	2,24 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,13
Celkové DHZ-typy	49,6 $\pm$ 6,7	33,5 $\pm$ 3,1	1,26 $\pm$ 0,11
cZ	n.d.	n.d.	0,78 $\pm$ 0,27
cZR	37,7 $\pm$ 3,1	22,8 $\pm$ 1,0	7,50 $\pm$ 0,23
cZRMP	52,2 $\pm$ 6,7	89,8 $\pm$ 5,3	26,5 $\pm$ 6,5
cZOG	6,82 $\pm$ 1,38	6,60 $\pm$ 0,50	4,32 $\pm$ 0,32
cZROG	14,6 $\pm$ 3,5	12,1 $\pm$ 1,3	0,87 $\pm$ 0,12
cZ7G	55,4 $\pm$ 7,4	326,0 $\pm$ 11,9	76,7 $\pm$ 5,4
cZ9G	1,18 $\pm$ 0,26	20,4 $\pm$ 0,7	1,95 $\pm$ 0,48
Celkové cZ-typy	167,9 $\pm$ 17,9	477,6 $\pm$ 19,3	118,3 $\pm$ 6,2
<i>Celkové CK báze</i>	15,7 $\pm$ 4,5	31,1 $\pm$ 3,0	1,79 $\pm$ 0,47
<i>Celkové CK ribosidy</i>	83,8 $\pm$ 7,9	56,3 $\pm$ 3,6	9,31 $\pm$ 0,14
<i>Celkové CK nukleotidy</i>	56,8 $\pm$ 6,8	95,7 $\pm$ 4,7	29,5 $\pm$ 6,2
<i>Celkové CK O-glukosidy</i>	39,4 $\pm$ 6,7	193,3 $\pm$ 2,2	5,30 $\pm$ 0,48
<i>Celkové CK N-glukosidy</i>	465,5 $\pm$ 60,7	1209,8 $\pm$ 58,4	239,7 $\pm$ 13,8
Celkové cytokiníny	661,2 $\pm$ 80,3	1586,3 $\pm$ 66,8	285,6 $\pm$ 10,7



Obr. 20. Distribúcia auxínov (IAA a oxIAA) v izolovaných protoplastoch a vakuolách izolovaných z celých rastlín *Arabidopsis* ekotyp *Ler*.

Ostatné IAA metabolity (IAAsp a IAGlu) neboli detekované. U vakuol bol detekovaný len oxIAA (Obr. 20B), pravdepodobne ide o výsledok nízkej návratnosti auxínov behom SPE izolácie (Obr. 17B).

Pri určovaní distribúcie cytokinínových a auxínových profilov vo vakuolách suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler* (Obr. 21) bolo zistené, že výsledky sú čiastočne porovnateľné s výsledkami cytokinínových distribúcií zistenými z celých rastlín (Obr. 19). V cytokinínových profiloch vykazujú opäť najvyššiu hodnotu *N*-glukosidy (84%, Obr. 22A), avšak prevažujú okrem iP typov i CK metabolity odvodené od *cZ* (Obr. 21B). V prípade auxínov je najviac zastúpená IAA, ďalej boli okrem oxIAA detekované aj IAAsp a IAGlu (Obr. 21C). V prípade izolácie zo suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler* sú jednotlivé cytokiníny zastúpené vo vyšších koncentráciách a auxíny v nižších koncentráciách ako v prípade rastlinného materiálu (Tab. 2).



Obr. 21. Distribúcia cytokinínov (ich metabolitov a CK typov, A-B) a auxínov (C) v izolovaných vakuolách suspenznej kultúry buniek *Ath-Ler*.

5 DISKUSIA

Na imunomagnetickú separáciu bunkových kompartmentov boli vybrané vakuoly, kvôli dostupnosti protilátky proti týmto organelám a overeným postupom pri ich izoláciách s dosahovaním dobrej čistoty a intaktnosti organel.

Izolácie vakuol boli robené podľa protokolu Robert *et al.* (2007) zo 4-dennej suspenzie bunkovej kultúry, ale aj z celých 40-denných rastlín *Ath-Ler*, aby sa overila výťažnosť izolácie a porovnala sa odolnosť vakuol z týchto 2 rôznych materiálov. Touto metódou sme boli schopní vyizolovať vakuoly bez zásadných kontaminácií inými endomembránovými kompartmentami. Je to vďaka osmotickému a tepelnému rozrušeniu protoplastov odvodených z mezofylových buniek *Arabidopsis*, ktorá slúži ako modelový organizmus pre tento experiment (Robert *et al.*, 2007). Dôležitým krokom pri porušení bunky je dosiahnutie vysokého výťažku bielkovín a zachovanie štruktúrnych vlastností a funkčnej integrity organel. Stav poškodenia buniek možno sledovať imunochemicky alebo mikroskopicky (Lee *et al.*, 2010). V oboch prípadoch nemôžeme hovoriť o 100% výťažnosti, nakoľko vakuoly po izolácii veľmi rýchlo popraskali alebo vôbec neboli vyizolované. Medzi príčiny tohto javu patrí teplota jednotlivých roztokov hustotného gradientu, s čím súvisí následné premiešavanie jednotlivých fáz pri pipetovaní alebo malá hustota buniek suspenznej kultúry (Shimaoka *et al.*, 2004). Taktiež vyizolované vakuoly nebolo možné prenášať, pretože boli natoľko krehké, že nárazmi popraskali. Napriek tomu však celkom v 7 biologických opakovaniach bolo vyizolovaných približne 10,7 milióna vakuol.

Keďže bolo nutné zistiť pred použitím protilátky na imunomagnetickú separáciu samotnú interakciu vakuoly – magnetickej mikročastice, boli tieto častice aplikované priamo k vyizolovanej vakuolárnej frakcii. Z mikroskopického pozorovania bolo po interakcii zistené, že magnetické mikročastice svojim tvarom a veľkosťou značne prevyšujú rozmery vakuol. Povrch týchto mikročastíc bolo tiež potrebné modifikovať, pretože samotné častice neposkytujú funkčné skupiny k naviazaniu protilátok (Plačková *et al.*, 2017). K tomu je často využívaný chitosan, čo je syntetický derivát chitínu, ktorý obsahuje voľné aminoskupiny, na ktoré sa môžu naviazať proteíny, imunoglobulíny, enzýmy, DNA či iné ligandy (Abi-Ghanem a Bergham, 2012). Pri aplikácii magnetických mikročastíc povrchovo ošetrených chitosanom na protoplastovú kultúru buniek pravdepodobne nedošlo k nešpecifickej väzbe medzi protoplastovou kultúrou a mikročasticami (Obr. 15 a 16). Aj v tomto prípade však boli potvrdené predpoklady z experimentu s vakuolárnou frakciou, že rozmery častíc, ale aj ich nepravidelný tvar, mohli spôsobiť rozbitie vakuol o hranu častíc.

Z tohto dôvodu nebolo možné pokračovať v špecifickom naväzovaní protilátky na antigén na povrchu vyzolovaných vakuol. Možným riešením by bolo použitie magnetických nanočastíc, ktoré majú menší a pravidelne guľovitý tvar alebo izolácia kompaktnejších organel napríklad mitochondrií (Chen *et al.*, 2016) alebo chloroplastov.

Ďalším krokom bolo zistenie čistoty frakcií vyzolovaných vakuol. Boli zaznamenávané aj markery frakcie z Golgiho aparátu pri použití príslušných protilátok (Obr. 16). Signály Golgiho aparátu boli pozorované z dôvodu odškrcovania váčkov tzv. kondenzujúcich vakuol alebo prevakuol z jeho trans-strany povrchu, nakoľko vakuoly a Golgiho aparát so sebou v bunke navzájom interagujú (Procházka, 1998).

Pri zisťovaní fytohormonálnych hladín auxínov a cytokinínov sa postupovalo metódou UHPLC/MS-MS (Novák *et al.*, 2012; Novák *et al.*, 2017). V súčasnej dobe boli publikované len dve práce, ktoré ukázali fytohormonálne profily auxínov a cytokinínov vo vakuolách (Ranocha *et al.*, 2013; Jiskrová *et al.*, 2016). Aby bolo zistené optimálne množstvo nanášania protoplastov a vakuol na SPE kolóny, bol prevedený experiment na určenie návratnosti vakuolárneho pufu a 4% Ficollu a experiment s nanášaním rôzneho počtu vakuol. Z týchto experimentov sme zistili, že vyzolované vakuoly, ktoré boli nanášané na kolónu v neznámom pomere vakuolárneho pufu a 4% Ficollu, je možné detekovať na zistenie fytohormonálnych hladín už pri nanesení v množstve 250 000 organel. Jiskrová *et al.* (2016) pracovali so vzorkami o veľkosti 150 000 protoplastov a 30 000 vyzolovaných vakuol. Podobné množstvo protoplastov (200 000) bolo použité tiež k profilovaniu cytokinínov v izolovaných bunkových populáciách odvodených od štyroch mutantných línií *Arabidopsis* značených pomocou zeleného fluorescenčného proteínu vneseného do špecifických buniek koreňovej špičky (Antoniadi *et al.*, 2015).

Metódou UHPLC/MS-MS bolo zistené, že vo vzorkách zo suspenznej kultúry buniek aj z listov rastlín sa v prípade cytokinínov najviac vyskytujú v protoplastoch aj vo vakuolách *N*-glukosidy (Obr. 20A,B) a v prípade auxínov IAA (Obr. 21A,B). Distribúcia auxínov v protoplastoch a vakuolách bola rozdielna od hormonálnych profilov publikovaných pre celé rastliny (Pěňčík *et al.*, 2018), korene a listy (Novák *et al.*, 2012) alebo vakuoly (Ranocha *et al.*, 2013). Výsledný auxinový profil uvádzaný v tejto práci bol asi ovplyvnený zlou návratnosťou auxinových metabolitov behom SPE izolácie (Obr. 17). Pre stanovenie auxinových metabolitov z izolovaných kompartmentov sa javia ako vhodnejšie metódy využívajúce iných SPE protokolov, napr. reverzná stacionárna fáza C8 (Pěňčík *et al.*, 2009) alebo polymerná stacionárna fáza HLB (Novák *et al.*, 2012).

V protoplastoch sú v prípade cytokinínov najviac zastúpené *tZ* typy, zatiaľ čo u vakuol *iP* typy. Je pozoruhodné, že hladiny týchto detekovaných fytohormónov sa líšia v závislosti na východnom materiáli. V prípade 4-dennej suspenznej kultúry sú hladiny cytokinínov približne o 10% vyššie ako v prípade 40-denného rastlinného materiálu, ale hladiny auxínov sú u rastlinného materiálu vyššie zhruba o 20%. Tento jav mohol byť spôsobený časovým obmedzením rastu, a teda účinkom fytohormónov na organizmus alebo biologickou variabilitou. V porovnaní s prácou (Jiskrová *et al.*, 2016) sú výsledky porovnateľné v zastúpení *tZ* typov cytokinínov, najmä *trans*-zeatín-*O*-glukosidu (*tZOG*), ale líšia sa v zastúpení *iP* typov. V našom prípade (izolácie z celých rastlín *Arabidopsis*) bol detekovaný metabolit izopentenyladenín-N7-glukosid (*iP7G*), kdežto v spomínanej práci (izolácie z listov *Arabidopsis*) nebol tento metabolit vo vakuolách vôbec detekovaný.

6 ZÁVER

Experimentálne ciele tejto bakalárskej práce (príprava imunomagnetických nosičov, zoznámenie sa s metódami izolácie vakuol a ich následná charakterizácia, stanovenie auxínov a cytokinínov v izolovaných kompartmentoch pomocou LC-MS) boli splnené čiastočne.

Metódou hustotne gradientovej centrifugácie boli úspešne vyizolované vakuoly zo suspenznej kultúry buniek a z listov rastlín *Ath-Ler*. Avšak kvôli praskaniu vakuol a ich rozmerové nekompatibilité s magnetickými mikročasticami nebolo možné pokračovať v experimente špecifického naviazania protilátky na antigén, a tým bol experiment v tejto fázi ukončený. Ako možné riešenie problému sa ponúka voľba menšieho rozmeru magnetických mikročastíc a ich použitie pri izolácii kompaktnejšej organely, napr. mitochondrií alebo chloroplastov.

Ostatné ciele práce boli splnené. Bola dosiahnutá optimalizácia metódy izolácie vakuol pre stanovenie cytokinínových profilov. U analýzy auxínových metabolitov sa ukazujú byť vhodnejšími metódy purifikácie založené na iných typoch sorbentov než boli používané zmesné kolóny MCX, ktoré kombinujú reverzné a iónovo výmenné fázy.

Fytohormonálne hladiny auxínov a cytokinínov vo vakuolách zo 4-dennej suspenznej kultúry buniek a 40-denných rastlín *Ath-Ler* boli stanovené. Taktiež boli stanovené vybrané skupiny auxínov a cytokinínov v protoplastoch izolovaných z listov.

7 ZOZNAM LITERATÚRY

- Abi-Ghanem D.A., Bergham L.R. (2012) Immunoaffinity chromatography: A review. In *Affinity Chromatography* (Sameh Magdeldin, ed.), pp. 91-106, InTech, Shanghai, China.
- Baker D.A. (2000) Long-distance vascular transport of endogenous hormones in plant and their role in source:sink regulation. *Isr J Plant Sci* **48**, 199-203.
- Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pěňčík A., Wang B., Rosquete M.R., Zhu J., Dobrev P.I., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J., Kleine-Vehn J. (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485**, 119-122.
- Bartůňková J., Šedivá A. (1997) Imunologie - Minimum pro praxi, pp. 37-38, Triton, Praha, ČR.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B., Feldmann K.A. (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948-950.
- Briggs W.R. (2014) Phototropism: some history, some puzzles, and a look ahead. *Plant Physiol* **164**, 13-23.
- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W.B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J* **34**, 13-26.
- Caesar K., Thamm A.M.K., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* **62**, 5571-5580.
- Campbell, D.H.; Luescher, E. & Lerman, L.S. (1951) Immunologic Adsorbents: I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-Protein Antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **37**, 575-578.
- Chen C.M., Kristopeit S.M. (1981) Metabolism of Cytokinin: Deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiol* **68**, 1020-1023.
- Chen W.W., Freinkman E., Wang T., Birsoy K., Sabatini D.M. (2016) Absolute quantification of matrix metabolites reveals the dynamics of mitochondrial metabolism. *Cell* **166**, 1324-1337.
- Chen Y.F., Randlett M.D., Findell J.L., Schaller G.E. (2002) Localization of the Etylen receptor ETR1 on Endoplasmatic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 19861-19866.
- Darwin C., Darwin F. (1880) The power of movement in plants. John Murray, London.
- Davies P.J. (2010) Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!, pp. 204-710, Springer, New York, USA.
- 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.
- Estelle M., Weijers D., Ljung K., Leyser O. (2011) Auxin signaling: From Synthesis to Systems Biology, pp. 253, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

- Faktor J., Dvorakova M., Maryas J., Struharova I., Bouchal P. (2012) Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies. *Klin Onkol* **25**, 2S70-77.
- Ferenčík M. (1989) Imunochémia, pp.180-191, Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava, SR.
- Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmülling T., Frébort I. (2004) Cytokinin oxidase/ dehydrogenase genes in barley and wheat Cloning and heterologous expression. *Eur J Biochem* **271**, 3990–4002.
- GE Healthcare (2007) Affinity chromatography: Principles and methods, Uppsala, Sweden.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **49**, 161-169.
- Gross J.H. (2017) Mass spectrometry: A Textbook, Springer, Heidelberg, Germany.
- Harrison S.T.L. (2011) Cell disruption. In *Comprehensive biotechnology*, 2nd edition (Moo-Young, ed.), pp. 619-640, Elsevier, Oxford, UK.
- Holčápek M., Jirásko R., Lída M. (2012) Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A* **1259**, 3-15.
- Jackson R.G., Kowalczyk M., Li Y., Higgins G., Ross J., Sandberg G., Bowles D.J. (2002) Overexpression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indol-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J* **32**, 573-583.
- Jiskrová E., Novák O., Pospíšilová H., Holubová K., Karády M., Galuszka P., Robert S., Frébort I. (2016) Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. *N Biotechnol* **33**, 735-742.
- 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.
- Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 814-819.
- Klouda P. (2003) Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, ČR.
- Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K.Y., Kwon M., Endler A., Song W.Y., Martinoia E., Sakakibara H., Lee Y. (2014) *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 7150-7155.
- Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* **64**, 2541-2555.
- Köllmer I., Novák O., Strnad M., Schmülling T., Werner T. (2014) Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *Plant J* **78**, 359-371.

- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lavy M., Estelle M. (2016) Mechanisms of auxin signaling. *Development* **143**, 3226-3229.
- Lee Y.H., Tan H.T, Chung M.C.M. (2010) Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics* **10**, 3935-3956.
- Li G., Liu K., Baldwin S.A., Wang D. (2003) Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *J Biol Chem* **278**, 35732-35742.
- Ljung K. (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**, 943-950.
- Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J Exp Bot* **62**, 5149-5159.
- Ludwig-Müller J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**, 1757-1773.
- Luštinec J., Ťárský V. (2006) Úvod do fyziologie vyšších rostlin, pp. 191-196, Karolinum, Praha, ČR.
- Macháčková I. (1998) Růstové regulátory. In *Fyziologie rostlin* (Leinerová, ed.), pp. 240-285. Academia, Praha, ČR.
- 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.
- Moser A.C., Hager D.S. (2010) Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* **2**, 769-790.
- Novák O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., Ljung, K. (2012) Tissue specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J* **72**, 523-536.
- Novák O., Pěňčík A., Ljung K. (2014) Identification and profiling of auxin and auxin metabolites. In *Auxin and its role in plant development*. (Zažímalová, Petrášek, Benková, eds.), pp. 39-60, Springer, Vienna, Austria.
- Novák O., Antoniadis I., Ljung K. (2017) High-resolution cell-type specific analysis of cytokinins in sorted root cell populations of *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Hormones: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1497 (Kleine-Vehn, Sauer, eds.), pp. 231-248, Springer, New York, USA.
- Núñez O., Gallart-Ayala H., Martins C.P., Lucci P. (2012) New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J Chromatogr A* **1228**, 298-323.

- Normanly J. (2010) Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001594.
- Osugi A., Sakakibara H. (2015) Q&A :How do plants respond to cytokinins and what is their importance?. *BCM Biol* **13**, 102.
- Östin A., Kowalczyk M., Bhalerao R.P., Sandberg G. (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**, 285-296.
- Pan X., Wang X. (2009) Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *J Chromatogr B* **877**, 2806-2813.
- Pavlová L. (2005) Fyziologie rostlin, 1 edice, pp. 234-241. Karolinum, Praha, ČR.
- Pěničák A., Rolčík J., Novák O., Magnus V., Barták P., Buchčík R., Salopek-Sondi B., Strnad M. (2009) Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta* **80**, 651-655.
- Pěničák A., Casanova-Sáez R., Pilařová V., Žukauskaitė A., Pinto R., Luis Micol J., Ljung K., Novák O. (2018) Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **69**, 2569-2579 .
- Plačková L., Oklešťková J., Pospíšková K., Poláková K., Buček J., Stýskala J., Zatloukal M., Šafařík I., Zbořil R., Strnad M., Doležal K., Novák O. (2017) Microscale magnetic microparticle-based immunopurification of cytokinins from *Arabidopsis* root apex. *Plant J* **89**, 1065-1075.
- Porco S., Pěničák A., Rashed A., Voß U., Casanova-Sáez R., Bishoop A., Golebiowska A., Bhosale R., Swarup K., Peňáková P., Novák O., Staswick P., Hedden P., Phillips A.L., Vissenberg K., Bennett M.J., Ljung K. (2016) Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 11016-11021.
- Pospiskova, K. and Safarik, I. (2013) Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydr. Polym* **96**, 545-548.
- Powers S.K., Strader L.C. (2016) Up in the air: Untethered Factors of Auxin Response. *F1000Res* **5**(F1000 Faculty Rev), 133.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., Gloser J., Havel L., Nátr L., Prášil I., Sladký Z., Šantrůček J., Tesařová M., Vyskot B. (1998) Fyziologie rostlin (1. vydání), Academia, Praha, ČR.
- Ramos M.S., Abele R., Nagy R., Grotemeyer M.S., Tampé R., Rentsch D., Martinoia E. (2011) Characterization of a transport activity for long-chain peptides in barley mesophyll vacuoles. *J Exp Bot* **62**, 2403-2410.
- Ranocha P., Dima O., Nagy R., Felten J., Corratgé-Faillie C., Novák O., Morreel K., Lacombe B., Martinez Y., Pfrunder S., Jin X., Renou J.P., Thibaud J.B., Ljung K., Fischer U., Martinoia E., Boerjan W., Goffner D. (2013) *Arabidopsis* WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nat Commun* **4**, 2625.

- Reemmer J., Murphy A. (2014) Intercellular transport of auxin. In *Auxin and its role in plant development* (Zažímalová, Petrášek, Benková, eds.), pp. 75-100, Springer, Vienna, Austria.
- Reisen D., Marty F., Leborgne-Castel N. (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol* **5**, 13.
- Robert S., Zouhar J., Carter C., Raikhel N. (2007) Isolation of intact vacuoles from Arabidopsis rosette leaf-derived protoplasts. *Nat Protoc* **2**, 259-262.
- Salaš J., Kolínský J., Moravec J., Ustohalová E. (1988) Analytická chemia: učebnice pre stredné zdravotnícke školy, pp. 245-251, Osveta, Martin, SR.
- Shimaoka T., Ohnishi M., Sazuka T., Mitsuhashi N., Hara-Nishimura I., Shimazaki K.I., Maeshima M., Yokota A., Tomizawa K.I., Mimura T. (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**, 672–683.
- Skoog F., Armstrong D.J. (1970) Cytokinins. *Ann Rev Plant Physiol* **21**, 359-384.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct Plant Biol* **39**, 267-284.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiriyaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C., Suza W. (2005) Characterization of an arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**, 616-627.
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplace L., Bennett M.J. (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **10**, 946–954.
- Šmehilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T., Galuszka P. (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Front Plant Sci* **7**, 1264.
- Taiz L., Zeiger E. (2010) Plant Physiology, Sinauer Associates, Inc., USA.
- Tarkowska D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014) Quo vadis plant hormones analysis. *Planta* **240**, 55-76.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chem Listy* **98**, 834-841.
- Taylor N.L. (2017) Isolation of plants organelles and structures. Methods and protocols. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1511 (Taylor, Miller, eds.), Springer Protocols, Berlín, Nemecko.
- Trentmann O., Haferkamp I. (2013) Current progress in tonoplast proteomics reveals insight into the function of the large central vacuole. *Front Plant Sci* **4**, 1-10.
- Vodrážka Z. (1982) Fyzikální chemie pro biologické vědy. Academia, Praha, ČR.

- Wang R., Estelle M. (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway, *Curr Opin Plant Biology* **21**, 51-58.
- Went F.W. (1934) A test method for rhizocaline, the root forming substance. *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amst.* **37**, 445-455.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H., Schmülling T. (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**, 2532-2550.
- Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmülling T. (2011) The cytokinin receptors of arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* **156**, 1808-1818.
- Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2013) Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnol Adv* **31**, 97-117.
- Zhang C., Hicks G.R., Raikhel N.V. (2015) Molecular composition of plant vacuoles: Important but less understood regulations and roles of tonoplast lipids. *Plants* **4**, 320–333.
- Zhang J., Lin J.E., Harris C., Campos Mastrotti Pereira F., Wu F., Blakeslee J.J., Peer W.A. (2016) DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 11010-11015.
- Zhang K., Novák O., Wei Z., Gou M., Zhang X., Yu Y., Yang H., Cai Y., Strnad M., Jun Liu C. (2014) Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat Commun* **5**, 3274.
- Zhao Y. (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant* **5**, 334-338.
- Zhao Z., Zhang Y., Liu X., Zhang X., Liu S., Yu X., Ren Y., Zheng X., Zhou K., Jiang L., Guo X., Gai Y., Wu C., Zhai H., Wang H., Wan J. (2013) A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell* **27**, 113-122.
- Zürcher E., Müller B. (2016) Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function – Advances and New Insights. *Int Rev Cell Mol Bio* **342**, 1-38.

Príloha A – Návratnosť fytohormónov pridaných do rôzne riedených izolačných pufrov

Návratnosť (%) auxínových a cytokinínových značených štandardov - SPE Oasis MCX (Priemer $\pm$ SD, n=3)

	$[^{13}\text{C}_6]\text{IAA}$	$[^{13}\text{C}_6]\text{oxIAA}$	$[^{13}\text{C}_6]\text{IAAsp}$	$[^{13}\text{C}_6]\text{IAGlu}$	Celkové auxíny
Vakuol. pufor (0x)	0.08 $\pm$ 0.08	29.8 $\pm$ 6.4	0.4 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 13.1
Vakuol. pufor (2x)	0.18 $\pm$ 0.04	36.6 $\pm$ 3.8	3.6 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 15.1
Vakuol. pufor (5x)	0.03 $\pm$ 0.01	41.9 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 18.0
4 % Ficoll (0x)	0.22 $\pm$ 0.13	1.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.5
4 % Ficoll (2x)	0.88 $\pm$ 0.06	4.2 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 1.6
4 % Ficoll (5x)	0.94 $\pm$ 0.43	2.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.8

	$[^{13}\text{C}_5]\text{tZ}$	$[^{13}\text{C}_5]\text{cZ}$	$[^2\text{H}_3]\text{DHZ}$	$[^2\text{H}_6]\text{iP}$	CK Báze
Vakuol. pufor (0x)	88.9 $\pm$ 1.8	79.7 $\pm$ 2.4	89.9 $\pm$ 1.8	40.9 $\pm$ 7.0	75 $\pm$ 20
Vakuol. pufor (2x)	59.4 $\pm$ 2.6	52.7 $\pm$ 1.6	63.5 $\pm$ 2.4	30.6 $\pm$ 4.4	52 $\pm$ 13
Vakuol. pufor (5x)	72.8 $\pm$ 5.4	66.6 $\pm$ 3.6	75.6 $\pm$ 4.0	31.8 $\pm$ 10.3	62 $\pm$ 18
4 % Ficoll (0x)	71.4 $\pm$ 9.2	59.5 $\pm$ 9.4	64.8 $\pm$ 10.2	46.4 $\pm$ 5.9	61 $\pm$ 9
4 % Ficoll (2x)	45.3 $\pm$ 7.8	37.8 $\pm$ 6.2	45.5 $\pm$ 6.2	14.7 $\pm$ 6.2	36 $\pm$ 13
4 % Ficoll (5x)	67.5 $\pm$ 2.2	59.8 $\pm$ 1.3	66.4 $\pm$ 2.1	43.3 $\pm$ 1.5	59 $\pm$ 10

	$[^2\text{H}_5]\text{tZR}$	$[^2\text{H}_3]\text{DHZR}$	$[^2\text{H}_6]\text{iPR}$	CK Ribosidy
Vakuol. pufor (0x)	98.0 $\pm$ 4.5	95.6 $\pm$ 2.6	65.5 $\pm$ 6.1	86 $\pm$ 4
Vakuol. pufor (2x)	72.4 $\pm$ 1.7	72.2 $\pm$ 3.2	48.7 $\pm$ 1.6	64 $\pm$ 2
Vakuol. pufor (5x)	74.0 $\pm$ 3.3	77.9 $\pm$ 3.3	51.7 $\pm$ 6.5	68 $\pm$ 4
4 % Ficoll (0x)	83.9 $\pm$ 8.5	63.7 $\pm$ 6.2	57.5 $\pm$ 2.4	68 $\pm$ 6
4 % Ficoll (2x)	63.3 $\pm$ 7.4	51.6 $\pm$ 7.5	37.7 $\pm$ 6.6	51 $\pm$ 7
4 % Ficoll (5x)	67.3 $\pm$ 3.1	61.9 $\pm$ 2.2	50.8 $\pm$ 1.2	60 $\pm$ 2

	$[^2\text{H}_5]\text{tZR5'MP}$	$[^2\text{H}_3]\text{DHZR5'MP}$	$[^2\text{H}_6]\text{iPR5'MP}$	CK Nukleotidy
Vakuol. pufor (0x)	12.8 $\pm$ 3.6	18.2 $\pm$ 0.8	45.6 $\pm$ 0.5	26 $\pm$ 2
Vakuol. pufor (2x)	3.9 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 1.5	25.9 $\pm$ 13.8	12 $\pm$ 5
Vakuol. pufor (5x)	10.4 $\pm$ 3.0	17.9 $\pm$ 5.1	42.9 $\pm$ 7.0	24 $\pm$ 5
4 % Ficoll (0x)	22.2 $\pm$ 7.6	37.9 $\pm$ 8.4	111.5 $\pm$ 12.6	57 $\pm$ 10
4 % Ficoll (2x)	4.8 $\pm$ 1.6	6.0 $\pm$ 2.2	27.3 $\pm$ 13.2	13 $\pm$ 6
4 % Ficoll (5x)	8.4 $\pm$ 3.6	15.2 $\pm$ 7.3	58.0 $\pm$ 11.9	27 $\pm$ 8

	$[^2\text{H}_5]\text{tZOG}$	$[^2\text{H}_5]\text{tZROG}$	$[^2\text{H}_9]\text{DHZOG}$	CK O-glukosidy
Vakuol. pufor (0x)	90.5 $\pm$ 20.8	111.3 $\pm$ 6.0	102.7 $\pm$ 2.7	102 $\pm$ 10
Vakuol. pufor (2x)	64.4 $\pm$ 14.0	85.2 $\pm$ 2.6	71.9 $\pm$ 0.9	74 $\pm$ 6
Vakuol. pufor (5x)	79.8 $\pm$ 16.1	92.7 $\pm$ 4.8	88.5 $\pm$ 2.4	87 $\pm$ 8
4 % Ficoll (0x)	78.1 $\pm$ 6.0	101.8 $\pm$ 5.2	82.5 $\pm$ 9.3	87 $\pm$ 7
4 % Ficoll (2x)	55.2 $\pm$ 13.7	81.7 $\pm$ 11.4	67.5 $\pm$ 10.1	68 $\pm$ 12
4 % Ficoll (5x)	65.8 $\pm$ 6.3	86.0 $\pm$ 2.9	77.0 $\pm$ 2.7	76 $\pm$ 4

	$[^2\text{H}_5]\text{tZ7G}$	$[^2\text{H}_5]\text{tZ9G}$	$[^2\text{H}_3]\text{DHZ7G}$	$[^2\text{H}_6]\text{iP7G}$	$[^2\text{H}_6]\text{iP9G}$	CK N-glukosidy
Vakuol. pufor (0x)	119.9 $\pm$ 7.3	125.9 $\pm$ 10.1	112.8 $\pm$ 5.5	91.4 $\pm$ 1.8	85.5 $\pm$ 6.2	107 $\pm$ 16
Vakuol. pufor (2x)	88.3 $\pm$ 1.2	90.0 $\pm$ 1.5	87.6 $\pm$ 3.0	65.9 $\pm$ 1.4	63.2 $\pm$ 4.5	79 $\pm$ 12
Vakuol. pufor (5x)	94.1 $\pm$ 3.7	102.4 $\pm$ 5.3	99.4 $\pm$ 12.8	74.9 $\pm$ 3.4	70.9 $\pm$ 3.1	88 $\pm$ 13
4 % Ficoll (0x)	99.9 $\pm$ 4.8	104.8 $\pm$ 7.0	79.9 $\pm$ 11.3	64.1 $\pm$ 8.9	69.9 $\pm$ 5.5	84 $\pm$ 16
4 % Ficoll (2x)	83.6 $\pm$ 11.7	85.2 $\pm$ 11.6	68.9 $\pm$ 6.6	50.5 $\pm$ 6.5	56.4 $\pm$ 8.2	69 $\pm$ 14
4 % Ficoll (5x)	85.4 $\pm$ 2.9	92.0 $\pm$ 4.7	76.9 $\pm$ 2.7	63.3 $\pm$ 1.6	60.2 $\pm$ 1.7	76 $\pm$ 12

Príloha B – Voľba optimálneho množstva izolovaných vakuol

Cytokininový a auxinový profil (koncentrácia fmol/vzorka izolovaných vakuol; priemer ± SD, n=3)

Vakuoly	IAA	oxIAA	IAAsp	IAAGlu
250,000	361.6 ± 66.3	37.3 ± 8.1	44.8 ± 7.2	7.7 ± 1.7
500,000	624.1 ± 31.7	67.5 ± 5.7	99.1 ± 2.9	17.6 ± 2.3
1,000,000	1413.0 ± 177.0	166.4 ± 8.8	241.3 ± 5.4	44.7 ± 4.5

Vakuoly	CK Báze	CK Ribosidy	CK Nukleotidy	CK O-glukosidy	CK N-glukosidy	Celkové cytokininy
250,000	3.7 ± 0.3	20.3 ± 0.9	64.9 ± 11.0	12.7 ± 1.1	515.5 ± 7.5	617.1 ± 18.7
500,000	5.8 ± 0.8	38.8 ± 2.6	109.5 ± 33.4	24.6 ± 1.7	1057.6 ± 8.4	1236.3 ± 28.3
1,000,000	17.9 ± 4.7	93.1 ± 1.4	295.1 ± 62.4	53.0 ± 4.8	2397.0 ± 138.3	2856.1 ± 106.9

Vakuoly	iP	iPR	iPRS'MP	iP7G	iP9G	Celkové iP-typy
250,000	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.5	10.0 ± 0.8	315.8 ± 7.4	16.6 ± 0.3	349.6 ± 8.3
500,000	5.8 ± 0.8	7.2 ± 0.8	12.8 ± 2.8	643.0 ± 11.6	33.7 ± 1.1	702.6 ± 11.4
1,000,000	12.7 ± 1.0	16.6 ± 0.8	30.2 ± 3.0	1520.9 ± 89.6	74.6 ± 4.2	1655.0 ± 96.0

Vakuoly	tZ	tZR	tZRS'MP	tZOG	tZROG	tZ7G	tZ9G	Celkové tZ-typy
250,000	n.d.	0.11 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	1.2 ± 0.0	n.d.	1.3 ± 0.0
500,000	n.d.	0.22 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	2.5 ± 0.2	n.d.	2.7 ± 0.2
1,000,000	n.d.	0.48 ± 0.03	n.d.	n.d.	n.d.	4.9 ± 0.1	n.d.	5.4 ± 0.1

Vakuoly	DHZ	DHZR	DHZRS'MP	DHZOG	DHZROG	DHZ7G	DHZ9G	Celkové DHZ-typy
250,000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.73 ± 0.09	0.95 ± 0.09	1.7 ± 0.1
500,000	n.d.	0.45 ± 0.03	n.d.	n.d.	n.d.	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2	4.3 ± 0.2
1,000,000	n.d.	1.1 ± 0.3	n.d.	0.28 ± 0.09	1.4 ± 0.0	4.7 ± 0.2	5.7 ± 1.3	12.6 ± 1.1

Vakuoly	cZ	cZR	cZRS'MP	cZOG	cZROG	cZ7G	cZ9G	Celkové cZ-typy
250,000	n.d.	16.6 ± 0.4	54.9 ± 10.3	11.0 ± 1.2	1.7 ± 0.1	176.1 ± 4.3	4.1 ± 0.6	264.5 ± 12.0
500,000	n.d.	31.1 ± 1.6	96.7 ± 32.2	20.6 ± 1.3	4.0 ± 0.4	365.1 ± 9.9	9.2 ± 0.2	526.7 ± 37.9
1,000,000	7.8 ± 2.7	75.0 ± 2.3	264.9 ± 65.2	43.2 ± 3.2	8.7 ± 1.2	766.7 ± 54.4	19.5 ± 4.8	1183.2 ± 62.3