



Akademie věd České republiky

Teze disertace
k získání vědeckého titulu "doktor věd"

Cytokininy a jejich deriváty – identifikace, kvantifikace a vztahy mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou

Karel Doležal
Ústav experimentální botaniky AVČR
Olomouc, září 2013



Akademie věd České republiky

Teze disertace
k získání vědeckého titulu "doktor věd"
ve skupině biologicko-ekologických věd

Cytokininy a jejich deriváty – identifikace, kvantifikace a vztahy mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru botanika a fyziologie rostlin

Karel Doležal
Ústav experimentální botaniky AVČR
Olomouc, září 2013

Poděkování:

Chtěl bych touto cestou poděkovat všem kolegům, a to zejména z Laboratoře růstových regulátorů a Izotopové laboratoře ÚEB AVČR, ale mnoha dalším, kteří mně po celou dobu vytvářeli optimální podmínky pro vzájemnou spolupráci. Velmi bych chtěl poděkovat především Prof. Miroslavu Strnadovi, jehož pracovitost, manažerské schopnosti a laskavý přístup ke kolegům jsou pro mne stálým vzorem a mohou za to, že se i po 21 letech působení v Laboratoři růstových regulátorů každé ráno znovu těším do práce. Také děkuji své rodině, bez jejíž vytrvalé podpory a pochopení by tato práce nikdy nemohla spatřit světlo světa.

POUŽITÉ ZKRATKY

Ade	adenin
Ado	adenosin
AHK3,AHK4	cytokininové receptory z <i>A. thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
BAPR	6-benzylaminopurin ribosid, 6-benzylamino-9- β -D-ribofuranosylpurin
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
CDK	cyklin-dependentní kináza
CE	chemické ionizace
CK	cytokinin
DHZ	dihydrozeatin, 6-[(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino]purin
DHZR	dihydrozeatin ribosid, 6-[(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino]-9- β -D-ribofuranosylpurin
DMAPP	dimetylallyl pyrofosfát
EI	ionizace elektron-impact (EI)
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi
ESI	ionizace elektrosprejem
FAB	ionizace rychlými atomy
GC-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysoko-účinná kapalinová chromatografie- hmotnostní spektrometrie
IAA	kyselina indol-3-ylactová
IAC	imunoafinitní chromatografie
INCYDE	2-chloro-6-[(3-methoxyfenyl)amino]purin (INhibitor CYtokininové Degradace)
iP	N^6 -isopentenyladenin, 6-[(3-methylbut-2-enyl)amino]purin
iPA	N^6 -isopentenyladenosin
iPMP	N^6 -isopentenyladenosin-5'-monofosfát, 6-[(3methylbut-2-en-1-yl)amino]-9- β -D-ribofuranosylpurin-5'-fosfát
iPDP	N^6 -isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPTP	N^6 -isopentenyladenosin-5'-trifosfát

K	kinetin, 6-(2-furfurylamino)purin
MemT	<i>meta</i> -methoxytopolin, 6-(3-methoxybenzylamino)purin
MemTR	<i>meta</i> -methoxytopolin ribosid
MeoT	<i>ortho</i> -methoxytopolin, 6-(2-methoxybenzylamino)purin
MeoTR	<i>ortho</i> -methoxytopolin ribosid
MIPs	molecularly imprinted polymers (molekulárně vtištěné polymery)
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
mT	<i>meta</i> -topolin, 6-[(3-hydroxybenzyl)amino]purin
mTR	<i>meta</i> -topolin ribosid
NMR	nukleární magnetická rezonance
oT	<i>ortho</i> -topolin, 6-[(2-hydroxybenzyl)amino]purin
oTR	<i>ortho</i> -topolin ribosid
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilylace
TFA	trifluoracetylace
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TMS	trimethylsilylace
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin, <i>trans</i> -6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
2MeSCKs	2-methylthio-deriváty cytokininů

OBSAH

1. Úvod	7
2. Cytokininy, jejich charakteristika	7
3. Moderní analytické postupy pro stanovení cytokininů	8
3.1. Extrakce a purifikace	9
3.2. Derivatizace	11
3.3. Vývoj kvantifikačních metod pro endogenní cytokininy a jejich deriváty	13
3.4. Biosyntéza cytokininů a měření její rychlosti	16
4. Vztahy mezi chemickou strukturou a biol. aktivitou cytokininů a jejich derivátů	19
4.1. Syntéza a cytokininová aktivita N ⁶ -substituovaných derivátů adeninu	19
4.2. Protinádorová aktivita cytokininů a jejich derivátů	26
5. Aplikační možnosti vybraných derivátů aromatických cytokininů v rostlinných tkáňových kulturách	30
6. Závěr	34
7. Perspektivy výzkumu N ⁶ -substituovaných derivátů adeninu	35
8. Literatura	36
9. Seznam publikací autora použitých v DSc. disertaci	43
10. Seznam všech publikací autora	46

1. Úvod

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou přirozeně se vyskytující organické látky, které ovlivňují fyziologické procesy v rostlinách ve velmi nízkých koncentracích (Davies et al., 2004). Zejména se jedná o procesy, které jsou součástí růstu a vývoje, ale také např. otevírání průduchů. Syntéza fytohormonu je obvykle lokalizována v jedné části rostliny (jako v případě živočišných hormonů) a látka je pak translokována do části jiné, kde vyvolá fyziologickou reakci. Existují ale i fytohormony (ethylén), kde fyziologická odezva může nastat přímo v místě biosyntézy (Davies et al., 2004).

Slovo „hormone“ pochází z řečtiny, kde znamená „stimulovat, uvádět do pohybu“. V moderní medicíně se tento termín začal používat zhruba před sto lety pro stimulační faktory, schopné nést chemický signál. Koncept rostlinných hormonů je odvozen od studií německého botanika Sachse, který již kolem roku 1880 vyslovil hypotézu, že „morfologické rozdíly mezi rostlinnými orgány jsou způsobeny rozdíly v jejich chemickém složení“ a postuloval tak existenci kořen-formujících, květ-formujících a dalších látek, které jsou schopné se v rostlině pohybovat různými směry (Davies et al., 2004). Přibližně v téže době prováděl Darwin svá originální pozorování fototropizmu a předpověděl existenci signálu, který je transportován z vrcholu koleoptyle do jiných částí rostliny, kde stimuluje růst. Tato látka byla později nazvána auxinem, a následně izolována a identifikována jako kyselina indol-3-ylactová (IAA) (Wildman, 1997).

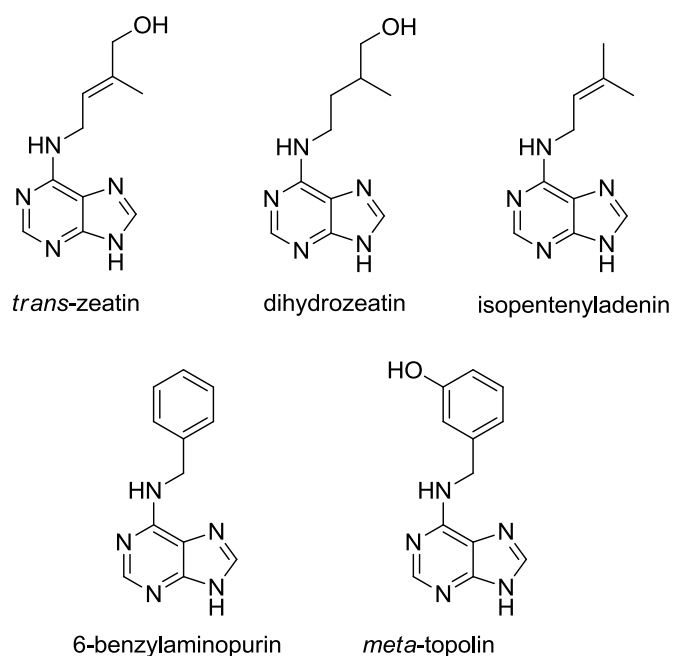
Jiné vědecké směry vedly k objevu dalších skupin rostlinných hormonů: fytopatologický výzkum vedl ke giberelinům, studium rostlinných tkáňových kultur pak k cytokininům, atd. (Davies et al., 2004).

2. Cytokininy, jejich charakteristika

K objevu cytokininů, jako samostatné skupiny rostlinných hormonů, došlo v polovině minulého století při hledání faktorů stimulujících dělení rostlinných buněk (Jablonski & Skoog, 1954; Miller et al, 1955). Osm let po objevu prvního cytokininu, kinetinu (Miller et al, 1955) byl první přirozený cytokinin identifikován v nezralém endospermu kukuřice a pojmenován zeatin (Z) (Letham, 1963). Od té doby bylo izolováno z přírodních zdrojů nebo

připraveno metodami organické syntézy velké množství látek s podobnou stimulační aktivitou. Byl také popsán vliv cytokininů na další důležité fyziologické procesy v rostlinách, např. stimulaci větvení stonků a odnožování rostlin, senescenci, klíčení semen, alokaci asimilátů a další. Je nutné zdůraznit, že na tyto procesy cytokininy působí v kooperaci s jinými rostlinnými hormony (Procházka et al., 1997).

Přirozeně se vyskytující cytokininy je možné strukturně charakterizovat jako N⁶-substituované deriváty adeninu (Ade) a podle povahy tohoto substituentu je možné je rozdělit na isoprenoidní a aromatické (Strnad, 1997) (Obrázek 1).



Obr. 1. Chemické struktury vybraných cytokininů

3. Moderní analytické postupy pro stanovení cytokininů

Rostlinné extrakty představují velmi komplexní, mnohasložkové směsi. Rostlinné hormony se v těchto extraktech obvykle vyskytují ve velice nízkých koncentracích (cytokininy méně než 50 pmol v gramu čerstvé hmoty). Kromě fytohormonů se v těchto extraktech vyskytuje v nízkých koncentracích i velké množství jiných organických molekul podobných fyzikálně-chemických vlastností, které mohou narušovat analýzu. Proto je možné požadované

přesnosti a citlivosti dosáhnout jen s důkladnou znalostí souvisejících analytických principů (Ljung et al., 2010).

Vývoj dostatečně citlivých analytických metod pro stanovení hladin fytohormonů v rostlinných pletivech má pak následně zásadní význam pro studium jejich úlohy a funkce v procesech růstu a vývoje.

3.1. Extrakce a purifikace

Moderní metody stanovení cytokininů sestávají z extrakce, přečistění vzorku a následné instrumentální analýzy jednotlivých metabolitů (Tarkowski et al., 2009). Příprava vzorku ovlivňuje všechny následné analytické kroky a je proto rozhodující pro jednoznačnou identifikaci a bezchybnou kvantifikaci analytu, zejména při stopové analýze (Du et al., 2012).

Pro extrakci cytokininů z rostlinného materiálu jsou z důvodu inhibice fosfatáz nejčastěji užívány směsi jako např. methanol:chloroform:voda:kys. mravenčí (12:5:2:1) (Bieleski, 1964) nebo metanol:voda:kys. mravenčí (15:4:1) (Hoyerová et al., 2006). Obvykle následuje extrakce na pevné fázi (SPE) s využitím různých typů sorbentů (Dobrev & Kamínek., 2002; Novák et al., 2003; Takei et al., 2003), kdy dojde k zachycení analytů na pevné fázi a tím k jejich separaci od jiných interferujících látek, původně přítomných ve vzorku, na základě jejich odlišných fyzikálně-chemických vlastností. Nejčastěji je využíván princip iontové výměny, SPE na reverzní fázi nebo jejich kombinace. Tradičně je stále velmi hojně užívána reverzní fáze C₁₈, která je vysoce efektivní při odstranění polárních látek a rostlinných pigmentů ze vzorku (Fu et al., 2011).

Pro zdárný a efektivní vývoj metody izolace a analýzy fytohormonů, založené na SPE, je důležité znát disociační konstanty (*pK*) stanovovaných analytů. Cytokinininy jsou amfoterní rostlinné hormony s *pK*_a ≈ 4 pro exocyklický atom dusíku N⁶ a *pK*_a ≈ 10 pro dusíkový atom N⁹ na imidazolovém kruhu. Na základě těchto vlastností mohou být cytokinininy protonizovány resp. deprotonizovány při pH < 3 resp. pH > 11 (Fu et al., 2011). Výjimku tvoří cytokininové nukleotidy, ty se při pH > 9,8 chovají jako vícenásobně nabitě anionty, i když jsou tyto látky běžně považovány za kyseliny (Béreš et al., 2010).

Z těchto důvodů je vždy důležité upravit pH vzorku tak, aby se analyty nacházely v protonizované, neutrální nebo deprotonizované formě v závislosti na použitém separačním módu a *pK*_a analytu. Pro ionotovou sílu elučního činidla je determinující opět pH a také

samozřejmě relativní obsah organického rozpouštědla. Pro maximální účinnost SPE musí být purifikační protokol vždy pečlivě optimalizován (Fu et al., 2011).

Velmi rychlý technický vývoj v hmotnostní spektrometrii během poslední dekády nám umožnil detekovat rostlinné hormony v miligramových množstvích vzorku (Svačinová et al., 2012) a odpovídat tak na stále více otázek kladených rostlinnou vývojovou biologii. Nedostatečná citlivost instrumentálních metod znamená v současné době již mnohdy menší problém než ztráta přesnosti při přípravě a purifikaci miligramových vzorků nebo kontaminace (Ljung et al., 2010). Částečné řešení poskytuje vývoj nových mikroextrakčních metod (Svačinová et al., 2012). Jednou z možností purifikace málo objemových vzorků je využití mikroextrakce na pevné fázi (SPME) (Du et al., 2012a), avšak použití této metody pro analýzy rostlinných hormonů je limitováno omezeným počtem komerčně dostupných typů vláken, vhodných pro aplikace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) (Liu et al., 2007). Příkladem moderní izolace je také nahrazení náplňových kolonek křemennými kapilárami obsahujícími polymerní monolity (PMME, polymer monolith microextraction) (Liu et al., 2010).

Zajímavou možností se v posledních letech stalo využití syntetických monolitických materiálů typu MIPs (molecularly imprinted polymers), sorbentů vyznačujících se vynikající chemickou stabilitou, široce využitelných k purifikaci biologických a farmaceutických vzorků (Du et al., 2012a). Tato metoda, založená na monolitu připraveném pomocí kinetinu jako templátu, byla již také využita k extrakci a zakoncentrování cytokininové frakce z hrubého rostlinného extraktu (Du et al., 2012b).

Dalším možným přístupem, již běžně užívaným při purifikaci miligramových vzorků např. v proteomice, je in-tip SPME (SPME v pipetovací špičce). Tato metoda, nazývaná StageTip (STop And Go Extraction Tip) purifikace, spočívá v umístění miniaturních disků složených z částic s aktivním povrchem (reverzní fáze, iontoměničce atd.) v běžné pipetovací špičce. Takto připravené mikrokolony se vyznačují flexibilitou, rychlým a snadným použitím, malým mrtvým objemem, vysokou kapacitou, návratností a reprodukovatelností purifikačního procesu (Rappsilber et al., 2007). Nedávno jsme poprvé popsali využití této purifikační metody pro přípravu 1-5 mg vzorků pro stanovení cytokininů v rostlinném materiálu, např. kořenových špičkách, embryích nebo meristémech (Svačinová et al., 2012).

Široký potenciál pro purifikaci rostlinných hormonů má imunoafinitní chromatografie (IAC) (Fu et al., 2011). Tato metoda je založena na specifické reakci polyklonální nebo

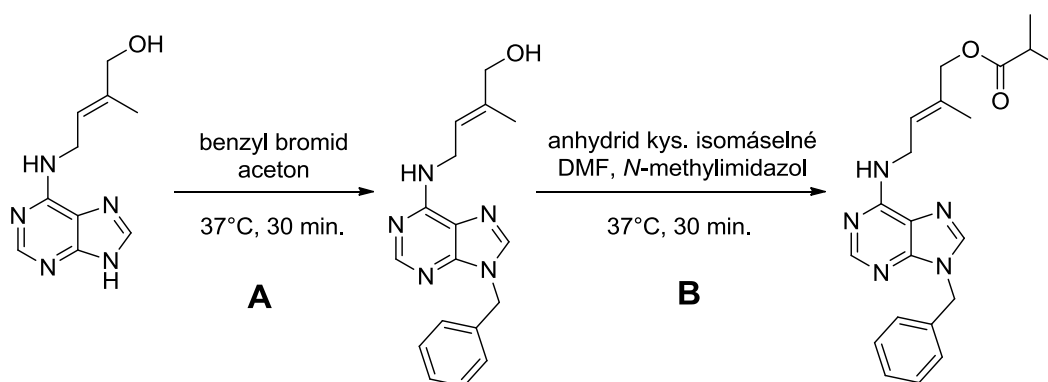
monoklonální protilátky s antigenem. Takto je možné dosáhnout vysoce selektivního zakoncentrování vzorku a je tak často finálním krokem izolace cytokininů z rostlinných extraktů (Hauserová et al., 2005; Novák et al., 2008; Fu et al., 2011; Liang et al., 2012). Jistou nevýhodou IAC v klasickém uspořádání je její omezená průchodnost (Du et al., 2012). Avšak naši laboratoři se podařilo prokázat, že ve vsádkovém uspořádání (Novák et al., 2008; Hauserová et al., 2005) dochází ke zvýšení průchodnosti IAC a zjednodušení celé přípravy vzorku až do té míry, že je vhodná k automatizaci (Du et al., 2012a).

3.2. Derivatizace

Zapojení derivatizace vzorku do analytických metod v širším slova smyslu může umožnit analýzu látek (zejména pomocí plynové chromatografie), které by jinak nebylo možné stanovit pro jejich nedostatečnou těkavost a/nebo stabilitu. Dobrým příkladem je trimethylsilylace netěkavých monosacharidů, poskytující těkavé deriváty vhodné pro analýzu plynovou chromatografií. Derivatizace může také zlepšit chromatografické vlastnosti (např. při separaci optických isomerů), případně detekční limit analytu (Knapp, 1979). V případě cytokininů je předpokladem pro zvýšení jejich těkavosti a tím také vhodnosti pro analýzu plynovou chromatografií chemická modifikace (substituce atomů vodíku) jejich polárních funkčních skupin. Otestovali jsme řadu derivatizačních metod, např. trimethylsilylaci (TMS), *tert*-butyldimethylsilylaci (TBDMS), permethylaci, trifluoracetylaci (TFA) a acetylaci (Ástot et al., 1998). Také nám se podařilo využít permethylace při identifikaci cytokininů (DHZR, oTR) v rostlinách vojtěšky (Goicoechea et al., 1995). Bohužel je nutné trimethylsilylované a permethylované deriváty cytokininových ribosidů a glukosidů mnohdy analyzovat při velmi vysokých teplotách (> 250°C). U volných cytokininových bazí dochází často po derivatizaci ke zhoršení jejich chromatografických vlastností. Další možností jsou acetylované deriváty cytokininů, které jsou většinou stabilní, je poměrně jednoduché je připravit, ale mnohdy jsou ještě méně těkavé. Z těchto důvodů se při separaci cytokininů před jejich analýzou hmotnostní spektrometrií začala stále častěji využívat kapalinová chromatografie. Avšak i zde se v mnoha případech derivatizace analytu ukázala výhodnou. U ionizace typu FAB (ionizace rychlými atomy) je dobře známa pozitivní korelace mezi povrchovou aktivitou analytu a intenzitou signálu (Ligon and Dorn, 1987; Shiea and Sunner, 1991). Je proto možné např. acetylací zvýšit citlivost stanovení cytokininových ribosidů a glukosidů pomocí LC/frit-FAB-MS. Zjistili jsme, že tento typ derivatizace také významně zvýší *m/z* mateřských iontů (zejména u cukerných konjugátů cytokininů) a to u tohoto typu ionizace (FAB) může mít významný

vliv na snížení signálu pozadí způsobeného zejména matričním efektem přidávaného glycerolu (Ástot et al., 1998). Hydroxylové skupiny těchto konjugátů jsou zřejmým cílem derivatizačních reakcí. Mohou být například esterifikovány reakcí s anhydridy karboxylových kyselin s výtěžkem vyšším než 90 procent. Navíc se nám podařilo zjistit, že iontový signál (proud) propionylovaného ZR je 20-krát silnější ve srovnání s nederivatizovanou sloučeninou. Tento fakt lze vysvětlit akumulací analytu v povrchové vrstvě kapek glycerolu z důvodu zvýšené povrchové aktivity derivátů (Ligon and Dorn, 1987; Shiea and Sunner, 1991).

U cytokininových volných bazí, N⁶-substituovaných derivátů adeninu, jsme z důvodu nepřítomnosti dostatečného počtu OH skupin v molekule zvolili jinou primární derivatizační metodu, a to benzylaci (Ástot et al., 1998). Monobenzylaci cytokininových bazí jsme docílili jednoduše, rozpuštěním vzorků ve směsi acetonu a benzyl bromidu (4:1, v/v), s následným zahřátím na 37°C po dobu 30 min. K dosažení vícenásobné benzylace jsme ke vzorkům obsahujícím cytokininy přidávali uhličitan draselný a poté je zahřívávali 30 minut na 70 °C (Obr. 2). Také příprava těchto derivátů je velmi jednoduchá, reakce probíhá s vysokým výtěžkem a zvyšuje citlivost následné analýzy hmotnostní spektrometrií (Ástot et al., 1998). Spektra FAB jsou v porovnání se spektry nederivatizovaných molekul bohatší (Tarkowski et al., 2004). Avšak využití různých postupů derivatizace pro analýzu různých cytokininových derivátů vyžadovalo před vlastní derivatizační procedurou pracné dělení rostlinných vzorků na několik frakcí pomocí HPLC (Ástot et al., 1998).



Obr. 2. Derivatizace zeatinu pro kvantitativní analýzu pomocí HPLC/frit-FAB-MS (Ástot et al., 1998). A. monobenzylace B. vznik esteru

Vznik hydrofobnějších derivátů má značný význam na dva aspekty LC-MS analýzy cytokininů. Zjistili jsme, že v důsledku zvýšené povrchové aktivity připravených derivátů se významně zvýšila nejen vlastní citlivost MS měření, ale také jejich retence na reverzní fázi, což vedlo k potlačení matričního efektu a tím dalšímu zvýšení citlivosti metody, a to nejen v případě frit-FAB ionizace (Ástot et al., 1998), ale také při ionizaci elektrosprejem (Nordström et al., 2004b). Zvýšení molekulové hmotnosti po derivatizaci, které posouvá signál jednotlivých iontů do oblasti o vyšším m/z , tedy do oblasti s nižším nespecifickým šumem, přispívá ke zvýšení citlivosti (Tarkowski et al., 2004) nezávisle na použité ionizaci. Navíc tento způsob derivatizace umožňuje souběžně analyzovat široké spektrum cytokininových derivátů s různou polaritou, z nichž separace některých není na reverzní fázi, bez derivatizace nebo použití ion-párových činidel, možná. (Nordström et al., 2004b). Zařazení derivatizačního kroku před LC-MS analýzou vede ke zvýšení selektivity a citlivosti samotného stanovení, ke změnám chromatografického rozlišení a fyzikálně-chemických vlastností u studovaných látek (Ljung et al., 2010). I přes značné výhody tohoto kroku je však v současnosti již upřednostňováno, tam kde je to možné, zkracování a maximální urychlení doby přípravy vzorků a s tím spojené stanovení cytokininů bez předchozí derivatizace.

3.3. Vývoj kvantifikačních metod pro endogenní cytokininy a jejich deriváty

Do konce 90. let byly, z důvodu nedostatečné citlivosti v té době dostupných instrumentálních technik, jedinou možností rutinní kvantifikace endogenních fytohormonů v rostlinném materiálu imunoanalytické metody (Badenoch-Jones et al., 1984; Strnad, 1996). Ojedinelé pokusy o využití hmotnostní spektrometrie byly činěny na transgenních rostlinách se zvýšeným obsahem cytokininů (Yang et al., 1993). Bohužel, i když imunoanalytická stanovení fytohormonů obvykle dosahují velmi vysoké citlivosti, přesnost může být zkreslena křížovou reaktivitou protilátky s příbuznými analyty nebo nečistotami nacházejícími se v rostlinných vzorcích (Ástot et al., 1998). Proto je nutné, k dosažení potřebné analytické přesnosti a správnosti, před zvolenou imunoanalytickou metodou předřadit HPLC frakcionaci (Badenoch-Jones et al., 1984; Strnad, 1996), což značně snižuje prostupnost metody.

Hmotnostní spektrometrie byla v té době využívána především k identifikaci nových cytokininových derivátů nebo k potvrzení výskytu specifického metabolitu v analyzovaném vzorku, za pomoci přímé introdukce (Summons et al., 1983) nebo ve spojení s plynovou chromatografií (Strnad et al., 1992; Strnad et al., 1994; Goicoechea et al., 1995). Tato

kombinace instrumentálních metod, spojených pomocí ionizace typu elektron-impact (EI) nebo chemické ionizace (CE), umožnila např. identifikaci zeatinu a jeho nukleotidů (Summons et al., 1983) nebo objev hydroxylovaných benzylaminopurinů (topolinů) jako přirozeně se vyskytujících a vysoce aktivních cytokininů v listech topolu (Horgan et al., 1975; Strnad et al., 1992; Strnad et al., 1994).

Konec 90. let přinesl s rozvojem snadno ovladatelných stolních hmotnostních spektrometrů radikální změny také do analýzy rostlinných hormonů a umožnil jejich kvantifikaci v miligramových množstvích vzorku (Ljung et al., 2010). Byly intenzivně testovány možnosti využití frit-FAB ionizace (Ástot et al., 1998; Ástot et al., 2000) a okrajově také jiných ionizačních technik pro kvantifikaci cytokininů (Yang et al., 1993). Avšak v posledních 10 letech je nejpoužívanější ionizační technikou (nejen) v analýze cytokininů ionizace elektrosprejem (ESI) (Novák et al., 2003; Nordström et al., 2004b; Novák et al., 2008 a mnoho dalších), zejména z důvodu vysoké citlivosti (Tarkowski et al., 2009; Fu et al., 2011). Pro svoji vysokou selektivitu analýzy komplikovaných matic jsou s výhodou využívány tandemové hmotnostní spektrometry, zejména trojitě kvadrupóly (Fu et al., 2011), disponující širokým lineárním rozsahem měření (Novák et al., 2008). Nejčastěji využívaným módem měření je selektivní záznam více iontových reakcí (MRM), kdy v prvním kvadrupolu je selektován mateřský iont, který je dále fragmentován a pouze vybranému dceřinému fragmentu je dovoleno proletět třetím kvadrupolem do detektoru. Znamená to, že specifický přechod mateřský iont \rightarrow dceřiný iont je pak považován za diagnostický, ukazující na přítomnost určitého analytu v extraktu (Fu et al., 2011).

Pokud u izomerů dochází ke shodné fragmentaci a vybraný MRM přechod je stejný, je nutné se zaměřit na jejich dokonalou chromatografickou separaci a předejít tak chybné kvantifikaci těchto izomerů (Svačinová et al., 2012). Další komplikací může být přirozený výskyt derivátů dihydrozeatinu (DHZ), lišících se od svých zeatinových (Z) analogů pouze o dvě hmotnostní jednotky. Při sledování signálu derivátů dihydrozeatinu je tudíž nutné počítat i s příspěvkem zeatinového izotopu M+2, a proto je opět důležitou součástí analýzy dokonalá separace (Tarkowski et al., 2004). Při použití klasického HPLC uspořádání se pro separaci cytokininových bazí a jejich cukerných konjugátů, které jsou relativně hydrofobními látkami, obvykle používají chromatografické kolony obsahující reverzní stacionární fázi (nejčastěji C₁₈). Separace je prováděna v kyselém prostředí, čehož je dosaženo přidávkem těkavých organických kyselin (kyselina mravenčí, octová) a jejich solí (kompatibilních s MS)

do mobilní fáze. Tou je nejčastěji směs voda/metanol nebo voda/acetoni-tril (Novák et al., 2003; Ge et al., 2005; Tarkowski et al., 2009). K dosažení dostatečné separace se obvykle používá gradientová eluce. Průměr použitých kolon se pohybuje od konvenčních (4,6 mm) po mikro (1 mm) a kapilární (0,3mm) (Tarkowski et al., 2009). Použití kapilární kolony významně zvýšilo citlivost detekce cytokininů pomocí LC-ESI-MS (Stirk et al., 2008). Na druhou stranu je nutné vzít v úvahu, že tento způsob miniaturizace snižuje maximální objem nástřiku (což je důležitý parametr zejména při analýze biologických vzorků), ale také dynamický rozsah a robustnost celé metody (Tarkowski et al., 2009).

Zejména z důvodu zajištění kontroly návratnosti purifikačního procesu je nezbytné k jednotlivým homogenizovaným vzorkům ještě před extrakcí přidávat isotopicky-značené (nejčastěji ^2H , ^{13}C a ^{15}N) standardy jednotlivých analytů (Novák et al., 2008; Fu et al., 2011; Du et al., 2012), mající téměř identické fyzikálně-chemické vlastnosti ve srovnání s endogenním analytem. Tento postup, nazývaný metoda izotopického zředování (Rittenberg & Foster, 1940), však přináší komplikace v případech, kdy odpovídající standardy nejsou komerčně dostupné.

Zavedení UHPLC (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie), která může pracovat za tlaku až do 1000 barů a kde používané kolony jsou naplněny částicemi $< 2\mu\text{m}$, přineslo další zdokonalení separace ve srovnání s klasickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (ve smyslu vyšší separační účinnosti, rozlišení, rychlosti a prostupnosti) (Nováková & Vlčková, 2009) také pro analýzu cytokininů (Novák et al., 2008) a dalších skupin rostlinných hormonů (Turečková et al., 2009; Miller & Munné-Bosch, 2011). Zároveň ale rychlá chromatografická separace vyžaduje, aby připojený hmotnostní detektor měl odpovídající skenovací rychlost a citlivost (Svačinová et al., 2012).

Cytokininové nukleotidy (mono-, di- a trifosfáty) a 2-methylthio-deriváty (2MeSCKs) se významně liší od klasických cytokininů svou polaritou a jsou analyzovány pomocí LC-MS samostatně, zejména proto, aby bylo dosaženo dokonalé separace všech isomerů (Tarkowski et al., 2010b; Běreš et al., 2010; Podlešáková et al., 2012), jejichž biologické vlastnosti (aktivita, distribuce atd.) jsou značně rozdílné (Sakakibara 2004; Strnad 1997). Zjistili jsme, že separaci cytokininových nukleotidů je výhodné provádět při $\text{pH} > 9,8$, kde se tyto látky chovají jako vícenásobně nabitě aniony. Běžné silikagelové stacionární fáze však nejsou stabilní při vysokém pH, proto je zapotřebí použít hybridních kolon, např. Gemini-NX. Nami vyvinutá metoda je pak robustnější a umožňuje výrazně vyšší počet nástřiků než obvykle

pro tento typ látek používaná ion-párová chromatografie, kde však často dochází ke kontaminaci iontového zdroje při následné MS analýze (Béres et al., 2010).

Dostatečnou separaci šesti isoprenoidních 2-methylthio cytokininů včetně derivátů *cis*- a *trans*-zeatinu pak umožnila metoda založená na chromatografické separaci za pomoci kolony obsahující reverzní fázi C₄ a mobilní fáze obsahující acetonitril a 20mM mravenčan amonný (Tarkowski et al., 2010b). Touto metodou se podařilo prokázat akumulaci 2-methylthio-*cis*-zeatinu (2MeScZ) (spolu s cZ) v rostlinách *A. thaliana*, infikovaných patogenem *Rhodococcus fascians* (Pertry et al., 2010), a jeho pozitivní vliv (spolu s ostatními přítomnými cytokininy iP- a zeatinového typu) na aktivaci exprese cytokininového receptoru CRE1/AHK4 a proliferaci rostlinných buněk.

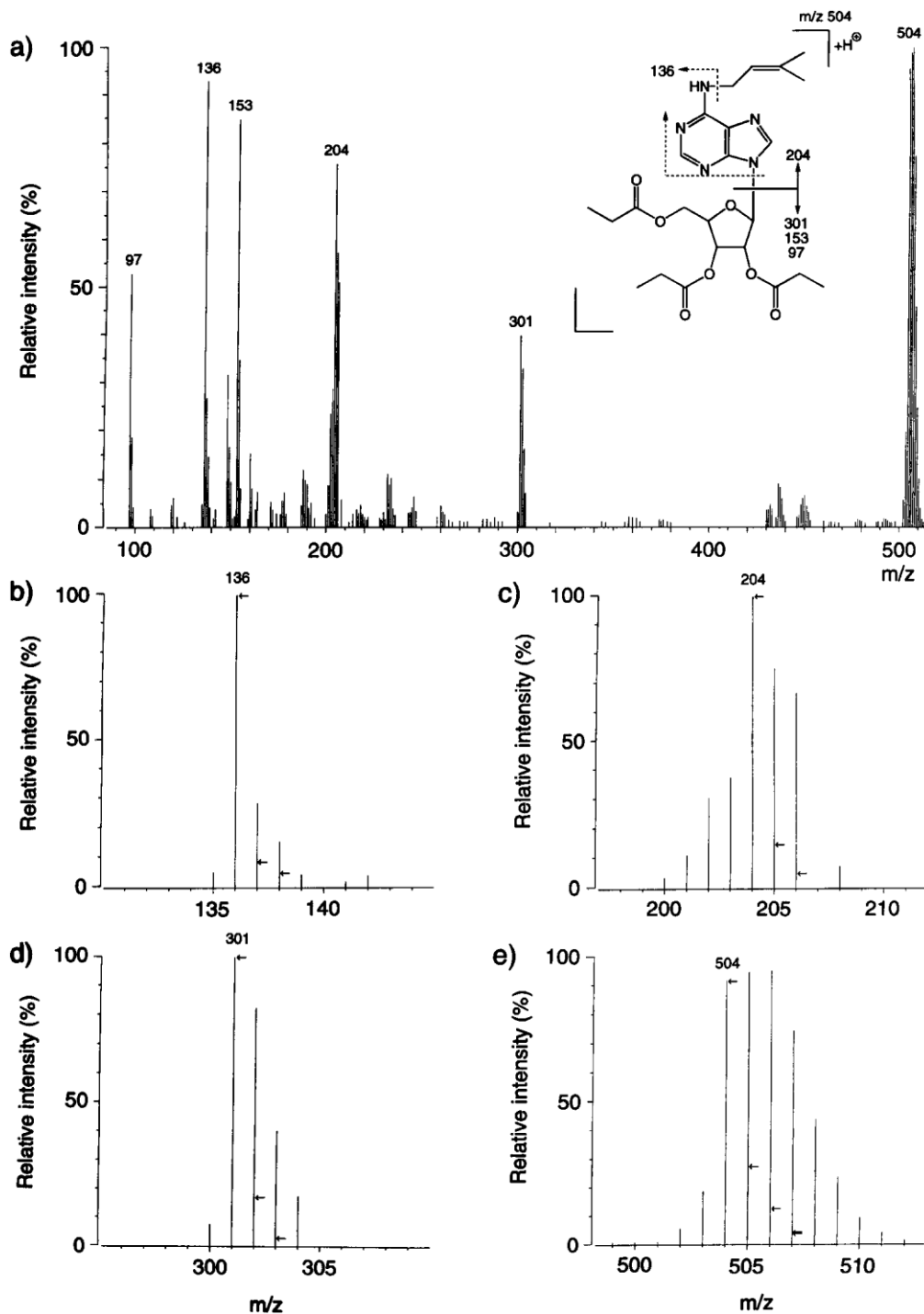
Vedle kapalinové chromatografie se při separaci cytokininů prosazuje i kapilární elektroforéza (CE) (Du et al., 2012). Slouží nejen ke stanovování fyzikálně-chemických konstant cytokininů, ale i ke stanovení jejich koncentrací v relevantním biologickém materiálu (Béres et al., 2012). Obecně platí, že (z důvodu menšího objemu nástřiku a velikosti měřící cely) limity detekce jsou většinou vyšší ve srovnání s HPLC nebo GC. Pro stopovou analýzu je tedy obvykle zapotřebí tuto separační metodu spojit se specifickým detekčním systémem (např. MS) a předřadit zakoncentrování vzorku (Tarkowski et al., 2009). Naproti tomu, CE je výhodná zejména pro analýzu nabitých a polárních látek, jako jsou nukleotidy (Ge et al., 2006). Tuto metodu jsme využili například ke sledování afinity rekombinantních cytokinin oxidáz/dehydrogenáz z *A. thaliana* (AtCKX) k různým cytokininovým nukleotidům (Kowalska et al. 2010). Zjistili jsme, že vakuolární AtCKX izoenzymy přednostně degradovaly tri- a difosfáty, zejména od iP, a to 2-5x efektivněji než odpovídající monofosfáty. Naproti tomu cytozolický enzym AtCKX7 upřednostňoval zeatinové monofosfáty. Následně jsme optimalizovanou metodu použili také ke zkoumání *in vitro* reakce adenosin trifosfátu (ATP) s dimetylallyl pyrofosfátem (DMAPP), katalyzované rekombinantním proteinem AtIPT1 (Béres et al., 2012), nebo ke sledování akumulace intracelulárního *orto*-topolin monofosfátu a současný pokles hladin nukleotidů zapojených do energetického metabolismu buněk vybraných nádorových linií ošetřených příslušným ribosidem (Voller et al., 2010).

3.4. Biosyntéza cytokininů a měření její rychlosti

Biosyntéza isoprenoidních cytokininů v rostlinách je realizována dvěma základními biosyntetickými cestami. Jedna je založena na degradaci t-RNA, druhá využívá isopentenylace volných adeninových nukleotidů. Tato reakce je katalizována isopentenyltransferázami (Sakakibara, 2004).

Při analýzách biosyntetických drah v biologických systémech je s výhodou využíváno značených prekurzorů. Pokud je současně provedena korektní identifikace značených produktů, pak tento postup představuje jeden z nejučinnějších nástrojů pro studium metabolických drah. Problémem při použití tohoto typu experimentu při studiu biosyntézy cytokininů je obvykle pouze velmi nízké procento inkorporace značeného prekursoru (např. adenosin) do molekuly cytokininu. Z důvodu abnormální distribuce exogenních značených prekurzorů rovněž často vznikají artefakty. Proto jsme hledali alternativní metody studia cytokininových biosyntetických drah (Ástot et al., 2000a) a v této souvislosti jsme vyvinuli nový přístup ke studiu rychlosti biosyntézy cytokininů založený na inkubaci rostlin na médiích a v roztocích, obsahujících 30% podíl deuterované vody (D_2O). Ta umožňuje inkorporaci deuteria do obecných metabolických drah, takže následně jsou *de-novo* syntetizované cytokininy značeny z *in-vivo* značených prekurzorů, bez porušení jejich rovnovážného stavu (Ástot et al., 2000a; Nordström et al., 2004a). Takto je dokonce možné přehledně sledovat různou míru inkorporace deuteria do různých částí molekuly cytokininu (purinový skelet, postranní řetězec, konjugovaný cukerný zbytek), pocházejících z různých biosyntetických drah (Ástot et al., 2000a) (Obr. 3). Pro zvýšení hydrofobicity cytokininů byly vzorky před vlastní LC-MS analýzou derivatizovány propionylací (Ástot et al., 1998). Tuto techniku jsme využili i po následném převedení metody z LC/frit-FAB-MS na LC-ESI-MS (Nordström et al., 2004b) z důvodu vyšší citlivosti při propojení za pomoci ESI. Metoda, vedle detailního popisu základní biosyntetické dráhy, nám také umožnila (i) objev a charakterizaci zcela nové, iPMP-nezávislé biosyntetické dráhy cytokininů zeatinového typu (Ástot et al., 2000b), (ii) studium mechanismů regulace biosyntézy cytokininů auxinem a (iii) průkaz schopnosti nadzemní části rostliny

de-novo syntetizovat cytokininy (Nordström et al., 2004a). Záměnou tradičního HPLC za UHPLC bylo následně dosaženo separace cytokininů *cis*- a *trans*-zeatinového typu (Tarkowski et al., 2010a), což umožňuje sledovat a porovnávat rychlost endogenní biosyntézy těchto dvou důležitých izomerů v různých částech rostliny a fyziologických podmínkách.



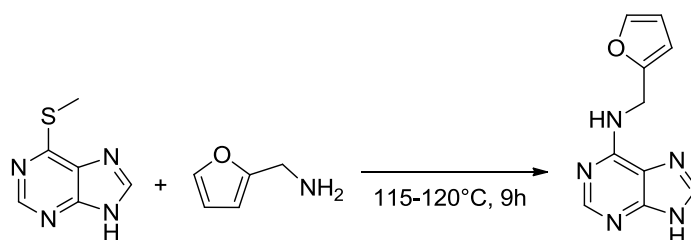
Obr. 3. Inkorporace deuteria *in vivo* do iPMP izolovaného z *A. thaliana* (transgenní linie C24) po 12 hodinách inkubace na mediu obsahujícím D₂O. (a) FAB spektrum propionylovaného iPA, získaného z iPMP enzymatickým štěpením (b)-(e) detailní přiblížení důležitých klastrů (Ástot et al., 2000). Cytokininová frakce byla extrahována (Bieleski, 1964) ze 60g rostlinného materiálu, a pomocí SPE purifikována a rozdělena na tři frakce. Nukleotidová frakce byla ošetřena fosfatázou. Všechny frakce byly následně purifikovány imunoafinitní chromatografií a derivatizovány anhydridem kyseliny propionové a *N*-methylimidazolem v dimethylformamidu, 30 minut při 37°C. Měření bylo prováděno na capLC/frit-FAB-MS.

Metodu *in vivo* značení deuteriem jsme následně optimalizovali pro UHPLC-MS/MS analýzy bez derivatizace (Dobrev et al., 2009) a použili také k porovnání rychlosti biosyntézy cytokininů v kulturách *Chlorella minutissima* během kultivace na světle a ve tmě (Stirk et al., 2011). Nejrychlejší biosyntéza zde byla naměřena u isopentenyladenosinu (iPA), isopentenyladeninu (iP) a *cis*-zeatinu (cZ), a to vyšší na světle než ve tmě. Výsledky potvrdily úzký vztah světla, buněčného dělení a biosyntézy cytokininů (Stirk et al., 2011).

4. Syntéza a vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou cytokininů a jejich derivátů

4.1. Syntéza a cytokininová aktivita N^6 -substituovaných derivátů adeninu

Již velmi krátce po objevu (Miller et al., 1955a) a objasnění chemické struktury (Miller et al., 1955b) prvního cytokininu, kinetinu, si několik skupin vědců (Okomura et al., 1957; Kuraishi, 1959; Skoog et al., 1967) položilo otázku: “Jaké strukturní náležitosti musí vykazovat organická molekula, aby byla cytokininově aktivní?” Analoga kinetinu byla zpočátku připravována, stejně jako samotný kinetin (Miller et al., 1955b), zahříváním 6-methylmercaptapurinu s odpovídajícím aminem (Elion et al., 1952) (obr. 4).

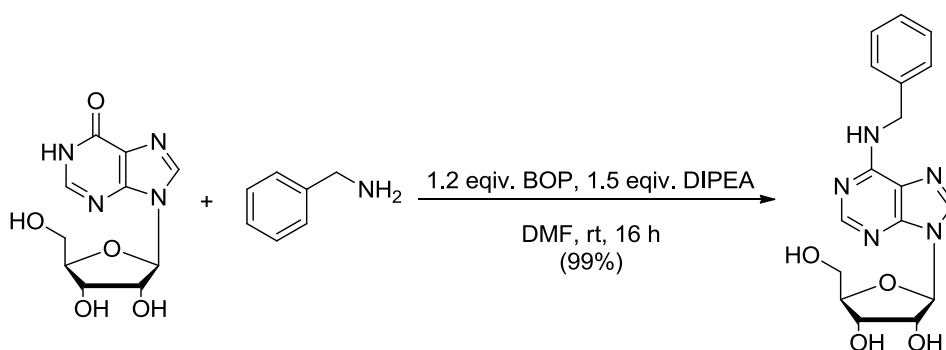


Obr. 4.: Příprava kinetinu z 6-methylmercaptapurinu (podle Millera et al., 1955).

Nevýhodou této metody však byla poměrně vysoká teplota reakce a delší reakční časy. Dnes se N^6 -substituované deriváty adeninu nejčastěji připravují kondenzací 6-chlorpurinu a odpovídajícího aminu v butanolu (Daly & Christensen, 1956).

Skoog et al. (1967) připravili tímto způsobem 69 sloučenin, většinou purinových derivátů a blízké příbuzných látek, a následně testovali schopnost iniciovat růst a regulovat

organogenezi v biotestu založeném na růstu tabákového kalusu. Vybrané strukturní aspekty těchto purinových derivátů byly postupně systematicky modifikovány s cílem zjistit důležitost jednotlivých částí molekuly pro cytokininovou aktivitu. Nejvyšší cytokininovou aktivitu vykazovaly N⁶-monosubstituované deriváty adeninu, u nichž jejich chemická struktura, velikost, tvar, složení, saturace, a náboj substituentu silně ovlivnily aktivitu daných sloučenin. Použitá metoda přípravy N⁶-substituovaných purinových derivátů byla později vylepšena přidáním levnější báze (většinou triethylaminu) (Hecht *et al.*, 1970) (obr. 5).



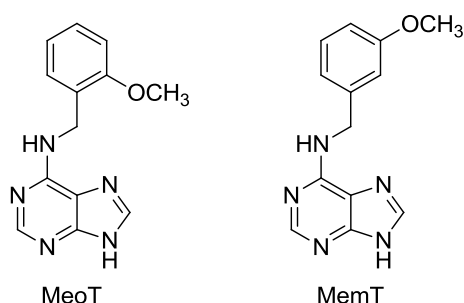
Obr. 5. Příprava 6-benzylaminopurin ribosidu z inosinu (Wan *et al.*, 2005).

Nedávno (Wan *et al.*, 2005) byla publikována alternativní metoda syntézy 6-benzylaminopurin ribosidu (BAPR) z inosinu v jednom kroku, kdy výchozí materiál reaguje s benzylaminem v zásaditých podmínkách téměř kvantitativně, a to za pokojové teploty (obr. 5).

Velmi záhy byl na základě těchto výsledků identifikován potenciál 6-benzylaminopurinu (BAP) jako velmi snadno (a levně) připravitelné a vysoce biologicky aktivní sloučeniny. BAP je dnes pro své efektivní stimulační schopnosti celosvětově používán mikropropagačním průmyslem při komerčním *in vitro* množení mnoha rostlinných druhů. Na druhé straně, je známo že BAP může negativně ovlivnit růst, zakořeňování a aklimatizaci některých rostlinných druhů (Werbrouck *et al.*, 1996). Je také známo, že hydroxylované aromatické cytokininy (topoliny) jsou stabilnější, odolnější vůči degradačním enzymům a v některých mikropropagačních systémech aktivní při nižších koncentracích ve srovnání s klasickými cytokininy (Werbrouck *et al.*, 1996 Strnad, 1997). Topoliny navíc nebrzdí růst kořene, což je typickým vedlejší negativní účinkem při používání vysokých koncentrací BAP (Bairu *et al.*,

2009). Tyto výsledky prokázaly, že vývoj nových cytokininových derivátů má pro rostlinné biotechnologie stále velký praktický význam.

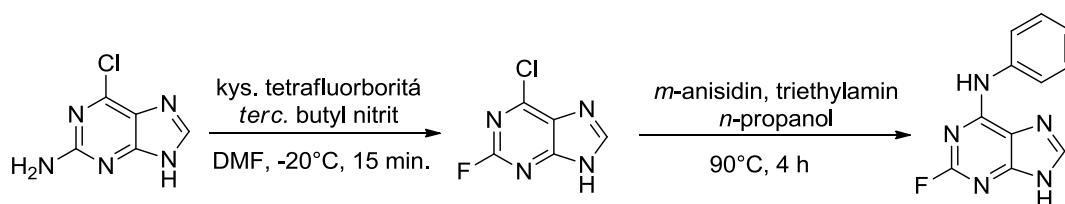
Dalším nepopíratelně důležitým výsledkem našeho dlouholetého výzkumu v oblasti izolace, identifikace a kvantifikace rostlinných hormonů v rostlinách bylo objevení nové skupiny přirozeně se vyskytujících aromatických cytokininů – methoxytopolinů (obr. 6), látek s velmi vysokou cytokininovou, zejména pak anti-senescenční aktivitou (Tarkowská et al., 2003, Doležal et al., 2007). Schopnost těchto látek inhibovat degradaci chlorofylu v odstřižených listech ozimé pšenice (inkubovaných 96 hodin ve tmě) převyšovala aktivitu BAP a zeatinu o téměř 200 % (Tarkowská et al., 2003).



Obr. 6. 6-(2-Methoxybenzylamino)purin (*ortho*-methoxytopolin, MeoT) (vlevo) a 6-(3-methoxybenzylamino)purin (*meta*-methoxytopolin, MemT) (vpravo).

To iniciovalo rozsáhlou studii vztahů mezi chemickou strukturou a cytokininovou aktivitou N⁶-substituovaných derivátů adeninu, spojenou s přípravou několika stovek těchto derivátů (Doležal et al., 2006; Doležal et al., 2007; Zatloukal et al., 2008; Szűcová et al., 2009; Walla et al., 2010; Nisler et al., 2010; Mik et al., 2011 a,b).

Nejprve byly reakcí 6-chlorpurinu a 6-chlorpurin ribosidu s příslušnými benzylaminy připraveny a souborem dostupných fyzikálně chemických metod (elementární analýza, bod tání, tenkovrstevnou chromatografií, HPLC-UV, hmotnostní spektrometrií, ¹H a ¹³C NMR) charakterizovány deriváty adeninu (Doležal et al., 2006; Nisler et al., 2010) a adenosinu (Ado) (Doležal et al., 2007), monosubstituované v poloze N⁶. Obdobnou reakcí (kondenzací 2-substituovaných-6-chlorpurinů s anilíny) byla posléze připravena série 2-X-6-anilinopurinů (X = H, halogen, amino, methylthio nebo nitro) s různými substituenty na fenylovém kruhu (Zatloukal et al., 2008) (obr. 7).



Obr. 7. Příprava 2-fluoro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurinu (INCYDE-F, Zatloukal et al., 2008)

Z důvodu strukturní podobnosti připravených látek k již známým aromatickým cytokininům, BAP a topolinům (Strnad, 1997), byla vždy nejprve testována jejich biologická aktivita v několika klasických cytokininových biotestech (Holub et al., 1998), byl studován vliv jednotlivých substituentů na aktivaci cytokininových receptorů (AHK3, CRE1/AHK4) (Spíchal et al., 2004) a posléze také jejich interakce s klíčovým enzymem degradace cytokininů, cytokinin oxidázou/dehydrogenázou (v našem případě AtCKX2). I když biologickou aktivitu N⁶-substiovaných derivátů adeninu na rostlinných buňkách studujeme více než 20 let, i pro nás bylo překvapivým zjištěním, jak malé strukturní změny v této molekule mohou způsobit radikální změnu biologické aktivity získané sloučeniny. Prvním příkladem může být 6-(3-methylbenzylamino)purin (Doležal et al., 2006), u kterého se (stejně jako u *meta*-topolinu) zavedením jedné hydroxy skupiny do polohy 2 na benzenovém jádře kompletně ztrácí jeho původně velmi vysoká cytokininová aktivita a z receptorového agonisty se stává cytokininovým antagonistou, primárně blokujícím CRE1/AHK4 receptor a další přenos cytokininového signálu *in planta* (Spíchal et al., 2009a, b; Nisler et al., 2010). Takto jsme objevili, a následně nám byl udělen patent na první reálný anticytokinin, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin, inhibující růst kalusu tabáku i v přítomnosti adekvátní koncentrace cytokininu (Spíchal et al., 2009a, b). Stejná látka naopak již při 10 nanomolární koncentraci výrazně snižuje negativní vliv exogenní aplikace 6-benzylaminopurinu na růst a větvení primárního kořene *A. thaliana* (Spíchal et al., 2009a). Naproti tomu pyrrolo[2,3-d]pyrimidinové a pyrazolo[4,3-d]pyrimidinové deriváty, látky dlouhou dobu za anticytokininy považované (Ivamura, 1994), s cytokininy na receptorové úrovni nekompetují. Inhibice cytokininy-indukovaných růstových procesů rostlinných buněk je v tomto případě způsobena jiným mechanismem, a to inhibicí cyklin-dependentních kináz (CDKs) (Spíchal et al., 2007).

Dalšími podobnými příklady jsou 2-chloro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurin (Inhibitor Cytokininové Degradace, INCYDE) a 2-fluoro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurin (INCYDE-F)

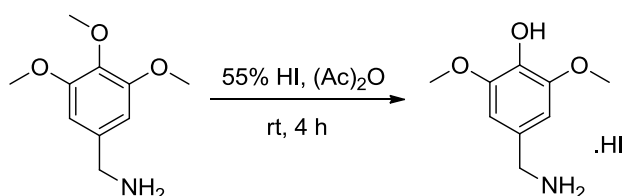
(Zatloukal et al., 2008), kde zkrácením N⁶-postranního řetězce o jednu CH₂ skupinu došlo nejen k téměř kompletní ztrátě jejich anti-senescenční aktivity (při zachování biologické aktivity v ostatních použitých cytokininových biotestech), ale navíc tyto látky získaly schopnost velmi silně inhibovat cytokinin oxidázy/dehydrogenázy z *A. thaliana* (AtCKX2). Byla tak objevena zcela nová skupina potentních inhibitorů tohoto klíčového enzymu endogenní degradace cytokininů (Zatloukal et al., 2008). Následně se nám u látky INCYDE podařilo prokázat její schopnost inhibovat cytokinin dehydrogenázu nejen *in vitro*, ale také *in vivo* a prokázat její schopnost obnovit přirozený fenotyp u CKX nadprodukcujících rostlin (Spíchal et al., 2012) (obr. 8). Také na tyto látky jsme získali mezinárodní patentovou ochranu (Spíchal et al., 2012). Zajímavě se rovněž jeví použití inhibitoru INCYDE v rostlinných tkáňových kulturách, kde zvyšuje hladiny aktivních cytokininů v explantátech, zejména v jejich nadzemní části (Aremu et al., 2012c).

Hydroxybenzylaminy nezbytné pro syntézu cytokininů, které nejsou komerčně dostupné, se dají s výhodou připravit demethylací příslušných methoxybenzylaminů kyselinou bromovodíkovou nebo jodovodíkovou v přítomnosti acetanhydridu (obr. 9) (Doležal et al.,



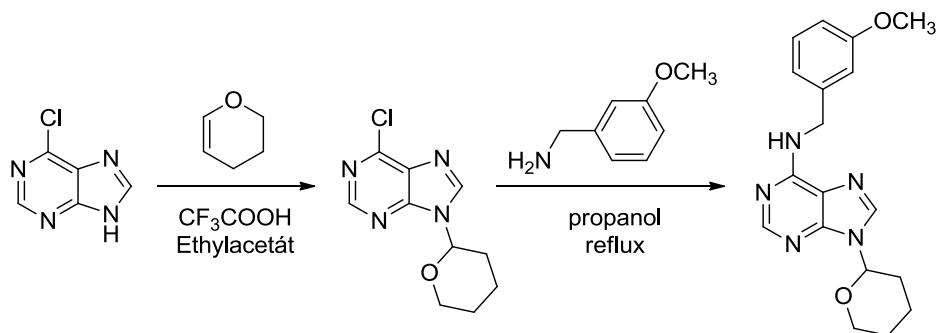
Obr. 8: Obnovení přirozeného fenotypu po systematické aplikaci látky INCYDE na CKX nadprodukcující rostliny. + znamená ošetřeno, - neošetřeno.

2006; Doležal et al., 2007). Byla tak nahrazena starší, dvoustupňová syntéza, při které se příslušný benzaldehyd nejprve převede na odpovídající oxim, a ten se následně redukuje sodíkovou amalgámou (Raiford & Clark, 1923; Nisler et al, 2010). Navíc je možné methoxybenzylaminy demethylovat pouze parciálně (obr. 9) (Doležal et al., 2006; Doležal et al., 2007).



Obr. 9. Příprava 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylaminu hydrojodidu

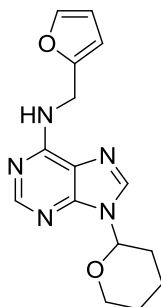
Mezi další novou generaci cytokininových derivátů zajisté patří 9-tetrahydropyranolové a 9-tetrahydrofuranolové deriváty. Ty jsme připravili kondenzací 6-chloropurinu s 3,4-dihydro-2*H*-pyranem a 2,3-dihydrofuranem a reakcí vzniklých intermediátů s odpovídajícími aminy. Takto byla připravena a charakterizována skupina 34 N^6 -substituovaných derivátů 9-(tetrahydrofuran-2-yl)purinu a 9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu (Szűčová et al., 2009; Walla et al., 2010, Mik et al., 2011b) (obr. 10).



Obr. 10. Schéma přípravy 6-(3-methoxybenzylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu

Později byly podobně ve dvou krocích syntetizovány N^9 -alkylderiváty kinetinu a iP (Mik et al., 2011a,b). Podařilo se nám prokázat, že tyto nové 6,9-disubstituované deriváty purinu nevykazují při exogenní aplikaci inhibiční efekt na primární ani laterální kořen, typický

pro 6-benzylaminopurin (Podlešáková et al., 2012b; Aremu et al., 2012b). Také jsme se pokusili ověřit jejich předpokládanou antisenescenční aktivitu, a to nejen na rostlinných, ale i na lidských buňkách. Nedávno bylo totiž zjištěno, že některé dlouho známé přirozeně se vyskytující cytokininy, např. kinetin a zeatin, mají schopnost oddálit senescenci lidských kožních fibroblastů (Rattan & Clark, 1994; Rattan & Sodagam, 2005).



Obr. 11. 6-(Furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin

Mezi s věkem buněk související změny, ovlivňované kinetinem, patří morfologické změny, rychlost růstu, velikost buněk, organizace cytoskeletu, syntéza biomakromolekul, a intenzita autofluorescence v důsledku oxidativního poškození. Přesný mechanismus působení kinetinu na živočišnou buňku není zcela objasněn, ale je silným přírodním antioxidantem, chránícím DNA a proteiny před oxidativním poškozením (Rattan & Clark, 1994). Nedávno se nám podařilo prokázat, že účinnost kinetinu proti stárnutí kožních buněk je možno zvýšit navázáním vhodného substituentu do polohy N9 (Szűčová et al., 2008) (Obr. 11). Následně začaly být tyto námi připravené N9-substitované deriváty kinetinu používány jako aktivní složka klinicky testovaných kosmetických přípravků (McCullough et al., 2008; Ortiz et al., 2009; Tremaine et al., 2010). Klinické studie provedené na Kalifornské Univerzitě, Department of Dermatology (McCullough et al., 2008) na vzorku 40 zdravých žen se známkami lehkého až středního poškození pleti ze slunečního záření prokázaly, že 6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin (Pyratine) aplikovaný v masťovém základu v 0,10% koncentraci výrazně redukuje jemné i hluboké vrásky, redukuje hrubost a vysychání pokožky a minimalizuje hyperpigmentaci. V dalších klinických studiích provedených na stejném pracovišti bylo zjištěno, že Pyratine v koncentraci 0,125% (Ortiz et al., 2009; Tremaine et al., 2010) snižuje zarudnutí pleti a působí proti rosacee (růži) a akné.

K celkovému klinickému zlepšení v obou studiích (Ortiz et al., 2009; Tremaine et al., 2010) došlo u 80% pacientů. Při dlouhodobém působení (48 týdnů) bylo pozorováno snížení počtu zánětlivých ložisek až o 89%. Od roku 2009 je tato námi vyvinutá účinná látka patentovanou součástí kosmetických přípravků (Szüčová et al., 2011) řady Pyratine[®], v licenci vyráběných firmou Pyratine PLC (Napa, USA) (obr. 12).

stop red from blooming.

Ideal for Sensitive Skin
(e.g., inflammatory skin conditions such as rosacea and acne)

Physician-strength PyratineXR™ is clinically proven to relieve redness, soothe irritation, increase moisture and repair damaged skin quickly and effectively. Now you can face the world without that red feeling.

Clinical Success:
67% Less Redness
84% Smoother Skin
41% More Moisture

Available Only Through Select Physicians.
Call 888.467.9728 or visit www.pyratinexr.com.

PyratineXR
BEAT RED

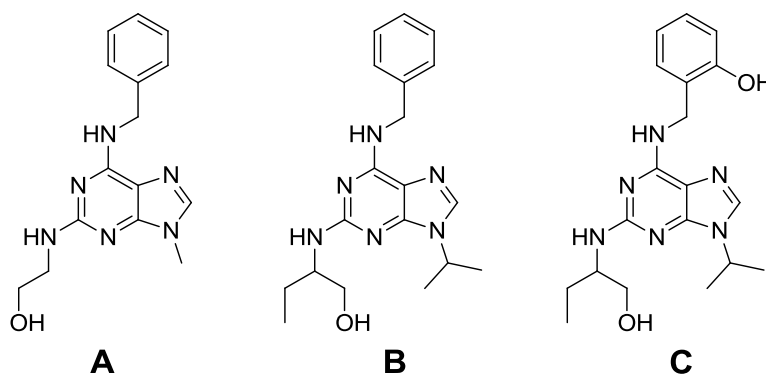
Obr. 12. Pyratine-XR, účinná látka 6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin (0.125%)

4.2. Protinádorová aktivita cytokininů a jejich derivátů

Na počátku devadesátých let byly publikovány první studie ukazující, že i velmi malá změna ve struktuře N⁶-substituovaného adeninu může dramaticky změnit jeho biologickou aktivitu také v živočišných a/nebo lidských buňkách (Veselý et al., 1994). Některé přirozené cytokininy (např. isopentenyladenin) jsou slabými a nespecifickými inhibitory některých cyklin-dependentních kináz, klíčových enzymů regulace buněčného cyklu (Rialet & Meijer, 1991). Překvapivě, C2,N9-disubstituované deriváty BAP (obr. 13) byly identifikovány jako

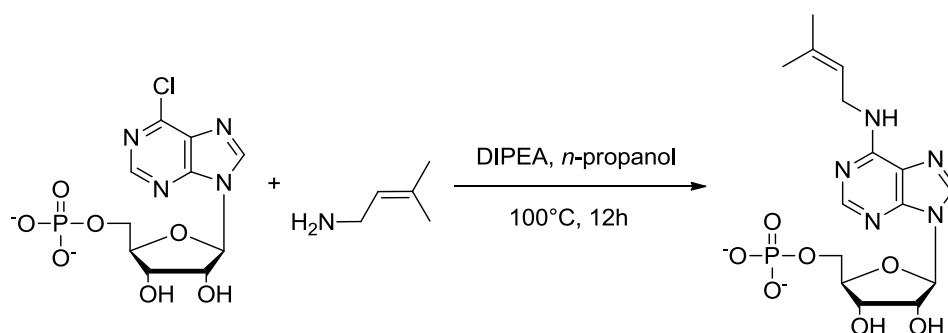
specifické a v mikromolárních koncentracích účinné inhibitory cyklin-dependentních kináz, zejména CDK1, klíčového enzymu buněčného cyklu všech eukaryontních buněk (Veselý et al., 1994; Havlíček et al., 1997). Látky se vyznačují schopností blokovat buněčný cyklus ve specifických bodech (G1/S, G2/M). Tato specifická spěje k vývoji nové skupiny protinádorových látek. Sloučenina z této skupiny, [(2*R*)-2-(6-benzylamino-9-isopropyl-9*H*-purin-2-ylamino)-butan-1-ol)], R-roscovitine (Seliciclib nebo CYC202) (obr. 13B), je v klinickém zkoušení (fáze IIb, monoterapie malobuněčného karcinomu plic, kombinatorní terapie s gencitabinem na další typy nádorů) (www.cyclacel.com).

Významně cytotoxické pro řadu lidských nádorových buněčných linií jsou však také i některé v rostlinách přirozeně se vyskytující cytokininové ribosidy (Mlejnek, 2001; Ishii et al., 2002; Voller et al., 2010), i když působí odlišným mechanismem, který není doposud zcela objasněn. Na leukemických buňkách linie HL-60 bylo pozorováno, že buněčné smrti v tomto případě předchází vyčerpání buněčných zásob ATP, aktivace kaspáz a depolarizace mitochondrií (Mlejnek, 2001; Ishii et al., 2002). Je také známo, že nutnou podmínkou jejich anti-leukemické aktivity je jejich vnitrobuněčná fosforylace (Mlejnek and Doležel, 2005; Voller et al., 2010).



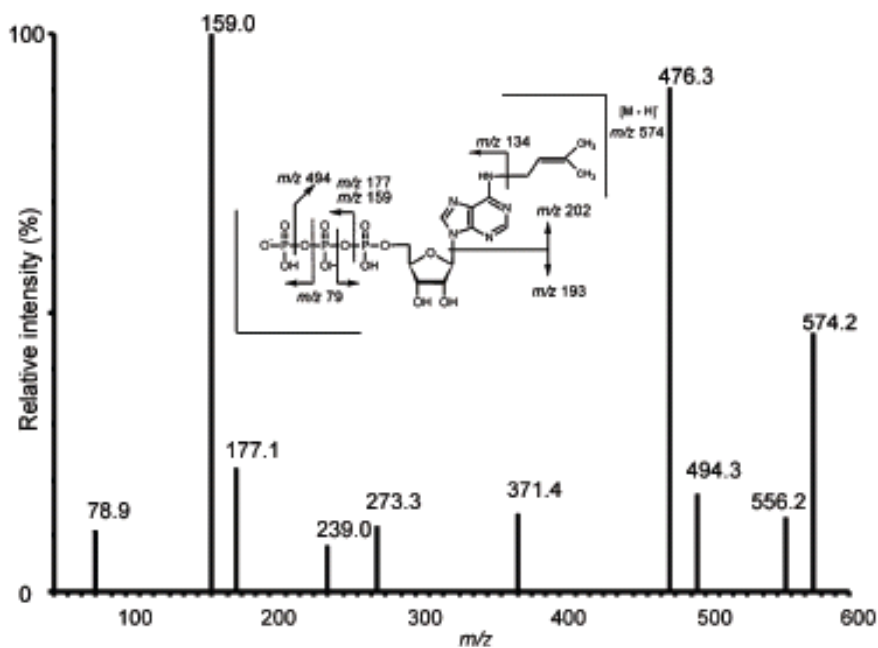
Obr. 13. Deriváty 6-benzylaminopurinu a *ortho*-topolinu s protinádorovou a CDK inhibiční aktivitou. A- (6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-methylpurin, olomoucine B - [(2*R*)-2-(6-benzylamino-9-isopropyl-9*H*-purin-2-ylamino)-butan-1-ol)], R-roscovitine, C - {2-[[2-((1*R*)-1-hydroxymethyl-propylamino)-9-isopropyl-9*H*purin-6-ylamino]-methyl]-phenol}, olomoucine II.

V koncentracích $> 46 \mu\text{mol/L}$ (IC_{50}) jsou některé deriváty 6-benzylaminopurinu cytotoxické na vybraných nádorových liniích i ve formě volných bází (Doležal et al., 2006; Voller et al., 2010), s doposud neznámým mechanismem účinku. Bylo však postulováno, že jejich nízká toxicita je způsobena omezenou schopností fosforibosyltransferáz ve studovaných leukemických buňkách tyto látky transformovat (Mlejnek and Doležel, 2005). Naproti tomu, cytotoxicita volných bází a jim odpovídajících ribosidů pro rostlinné buňky je srovnatelná, což je pravděpodobně zapříčiněno schopností rostlinných buněk přeměňovat obě skupiny (formy) cytokininů na příslušné ribosidy-5'-monofosfáty přibližně stejně efektivně (Mlejnek et al., 2005). Prokázali jsme, že ostatní běžné metabolické formy přirozeně se vyskytujících cytokininů, *N*- a *O*-glukosidy, jsou pro leukemické buňky netoxické, což podporuje hypotézu o vnitrobuněčné fosforylaci (Voller et al., 2010).



Obr. 14. Příprava N^6 -isopentenyldenozin-5'-monofosfátu (iPMP) (Béres et al., 2012).

Námi publikovaná následná příprava mono-, di- a trifosfátů, odvozených od iP a zeatinu, připravených reakcí příslušného 6-chlorpurin-9- β -D-ribosidu-5'-fosfátu s odpovídajícím aminem (Béř et al., 2010) (obr. 14), byla proto nejen důležitým krokem umožňujícím charakterizaci substrátové specifity cytokinin-dehydrogenáz, důležitých degradačních enzymů pro tuto skupinu rostlinných hormonů (Kowalska et al., 2010), ale také pro vývoj nových identifikačních a kvantifikačních metod pro tyto látky v biologických matricích (Béř et al., 2010; Béř et al., 2012). Tyto metody byly poté využity nejen pro následné studium cytotoxické role cytokininových ribosidů v nádorových buňkách (Béř et al., 2010; Voller et al. 2010) (obr. 15), ale také při studiu biosyntézy endogenních cytokininů a analýzách substrátové specifity rekombinantní isopentenylyltransferázy 1 (AtIPT1) z *Arabidopsis thaliana* (Béř et al., 2012).



Obr. 15. MS/MS spektra a fragmentace N^6 -isopentenyladenosin-5'-trifosfátu (iPTP), buněčného metabolitu N^6 -isopentenyladenosinu (Béřeš et al., 2010)

Další možností jak významně zvýšit protinádorovou aktivitu cytokininů a jejich derivátů je jejich koordinace s přechodnými kovy, a to nejen s platinou (Maloň et al., 2001a), ale překvapivě také s kobaltem (Klanicová et al., 2006), mědí nebo železem (Maloň et al., 2001b; Maloň et al., 2002). Na čtyřech vybraných nádorových liniích (B16-F0, G361, HOS, MCF7, K-562) vykazovaly dvojjaderné měďnaté komplexy s netoxickými deriváty 6-benzylaminopurinu (BAP) (Trávníček et al., 2001; Maloň et al., 2001b), připravené reakcí příslušného cytokininu s chloridem měďnatým v prostředí 2M kyseliny chlorovodíkové, IC_{50} v koncentračním rozsahu 8,2 - 39 μM . Podařilo se nám také prokázat, že jedním z důležitých mechanismů, zodpovědných za cytotoxicitu těchto látek, je jejich inhibiční aktivita vůči $p34^{cdc2}$ kináze, která se pohybovala v rozsahu IC_{50} 10-15 μM (Trávníček et al., 2001). V případě komplexů železa s boheminem [2-(3-hydroxypropylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin] (Maloň et al., 2001b), připravených jeho reakcí s chloridem železitým, opět v silně kyselém prostředí 2M kyseliny chlorovodíkové, došlo komplexací ke zvýšení cytotoxické aktivity, avšak $p34^{cdc2}$ inhibiční aktivita zůstala nezměněna. To naznačuje, že na zvýšení cytotoxicity vznikajících komplexů s cytokininovými deriváty se podílí také jiné molekulární mechanismy. Nicméně, nejvýznamnější protinádorovou aktivitu jsme zjistili u komplexů cytokininových derivátů s platinou a paládiem (Trávníček et al., 2003).

Jednojaderné platnaté komplexy olomoucínu a boheminu, vznikající při jejich reakci s chloridem platnatým v silně kyselém prostředí resp. absolutním etanolu, vykazovaly pro buněčnou linii K-562 (lidská chronická myeloidní leukémie) cytotoxicitu na úrovni IC_{50} 2,1 resp. 2,8 μ M. Myslíme si, že tyto sloučeniny mají potenciál stát se novou třídou biologicky aktivních látek, využitelných v protinádorové terapii (Trávníček et al., 2003).

5. Aplikační možnosti vybraných derivátů aromatických cytokininů v rostlinných tkáňových kulturách

Výběr vhodného cytokininu se řadí mezi nejkritičtější faktory při zavedení/optimalizaci fungujícího mikropropagačního protokolu (Aremu et al., 2012a). Již v předchozí kapitole bylo zmíněno, že i když BAP je v rostlinných tkáňových kulturách prakticky široce využívaným cytokininem, u některých rostlinných druhů se můžeme setkat s jeho negativními vedlejšími účinky, a je proto nutné se v těchto případech zamýšlet nad alternativním složením kultivačních médií. Již provedené studie na řadě rostlinných druhů upozornili na potenciál topolinů, jako náhrady za běžně používané cytokininy (Aremu et al., 2012a). V tomto směru jsme provedli řadu experimentů na široké skupině vybraných rostlinných druhů (převážně léčivých a většinou také kriticky ohrožených) ve spolupráci se skupinou prof. J. van Stadena, Univ. Pietermaritzburg, Jižní Afrika. *meta*-Topolin (mT) při různých koncentracích produkoval při mikropropagaci *Aloe polyphylla* více výhonů ve srovnání se zeatinem nebo BAP (Bairu et al., 2007). Také u banánovníku (Bairu et al., 2008), pistácie (*Pistacia vera* L., Benmahioul et al., 2012), *Pelargonium sidoides* (Moyo et al., 2012), *Romulea sabulosa* (Swart et al., 2012) nebo *Cotinus coggygria* (Podwyszyńska et al., 2012) (obr. 16) vedlo užití topolinů při multiplikaci *in-vitro* k získání většího počtu kvalitních rostlin. Na druhé straně, u jiných rostlinných druhů měla aplikace topolinů za následek zpomalení multiplikace ve srovnání s BAP (Rosales et al., 2008; Malá et al., 2009; Aremu et al., 2012a). Z toho je možné odvodit, že neexistuje jednoznačné schéma odezvy rostlinných druhů na různé cytokininy; faktory jako výběr genotypu, koncentrace použitého cytokininu nebo typ (složení) kultivačního média hrají rovněž významnou roli (Dobránszki et al., 2004; Wojtania, 2010; Aremu et al., 2012a). Nicméně topoliny patří ke stále vyhledávanějším alternativám k BAP v případě problematických kultur.



Obr. 16. Množení *Cotinus coggygia* *in vitro* na médiu obsahujícím BAP (nahore), MemT (uprostřed), a MemTR (dole) při koncentraci (zleva) 0.5, 1 2 mg L⁻¹ (po třetí pasáži) (Podwyszyńska et al., 2012).

Mezi hlavní problémy rostlinných tkáňových kultur často patří nedostatečné zakořenění explantátů (stimulované zejména auxiny) a s tím související jejich špatná aklimatizace *ex-vitro* (Werbrouck et al. 1996). Toto bývá některými autory považováno za obecný jev spojený s aplikací exogenních cytokininů. Na druhé straně, opakovaně bylo publikováno, že typ a koncentrace použitého exogenního cytokininu má na schopnost aklimatizace explantátů výrazný vliv (Moncalean et al., 2001; Bairu et al., 2008; Valero-Aracama et al. 2010). Bylo také zjištěno, že za tento škodlivý účinek jsou přinejmenším částečně zodpovědné toxické metabolity BAP (zejména 9-glukosidy), které navíc mají tendenci shromažďovat se u báze explantátů, a negativně ovlivňovat jejich následné zakořeňování

a schopnost aklimatizace (Werbrouck et al. 1996; Bairu et al., 2011a). Následně bylo postulováno (Werbrouck et al. 1996) a později dokázáno (Bairu et al., 2011a; Malá et al., 2009), že přítomnost hydroxylové skupiny ve struktuře topolinů znamená strukturní výhodu v podobě možnosti vzniku *O*-glukosidů jako reverzibilních zásobních forem CK. Právě tyto rozdíly v metabolismu použitého exogenního cytokininu pak bývají spojovány se statisticky významným zlepšením *in-vitro* zakořeňování a následné aklimatizace některých rostlinných druhů (*Spathiphyllum floribundum*, *Solanum tuberosum*, *Aloe polyphylla*, *Sorbus torminalis*, *Uniola paniculata*) při použití optimální koncentrace topolinu (Werbrouck et al. 1996; Moncalean et al., 2001; Malá et al., 2009; Valero-Aracama et al. 2010; Bairu et al., 2011). Pozitivní efekt topolinů na zakořeňování explantátů však nelze v žádném případě považovat za univerzální (Bairu et al., 2008; Valero-Aracama et al. 2010). Navíc jsme zjistili, že hladiny vznikajících *O*-glukosidů mohou být negativně ovlivněny exogenním auxinem (Bairu et al., 2011a).

Dalším častým problémem, snižujícím potenciál mnoha *in vitro* mikropropagačních technik, je převodnění rostlinných pletiv (hyperhydratace, vitrifikace). Výsledkem je špatný vývoj explantátu, zejména cévních svazků, a nefunkční průduchy. K odstranění vitrifikace je obecně doporučováno častější pasážování explantátů, chlazení dna kultivačních nádob (obojí je spojeno se značným zvýšením nákladů) nebo snížení koncentrace exogenního cytokininu, což ale často vede ke snížení efektivity množení. Vzhledem k tomu, že do té doby užívaný protokol pro *in-vitro* množení *Aloe polyphylla*, kriticky ohroženého endemitu Maluti Mountains (Lesotho), nevyhovoval z důvodu (i) vysoké ceny použitého cytokininu *trans*-zeatinu (*tZ*), (ii) nutnosti následného pasážování na zakořeňovací médium a (iii) výskytu hyperhydratace, bylo v tomto systému testováno několik derivátů *meta*-topolinu (Bairu et al., 2007). Těmi se podařilo převodnění zcela potlačit a více než 91% rostlin převedených

do *ex vitro* podmínek bylo úspěšně aklimatizováno. Takto se nám podařilo potvrdit dřívější výsledky na jiných rostlinných druzích (*Beta vulgaris* - Kubaláková and Strnad, 1992; *Malus x domestica* cultivars - Dobránszki et al. 2002; Dobránszki et al. 2004).

Využití mikropropagace u některých rostlinných druhů, např. pelargonií, brzdí často také ranná senescence (Mithila et al., 2001). K jejímu zpomalení byl u sedmi různých kultivarů úspěšně použit *meta*-topolin (Wojtania, 2010). Podobný účinek měla aplikace topolinů,

zejména MemTR, i v *in vitro* kulturách *Rosa hybrida*, které také trpí rannou senescencí v případě použití BAP (Bogaert et al., 2006).

Jedním z důležitých faktorů úspěšnosti komerční mikropropagace rostlin je genetická stabilita explantátů, a to ze dvou odlišných hledisek: zachování již existující variability (chiméry) a kontrola vzniku somaklonální variability v průběhu mikropropagace (Bairu et al., 2011b). Vznik somaklonální variability v průběhu procesu mikropropagace je většiny rostlinných druhů nežádoucí, ale existují výjimky, např. některé druhy okrasných pokojových rostlin (Aremu et al., 2012a). Až donedávna byl kinetin jediným cytokininem, za pomoci kterého bylo možno dosáhnout pomalé a bezpečné multiplikace a regenerace těchto cenných pokojových rostlin (Bogaert et al. 2006). Nicméně kinetin vykazuje poměrně nízkou morfogenní aktivitu a s tím je spojena i jeho omezená schopnost iniciovat multiplikaci rostlinných explantátů. Proto jsme se v nedávné době pokusili o vyhodnocení vlivu nových topolinových derivátů na genetickou stabilitu explantátů v průběhu mikropropagace. Ve srovnání s BAP byla genetická stabilita u petunií udržena při použití MemTR, a navíc bylo dosaženo lepší vizuální kvality výhonů (Bogaert et al., 2006). Naproti tomu, u jiných druhů rostlin (banánovník – Bairu et al., 2008; *Barleria greenii* - Amoo et al., 2011) se tento signifikantní rozdíl výskytu *in vitro* indukované somaklonální variability nepodařilo potvrdit. Dle samotných autorů to ale může být způsobeno použitím explantátů původně množených na 6-benzylaminopurinu a tedy přenosem jeho metabolitů (Amoo et al., 2011; Bairu et al., 2008).

Bylo opakovaně ověřeno, že topolinové deriváty mohou úspěšně nahradit běžně používané cytokininy v mnoha mikropropagačních protokolech. Na druhou stranu je třeba zmínit, že existují také rostlinné druhy, které lépe reagují na jiné cytokininy než na topoliny. Topoliny nelze v žádném případě považovat za všelék pro rostlinné tkáňové kultury a vždy musí projít rutinním procesem optimalizace (Aremu et al., 2012a).

6. Závěr

Studiem cytokininů (N^6 -substituovaných derivátů adeninu) byly získány cenné informace pro vývoj dalších látek s významnými biologickými aktivitami, pro studium jejich výskytu v rostlinách, pro izolaci a identifikaci jejich nových metabolitů, pro jejich kvantifikaci a imunodetekci, ale i pro vývoj kosmetických přípravků a potenciálních léčiv některých závažných lidských onemocnění. Získané výsledky je možné shrnout do následujících bodů:

- 1) Byly vyvinuty vysoce citlivé a specifické metody izolace, identifikace a kvantifikace cytokininů (a okrajově také dalších skupin rostlinných hormonů – IAA a ethylénu), založené na SPE, imunoafinitní chromatografii a kombinaci kapalinové chromatografie (vysokoúčinné, v posledních letech ultra-vysokoúčinné) s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS resp. UHPLC-MS/MS). Jako alternativní bylo testováno spojení kapilární elektroforézy s UV-VIS nebo hmotnostní detekcí, které se ukázalo být výhodné pro některé aplikace.
- 2) Metodami organické syntézy se nám podařilo připravit velkou skupinu nových cytokininových derivátů. Připravené deriváty adeninu, substituované v různých polohách, byly charakterizovány souborem fyzikálně – chemických metod (elementární analýza, bod tání, TLC, HPLC, MS, NMR). Jejich biologická aktivita byla pak následně testována pomocí několika biotestů, na úrovni receptorů, enzymů cytokininové biosyntézy a metabolismu, a rovněž ve vybraných *in vitro* kulturách. Některé z těchto látek vykazují velmi silnou cytokininovou aktivitu a již dnes nacházejí uplatnění v rostlinných biotechnologiích (zejména při mikropropagaci okrasných rostlin), dále v kosmetickém průmyslu (inhibice senescence lidských fibroblastů) a medicíně (jsou cytotoxické pro řadu lidských nádorových buněčných linií). Navíc, u jiných látek z této skupiny byla detekována jejich schopnost velmi účinně inhibovat klíčový enzym cytokininového metabolismu, cytokinin dehydrogenázu, což představuje zcela nový mechanismus účinku cytokininových derivátů na rostlinnou buňku, s rozsáhlým aplikačním potenciálem. Poslední zajímavou skupinou látek připravenou nedávno byli antagonisté cytokininových receptorů.

Z příkladů uvedených v této práci je zřejmé, že nyní máme k dispozici celou skupinu nových unikátních syntetických i analytických nástrojů s vysokým potenciálem umožňujícím přinášet zásadní poznatky o molekulárním účinku rostlinných hormonů s mnohostrannými aplikačními možnostmi.

7. Perspektivy výzkumu N⁶-substituovaných derivátů adeninu

Naším cílem je objasnit úlohu N⁶-substituovaných derivátů adeninu v rostlinných i živočišných buňkách a potenciálně využít těchto znalostí, nejen ke zvýšení produktivity zemědělských plodin a rostlinných biotechnologií, ale i k vývoji nových generací terapeuticky využitelných látek. Přiložený výčet zdaleka nevyčerpává celkový přehled aktivit v oblasti cytokininů, kterými bychom se chtěli v blízké budoucnosti zabývat. Snad je pouze nástinem toho nejzajímavějšího, co bychom chtěli v nejbližší době studovat.

- 1) Mnoho mechanismů řídících růst a vývoj rostlin je alokováno ve specifických pletivech, v některých případech až na buněčné úrovni. Analytické technologie pro výzkum distribuce a biosyntézy fytohormonů by v budoucnu měly být i v tomto kontextu vyvíjeny s velmi vysokým rozlišením, postupně na orgánové až buněčné úrovni (Petersson et al., 2009).
- 2) Na základě současných poznatků se předpokládá, že signální dráhy jednotlivých fytohormonů nejsou nezávislé, ale že tvoří složitou síť vzájemně se regulujících drah (Podlešáková et al., 2012a). Pro důkladnější pochopení těchto interakcí je ale zapotřebí kvantifikačních metod umožňujících kvantitativní analýzu různých rostlinných hormonů současně. Kromě paralelního stanovení fytohormonů po jednotlivých skupinách (tzv. phytohormone targeting) je možné použít i alternativní přístup, umožňující simultánní stanovení vybraných zástupců všech skupin fytohormonů (tzv. hormonomický přístup; phytohormone profiling). Ten se doposud vyznačuje často vyššími limity detekce a omezeným počtem stanovovaných derivátů v rámci dané skupiny hormonů (Podlešáková et al., 2012a). Kombinace těchto dvou přístupů a dosažení maximálního počtu derivátů kvantifikovatelných v miligramových množstvích vzorků pro nás představuje v analýze endogenních rostlinných hormonů další důležitý směr výzkumu.
- 3) Příprava nových, vysoce účinných cytokininových derivátů jak pro aplikace v rostlinných biotechnologiích a zemědělství, ale také v medicíně a léčebné kosmetice, fluorescenčně značených derivátů fytohormonů za účelem zkoumání detailů jejich interakce s receptory, jakožto i příprava afinitních matic obsahujících tyto látky, které lze následně s výhodou využít ke studiu mechanismů jejich účinku, je pro nás stále velkou výzvou.

8. Literatura

- Amoo, S.O., Finnie, J.F., Van Staden, J.: *Plant Growth Regul.* **63**: 197, 2011.
- Aremu, A.O., Bairu, M. W., Doležal, K., Finnie, J.F., Van Staden, J.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **108**:1, 2012a.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Szüčová, L., Doležal, K., Finnie, J.F., Van Staden, J.: *Acta Physiol. Plant.* **34**: 2265, 2012b.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Novák, O., Plačková, L., Zatloukal, M., Doležal, K., Finnie, J.F., Strnad, M., Van Staden, J.: *Planta* **236**: 1775, 2012c.
- Badenoch-Jones, J., Letham, D.S., Parker, C.W., Rolfe, B.G.: *Plant Physiol.* **75**:1117, 1984.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **90**:15, 2007.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **95**:373, 2008.
- Bairu, M.W., Jain, N., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J.: *S. Afr. J. Bot.* **75**:122, 2009.
- Bairu, M.W., Novak, O., Doležal, K., Van Staden, J.: *Plant Growth Regul.* **63**:105, 2011a.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O., Van Staden, J.: *Plant Growth Regul.* **63**:147, 2011b.
- Benmahioul, B., Orion, N., Kaid-Harche, M., Daguin, F.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **108**: 353, 2012.
- Béres, T., Zatloukal, M., Voller, J., Niemann, P., Gansche, M.C., Tarkowski, P., Novák, O., Hanuš, J., Strnad, P., Doležal, K.: *Anal. Bioanal. Chem* **398**: 2071, 2010.
- Béres, T., Gemrotová, M., Tarkowski, P., Ganzera, M., Maier, V., Friedecký, D., Dessoyf, M.A., Wessjohann, L.A., Spíchal, L., Strnad, M., Doležal, K.: *Anal. Chim. Acta* **751**, 176, 2012.
- Bieleski, R. L.: *Anal. Biochem.* **9**:431, 1964.
- Bogaert, I., Van Kauter, S., Werbrouck, S. P. O., Doležal, K.: *Acta Hortic.* **725**: 265, 2006.
- Daly, J.W., Christensen, B.E.: *J. Org. Chem.* **21**: 177, 1956.
- Davies, P.J. In: Davies, P. J. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Revised 3rd edition.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 2004: 1–15.
- Dobránszki, J., Magyar-Tábori, K., Jámor-Benczúr, E., Kiss, E., Lazányi, J., Bubán, T.: *Acta Argon. Hung.* **50**:117, 2002.
- Dobránszki, J., Hudak, I., Magyar-Tábori, K., Jámor-Benczúr, E., Galli, Z., Kiss, E.: *Int. J. Hort. Sci.* **10**:69, 2004.

- Dobrev, P.I., Kamínek, M.: *J. Chromatogr. A* **950**: 21-29, 2002.
- Dobrev, P.I., Novák, O., Doležal, K.; Trčková, M.; Kamínek, M. In: *Proceedings of 34th Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Dresden, Germany, June 28–July 2, 2009; p. 723.
- Doležal, K., Āstot, C., Hanuš, J., Holub, J., Peters, W., Beck, E., Sandberg, G., Strnad, M.: *Plant Growth Regul.* **36**: 181, 2002.
- Doležal, K., Popa, I., Kryštof, V., Spíchal, L., Fojtíková, M., Holub, J., Lenobel, R., Schmulling, T., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 875, 2006.
- Doležal, K., Popa, I., Hauserová, E., Spíchal, L., Chakrabarty, K., Novák, O., Kryštof, V., Voller, J., Holub, J., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 3737, 2007.
- Du, F., Ruan, G., Liu, H. : *Anal Bioanal Chem* **403**: 55, 2012a.
- Du, F., Ruan, G., Liang, S., Xie, F., Liu, H. : *Anal Bioanal Chem* **404**: 489, 2012b.
- Elion, G.B., Burgi, E., Hitchings, G.H.: *J. Am. Chem. Soc.* **15**: 414, 1952.
- Goicoechea, N., Doležal, K., Antolín, M.C., Strnad, M., Sánchez-Díaz, M.: *J. Exp. Botany* **46**: 1543, 1995.
- Fu, J.H., Sun, X.H, Wang, J.D, Chu, J. F., Yan, C.Y.: *Chinese Sci. Bull.* **56**: 355, 2011.
- Ge, L., Yong, J.W.H., Goh, N.K., Chia, L.S., Tan, S.N., Yang, X.H., Ong, E.S.: *J. Chromatogr., B* **829**: 26, 2005.
- Ge, L.Y., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Yang, X.H., Ong, E.S.: *J. Chromatogr., A* **1133**: 322, 2006.
- Hauserová, E., Swaczynová, J., Doležal, K., Lenobel, R., Popa, I., Hajduch, M., Vydra, D., Fuksová, K., Strnad, M.: *J. Chromatogr. A* **1100**: 116, 2005.
- Havlicek, L., Hanus, J., Vesely, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M.: *J. Med. Chem.* **40**: 408, 1997.
- Hecht, S.M., Leopard, N.J., Schmitz, R.Y., Skoog F.: *Phytochemistry* **9**: 1907, 1970.
- Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D. E., Strnad, M.: *Plant Growth Regul.* **26**: 109, 1998.
- Horgan, R., Hewett, E.W., Horgan, J.M., Purse, J., Wareing, P.F.: *Phytochemistry* **14**: 1005, 1975.
- Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P.I., Kocábek, T., Šolcová, B., Trávníčková, A., Kamínek, M.: *Phytochemistry* **67**: 1151, 2006.
- Jablonski, J. R., Skoog, F.: *Physiol Plant* **7**: 16, 1954.
- Ishii, Y., Hori, Y., Sakai, S., Honma, Y.: *Cell Growth Differ.* **13**: 19, 2002.

- Iwamura, H. In: Mok, D.W.S., Mok, M.C. *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, CRC Press, Boca Raton, 1994: 43–55.
- Klanicová, A., Trávniček, Z., Popa, I., Čajan, M., Doležal, K.: *Polyhedron* **25**: 1421, 2006.
- Knapp, D. R. *Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley & Sons, New York, 1979.
- Kowalska, M., Galuszka, P., Frébortová, J., Šebela, M., Béréš, T., Hluska, T., Šmehilová, M., Bilyeu, K.D., Frébort, I.: *Phytochemistry* **71**: 17, 2010.
- Kubaláková, M., Strnad, M.: *Biol. Plant.* **34**: 578, 1992.
- Kuraishi, S.: *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo* **9**: 67, 1959.
- Liang, Y., Zhu, X., Zhao, M., Liu, M.: *Methods* **56**: 174, 2012.
- Letham, D. S.: *Life Sci.* **8**: 569, 1963.
- Ligon, M. V., Dorn, S. B.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **78**: 99, 1987.
- Liu, H. T., Li, Y.F., Luan, T.G., Lan, C.Y., Shu, W.S.: *Chromatographia* **66**: 515, 2007.
- Liu, Z., Wei, F., Feng, Y. Q.: *Anal. Methods* **2**: 1676, 2010.
- Ljung, K., Sandberg, G., Moritz, T. In: Davies, P. J. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Revised 3rd edition*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 2010: 717–740.
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Hauserová, E., Greplová, J., Strnad, M., Doležal, K.: *J. Plant Growth Regul.* **28**: 341, 2009.
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Dostál, J., Strnad, M., Doležal, K.: *Biol. Plant.* **57**: 174, 2013.
- Maloň, M., Rolčík, J., Doležal, K., Marek, J., Trávniček, Z.: *J. Inorg. Biochem.* **86**: 326, 2001a.
- Maloň, M., Trávniček, Z., Maryško, M., Zbořil, R., Mašláň, M., Marek, J., Doležal, K., Rolčík, J., Krystof, V., Strnad, M.: *Inorg. Chim. Acta* **323**: 119, 2001b.
- Maloň, M., Trávniček, Z., Maryško, M., Marek, J., Doležal, K., Rolčík, J., Strnad, M.: *Transit. Met. Chem.* **27**: 580, 2002.
- McCullough, J. L., Garcia, R.L., Reece, B.: *J. Drugs Dermatol.* **7**: 131, 2008.
- Mik, V., Szüčová L., Šmehilová, M., Zatloukal, M., Doležal, K., Nisler, J., Grúz, J., Galuska, P., Strnad, M., Spíchal, L.: *Phytochemistry* **72**: 821, 2011a.
- Mik, V., Szüčová L., Spíchal, L., Plíhal, O., Nisler, J., Zahajská, L., Doležal, K., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **19**: 7244, 2011b.
- Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, M.H., Strong, F.M.: *J Am Chem Soc* **77**: 1392, 1955a.

- Miller, C.O., Skoog, F., Okomura, F. S., von Saltza, M.H., Strong, F.M.: *J Am Chem Soc* **77**: 2662, 1955b.
- Mithila, J., Murch, S.J., KrishnaRaj, S., Saxena, P.K.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **67**: 1, 2001.
- Mlejnek, P.: *J. Cell Biochem.* **83**: 678, 2001
- Mlejnek, P., Doležel, P., Procházka, S.: *Plant Sci.* **168**: 389, 2005.
- Mlejnek, P., Doležel, P.: *Toxicol. In Vitro* **19**: 985, 2005.
- Mok, D.W.S., Mok, M.C. *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function.* CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994.
- Moncalean, P., Rodriguez, A., Fernandez, B.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **67**: 257, 2001.
- Moyo, M., Finnie, J.F., Van Staden, J.: *Plant Cell Tiss Organ Cul.* **110**: 319, 2012.
- Müller, M., Munné-Bosch, S.: **7**: 37, 2011.
- Nisler, J., Zatloukal, M., Popa, I., Doležal, K., Strnad, M., Spíchal, L.: *Phytochemistry* **71**: 823, 2010.
- Novák, O., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Lenobel, R., Strnad, M.: *Anal. Chim. Acta* **480**: 207, 2003.
- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., Strnad, M.: *Phytochemistry* **69**: 2214, 2008.
- Nováková L, Vlčková H: *Anal. Chim. Acta* **656**: 8, 2009.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Norbaek, R., Ástot, C., Doležal, K., Sandberg, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 8039, 2004a.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Ástot, C., Moritz, T., Sandberg, G.: *Anal. Chem.* **76**: 2869, 2004b.
- Okumura, F.S., Masumara, M., Motoki, T., Takahashi, T., Kuraishi, S.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **30**: 194, 1957.
- Okumura, F.S., Kotani, Y., Ariga, T., Masumara, M., Kuraishi, S.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **32**: 883, 1959.
- Ortiz, A., Elkeeb, L., Truitt, A., Hindiyeh, R., Aquino, L., Tran, M, Einstein, B.: *J. Drugs Dermatol.* **8**: 459, 2009.
- Ördög, V., Stirk, W.A., van Staden, J., Novák, O., Strnad, M.: *J. Phycol.* **1**: 88, 2004.
- Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J. Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P. N., Sundberg, G., Ljung, K.: *Plant Cell* **21**: 1659, 2009.
- Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W.,

- Stes, E., Schmulling, T., Kakimoto, T., Van Montagu, M.C.E., Strnad, M., Holsters, M., Tarkowski, P., Vereecke, D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106**: 929, 2009.
- Podlešáková, K., Tarkowská, D., Pěňčík, A., Oklestřková, J., Turečková, V., Floková, K., Tarkowski, P.: Chem. Listy **106**: 373, 2012a.
- Podlešáková, K., Zalabák, D., Čudejková, M., Plíhal, O., Szučová, L., Doležal, K., Spíchal, K., Strnad, M., Galuszka, P.: PLOS ONE **6**: e39293, 2012b.
- Podwyszyńska, M., Węgrzynowicz-Lesiak, E., Doležal, K., Krekule, J., Strnad, M., Saniewski, M.: Propag. Ornam. Plants **12**: 220, 2012.
- Procházka, S., Šebánek, J. a kol. Regulátory rostlinného růstu. Academia, Praha, 1997.
- Raiford, C.L., Clark, E.P.: J. Am. Chem. Soc. **45**: 1738, 1923.
- Rappsilber, J., Mann, M., Ishihama, Y.: Nat. Protoc. **2**: 1896, 2007.
- Rattan, S.I., Clark, B.F.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **201**: 665, 1994.
- Rattan, S.I., Sodagam, L.: Rejuvenation Res. **8**, 46, 2005.
- Rialet V., Meijer L.: Anticancer Res. **11**: 1581, 1991.
- Rittenberg, D., Foster, L.: J. Biol. Chem. **133**: 727, 1940.
- Rosales, M.S.D., Solis, A.G.A., Méndez, N.L.V., Balch, E.P.M.: Rev. Fitotec. Mex. **31**: 317, 2008.
- Sakakibara, H. In: Davies, P. J. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Revised 3rd edition*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 2004: 95-114.
- Shiea J., Sunner, J.: Org. Mass Spectrom. **26**: 38, 1991.
- Skoog, F., Hamzi, H.Q., Szweykowska, A.M., Leonard, A.J., Carraway, K.L., Fuji, T., Helgeson, J. P., Loepphy, R. N.: Phytochemistry **6**: 1169, 1967.
- Skoog, F., Miller, C.O.: Symp. Soc. Exp. Biol. **11**: 118, 1957.
- Spíchal, L., Natalia Yu. Rakova N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Strnad, M., Georgy A. Romanov, G.A., Schmülling, T.: Plant Cell Physiol. **45**:1299, 2004.
- Spíchal, L., Kryštof, V., Paprskářová, M., Lenobel, R., Stýskala, J., Binarová, P., Cenklová, V., De Veylder, L., Inze, D., Kontopidis, G., Fischer, P.M., Schmuelling, T., Strnad, M.: J. Biol. Chem. **282**: 14356, 2007.
- Spíchal, L., Werner, T., Popa, I., Riefler, M., Schmülling, T., Strnad M.: FEBS J. **276**: 244, 2009a.
- Spíchal, L., Popa, I., Voller, J., Doležal, K., Strnad, M., Werner, T., Schmülling, T.: CZ 300774, 2009b.
- Spíchal, L., Gemrotová, M., Zatloukal, M., Frébortová, J., Galuszka, P., Werner, T.,

- Schmulling, T., Doležal, K., Strnad, M.: US 8222260, 2012.
- Stirk, W.A., Novák, O., Strnad, M., Van Staden, J.: *Plant Growth Regul.* **41**: 13, 2003.
- Stirk, W.A., Arthur, G.D., Lourens, A.F., Novák, O., Strnad, M., Van Staden, J.: *J. Appl. Phycol.* **16**: 31, 2004.
- Stirk, W.A., Novák, O., Václavíková, K., Tarkowski, P., Strnad, M., van Staden, J.: *Planta* **227**: 1279, 2008.
- Stirk, W.A., van Staden, J., Novák, O., Doležal, K., Strnad, M., Dobrev, P. I., Sipos, G., Ördög, V., Balint, P.: *J. Phycol.* **47**: 291, 2011.
- Summons, R. E., Palni, L. M. S., Letham, D. S.: *FEBS Lett.* **151**: 122, 1983.
- Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K.: *Plant Methods* **8**: 17, 2012.
- Strnad, M.: *J Plant Growth Regul.* **15**: 179, 1996.
- Strnad, M.: *Physiol. Plant.* **101**: 674, 1997.
- Strnad, M., Hanuš, J., Peters, W., Beck, E.: *Phytochemistry* **37**: 1059, 1994.
- Strnad, M., Hanuš, J., Vaněk, T., Kamínek, M., Hanke, D.E.: *Phytochemistry* **45**: 213, 1997.
- Strnad, M., Peters, W., Beck, E., Kamínek, M.: *Plant Physiol.* **99**: 74, 1992.
- Sussman, M.R., Kende, H.: *Planta* **140**: 251, 1978.
- Swart, P.A., Kulkarni, M.G., Bairu, M.W., Finnie J.F., Van Staden, J.: *Sci. Hortic.* **135**: 151, 2012.
- Szüčová, L., Zatloukal, M., Spíchal, L., Fröhlich, L., Doležal, K., Strnad, M., Massino, F.J.: WO 2008/008770.
- Szüčová, L., Spíchal, L., Doležal, K., Zatloukal, M., Greplová, J., Galuszka, P., Kryštof, V., Voller, J., Popa, I., Massino, F.J., Jorgensen, J.E., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 1938, 2009.
- Szüčová, L., Zatloukal, M., Spíchal, L., Voller, J., Doležal, K., Strnad, M., Massino, F.J.: US 7960397, 2011
- Takei, K., Yamaya, T., Sakakibara, H.: *J. Plant Res.* **116**: 265, 2003.
- Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Åstot C., Schmülling, T., Holub, J., Fuksová, K., Sandberg, G., Strnad, M.: *Physiol. Plant.* **117**: 579, 2003.
- Tarkowski, P., Doležal, K., Strnad, M.: *Chem. Listy* **98**, 834, 2004.
- Tarkowski, P., Ge, L., Yong, J.W.H., Tan, S.N.: *Trends Anal. Chem.* **28**: 323, 2009.
- Tarkowski, P., Floková, K., Václavíková, K., Jaworek, P., Raus, P., Norström, A., Novák, O., Doležal, K., Šebela, M., Frébortová J.: *Molecules* **15**: 9214, 2010.

- Tarkowski, P., Václavíková, K., Novák, O., Pertry, I., Hanuš, J., Whenham, R., Vereecke, D., Šebela, M., Strnad M.: *Anal. Chim. Acta* **680**: 86, 2010b.
- Trávníček, Z., Maloň, M., Šindelář, Z., Doležal, K., Rolčík, J., Kryštof, V., Strnad, M., Marek, J.: *J. Inorg. Biochem.* **84**: 23, 2001.
- Tremaine, A. M., Ortiz, A., Elkeeb, L., Tran, M., Weinstein, G.: *J. Drugs Dermatol.* **9**: 647, 2010.
- Turečková, V., Novák, O., Strnad, M.: *Talanta* **80**: 390, 2009.
- Valero-Aracama, C., Kane, M., Wilson, S., Philman, N.: *Plant Growth Regul.* **60**: 43, 2010.
- Veselý, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S., Meijer, L.: *Eur. J. Biochem.* **224**: 771, 1994.
- Voller, J., Zatloukal, M., Lenobel, R., Doležal, K., Béreš, T., Kryštof, V., Spíchal, L., Niemann, P., Džubák, P., Hajdúch, M., Strnad, M.: *Phytochemistry* **71**: 1350, 2010.
- Wan, Z.-K., Binnun, E., Wilson, D.P., Lee, J.: *Org. Lett.* **7**: 5877, 2005.
- Walla, J., Szüčová, L., Císařová, I., Gucký, T., Zatloukal, M., Doležal, K., Greplová, J., Massino, F. J., Strnad, M.: *J. Mol. Struct.* **975**: 376, 2010.
- Werbrouck, S.P.O., Strnad, M., Van Onckelen, H.A., Debergh, P.C.: *Physiol. Plant.* **98**: 291, 1996.
- Wildman, S.G.: *Plant Growth Regul.* **22**: 37, 1997.
- Wojtania, A. *Acta Soc Bot Pol* **79**: 101, 2010.
- Yang, Y.Y., Yamaguchi, I., Kato, Y., Weiler, E.W., Murofushi, N., Takahashi, N.: *J. Plant Growth Regul.* **12**: 21, 1993.
- Zatloukal, M., Gemrotová, M., Doležal, K., Havlíček, L., Spíchal, L., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **16**: 9268, 2008.
- Ástot, C., Doležal, K., Moritz, T., Sandberg, G.: *J. Mass Spectrom.* **33**: 89, 1998.
- Ástot, C., Doležal, K., Moritz, T., Sandberg, G.: *J. Mass Spectrom.* **35**: 13, 2000a.
- Ástot, C., Doležal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N. H., Sandberg, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 14778, 2000b.

9. Seznam publikací použitých v DSc. Disertaci

- Aremu, A.O., Bairu, M. W., Doležal, K., Finnie, J.F., Van Staden, J.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **108**:1, 2012.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Szüčová, L., Doležal, K., Finnie, J.F., Van Staden, J.: *Acta Physiol. Plant.* **34**: 2265, 2012.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Novák, O., Plačková, L., Zatloukal, M., Doležal, K., Finnie, J.F., Strnad, M., Van Staden, J.: *Planta* **236**: 1775, 2012.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **90**:15, 2007.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **95**:373, 2008.
- Bairu, M.W., Jain, N., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J.: *S. Afr. J. Bot.* **75**:122, 2009.
- Bairu, M.W., Novak, O., Doležal, K., Van Staden, J.: *Plant Growth Regul.* **63**:105, 2011.
- Béres, T., Zatloukal, M., Voller, J., Niemann, P., Gansche, M.C., Tarkowski, P., Novák, O., Hanuš, J., Strnad, P., Doležal, K.: *Anal. Bioanal. Chem* **398**: 2071, 2010.
- Béres, T., Gemrotová, M., Tarkowski, P., Ganzera, M., Maier, V., Friedecký, D., Dessoyf, M.A., Wessjohann, L.A., Spíchal, L., Strnad, M., Doležal, K.: *Anal. Chim. Acta* **751**, 176, 2012.
- Depuydt, S., Doležal, K., Van Lijsebettens, M., Moritz, T., Holsters, M., Vereecke, D.: *Plant Physiology* **146**: 1267-1281, 2008.
- Doležal, K., Ástot, C., Hanuš, J., Holub, J., Peters, W., Beck, E., Sandberg, G., Strnad, M.: *Plant Growth Regul.* **36**: 181, 2002.
- Doležal, K., Popa, I., Kryštof, V., Spíchal, L., Fojtíková, M., Holub, J., Lenobel, R., Schmulling, T., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 875, 2006.
- Doležal, K., Popa, I., Hauserová, E., Spíchal, L., Chakrabarty, K., Novák, O., Kryštof, V., Voller, J., Holub, J., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **15**:3737, 2007.
- Goicoechea, N., Doležal, K., Antolín, M.C., Strnad, M., Sánchez-Díaz, M.: *J. Exp. Botany* **46**: 1543, 1995.
- Hauserová, E., Swaczynová, J., Doležal, K., Lenobel, R., Popa, I., Hajduch, M., Vydra, D., Fuksová, K., Strnad, M.: *J. Chromatogr. A* **1100**: 116, 2005.
- Jones, B., Gunneras, S. A., Petersson, S.V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Doležal, K., Sandberg, G., Ljung, K.: *Plant Cell* **22**: 2956-2969, 2010.

- Karady, M., Novák, O., Horna, A., Strnad, M., Doležal, K.: *Electroanalysis* **23** (12): 2898 – 2905, 2011.
- Klanicová, A., Trávníček, Z., Popa, I., Čajan, M., Doležal, K.: *Polyhedron* **25**: 1421, 2006.
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Hauserová, E., Greplová, J., Strnad, M., Doležal, K.: *J. Plant Growth Regul.* **28**: 341, 2009.
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Dostál, J., Strnad, M., Doležal, K.: *Biol. Plant.* **57**: 174, 2013.
- Maloň, M., Trávníček, Z., Maryško, M., Zbořil, R., Mašláň, M., Marek, J., Doležal, K., Rolcik, J., Krystof, V., Strnad, M.: *Inorg. Chim. Acta* **323**: 119, 2001.
- Maloň, M., Trávníček, Z., Maryško, M., Marek, J., Doležal, K., Rolcik, J., Strnad, M.: *Transit. Met. Chem.* **27**: 580, 2002.
- Mik, V., Szüčová L., Šmehilová, M., Zatloukal, M., Doležal, K., Nisler, J., Grúz, J., Galuska, P., Strnad, M., Spíchal, L.: *Phytochemistry* **72**: 821, 2011.
- Mik, V., Szüčová L., Spíchal, L., Plíhal, O., Nisler, J., Zahajská, L., Doležal, K., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **19**: 7244, 2011.
- Nisler, J., Zatloukal, M., Popa, I., Doležal, K., Strnad, M., Spíchal, L.: *Phytochemistry* **71**: 823, 2010.
- Novák, O., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Lenobel, R., Strnad, M.: *Anal. Chim. Acta* **480**: 207, 2003.
- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., Strnad, M.: *Phytochemistry* **69**: 2214, 2008.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Norbaek, R., Ástot, C., Doležal, K., Sandberg, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 8039, 2004.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Ástot, C., Moritz, T., Sandberg, G.: *Anal. Chem.* **76**: 2869, 2004.
- Podlešáková, K., Zalabák, D., Čudejzková, M., Plíhal, O., Szüčová, L., Doležal, K., Spíchal, K., Strnad, M., Galuszka, P.: *PLOS ONE* **6**: e39293, 2012b.
- Podwyszyńska, M., Węgrzynowicz-Lesiak, E., Doležal, K., Krekule, J., Strnad, M., Saniewski, M.: *Propag. Orn. Plants* **12**: 220, 2012.
- Stepanova, A.S., Robertson-Hoyt, J., Yun, Y., Benavente, L.M., Xie, D., Doležal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., Alonso, J.M.: *Cell* **133**: 177-191, 2008.
- Stirk, W.A., van Staden, J., Novák, O., Doležal, K., Strnad, M., Dobrev, P. I., Sipos, G., Ördög, V., Balint, P.: *J. Phycol.* **47**: 291, 2011.

- Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K.: *Plant Methods* **8**: 17, 2012.
- Szüčová, L., Spíchal, L., Doležal, K., Zatloukal, M., Greplová, J., Galuszka, P., Kryštof, V., Voller, J., Popa, I., Massino, F.J., Jorgensen, J.E., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 1938, 2009.
- Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Ástot, C., Schmölling, T., Holub, J., Fuksová, K., Sandberg, G., Strnad, M.: *Physiol. Plant.* **117**: 579, 2003.
- Tarkowski, P., Doležal, K., Strnad, M.: *Chem. Listy* **98**, 834, 2004.
- Tarkowski, P., Floková, K., Václavíková, K., Jaworek, P., Raus, P., Norström, A., Novák, O., Doležal, K., Šebela, M., Frébortová J.: *Molecules* **15**: 9214, 2010.
- Trávníček, Z., Maloň, M., Šindelář, Z., Doležal, K., Rolčík, J., Kryštof, V., Strnad, M., Marek, J.: *J. Inorg. Biochem.* **84**: 23, 2001.
- Voller, J., Zatloukal, M., Lenobel, R., Doležal, K., Běreš, T., Kryštof, V., Spíchal, L., Niemann, P., Džubák, P., Hajdúch, M., Strnad, M.: *Phytochemistry* **71**: 1350, 2010.
- Walla, J., Szüčová, L., Císařová, I., Gucký, T., Zatloukal, M., Doležal, K., Greplová, J., Massino, F. J., Strnad, M.: *J. Mol. Struct.* **975**: 376, 2010.
- Yin, X.J., Volk, S., Ljung, K., Mehlmer, N., Doležal, K., Ditengou, F., Hanano, S., Davis, S.J., Schmelzer, E., Sandberg, G., Teige, M., Palme, K., Pickart, C., Bachmair, A.: *Plant Cell* **19**: 1898-1911, 2007.
- Zatloukal, M., Gemrotová, M., Doležal, K., Havlíček, L., Spíchal, L., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem.* **16**: 9268, 2008.
- Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Doležal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J., Lochman, J.U.: *Nature* **465**: 1089-1092, 2010.
- Ástot, C., Doležal, K., Moritz, T., Sandberg, G.: *J. Mass Spectrom.* **33**: 89, 1998.
- Ástot, C., Doležal, K., Moritz, T., Sandberg, G.: *J. Mass Spectrom.* **35**: 13, 2000.
- Ástot, C., Doležal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N. H., Sandberg, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 14778, 2000.

10. Seznam všech publikací autora (dle WOS)

1. ČERNOCH, V., DOLEŽAL, K.: Hybrid identification of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) by storage proteins electrophoresis. *Rostlinná Výroba* 39: 897-908, 1993.
2. GOICOECHEA, M., DOLEŽAL, K., ANTOLÍN, M. C., STRNAD, M., SANCHEZ-DIAZ, M., Influence of mycorrhizae and *Rhizobium* on cytokinin content in drought - stressed alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 46: 1543 – 1549, 1995.
3. LEBEDA, A., DOLEŽAL, K., Peroxidase isoenzyme polymorphism as a potential marker for detection of field resistance in *Cucumis sativus* to cucumber downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov.). *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 102: 467 – 471, 1995.
5. FAISS, M., STRNAD, M., REDIG, P., DOLEŽAL, K., HANUŠ, J., Van ONCKELEN, H., SCHMUELLING, T., Chemically induced expression of the *rolC* encoded b-glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyse endogenous cytokinin glucosides in planta. *Plant Journal* 10: 33 – 46, 1996
6. TRÁVNÍČEK, Z., MAREK, J., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: The structure of 6-(2-hydroxybenzylamino)purine, acetic acid solvate. *Zeitschrift fur Kristallographie* 212: 538-541, 1997.
7. ĀSTOT, C., DOLEŽAL, K., MORITZ, T., SANDBERG, G.: Precolumn Derivatization and Capillary Liquid Chromatographic/Frit-Fast Atom Bombardment Mass Spectrometric Analysis of Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Mass Spectrometry* 33: 892-902, 1998
8. LEBEDA, A., KRĀSTKOVÁ, E., DOLEŽAL, K.: Peroxidase isozyme polymorphism in *Cucurbita pepo* cultivars with various morphotypes and different level of field resistance to powdery mildew. *Scientia Horticulturae* 81: 103-112, 1999
9. TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., BILER, M., HAJDÚCH, M., BROŽ, P., DOLEŽAL, K., HOLUB, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Synthesis, characterization and biological activity of two nickel(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine. *Transition Metal Chemistry* 25: 265-269, 2000.
10. ĀSTOT, C., DOLEŽAL, K., MORITZ, T., SANDBERG, G.: Deuterium *in-vivo* labelling of cytokinins in *Arabidopsis thaliana* analysed by Capillary Liquid Chromatography/Frit-Fast Atom Bombardment/Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 13-22, 2000.
11. HUŠKOVÁ, R., PĚCHOVÁ, D., KOTOUČEK, M., LEMR, K., DOLEŽAL, K.: Voltammetric behaviour and determination of some cytokinines on mercury electrode. *Chemické Listy* 94: 1004-1009, 2000.
12. ĀSTOT, C., DOLEŽAL, K., NORDSTRÖM, A., WANG, Q., KUNKEL, T., MORITZ, T., CHUA, N. H., SANDBERG, G.: An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 14778-14783, 2000.
13. TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., ŠINDELÁŘ, Z., DOLEŽAL, K., ROLČÍK, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M. & MAREK, J.: Preparation, physicochemical properties and biological activity of copper(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine (HL1) or 6-(3-chlorobenzylamino)purine (HL2). The single-crystal X-ray structure of [Cu(H+L2)2Cl3]Cl·2H2O. *Journal of Inorganic Biochemistry* 84: 23-32, 2001.

14. MALOŇ, M., TRÁVNÍČEK, Z., MARYŠKO, M., ZBOŘIL, R., MAŠLÁŇ, M., MAREK, J., DOLEŽAL, K., ROLČÍK, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Metal complexes as anticancer agents 2. Iron (III) and copper (II) bio-active complexes with N⁶-benzylaminopurine derivatives. *Inorganica Chimica Acta* 323, 119-129, 2001.
15. MALOŇ, M., TRÁVNÍČEK, Z., MARYŠKO, M., MAREK, J., DOLEŽAL, K., ROLČÍK, J., STRNAD, M.: Synthesis, characterization and antitumour activity of copper(II) 6-(4-chlorobenzylamino)purine complexes. X-ray structure of 6-(4-chlorobenzylaminopurinium perchlorate. *Transition Metal Chemistry* 27: 580-586, 2002.
16. DOLEŽAL, K., ÁSTOT, C., HANUŠ, J., HOLUB, J., PETERS, W., BECK, E., STRNAD, M., SANDBERG, G.: Identification of Aromatic Cytokinins in Suspension cultured Photoautotrophic Cells of *Chenopodium rubrum* by Capillary Liquid Chromatography/Frit - Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Plant Growth Regulation* 36: 181-189, 2002.
17. TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., POPA, I., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: Preparation and cytotoxic activity of nickel(II) complexes of 6-benzylaminopurine derivatives. *Transition Metal Chemistry* 27: 918-923, 2002.
18. NOVÁK, O., TARKOWSKI, P., TARKOWSKÁ, D., DOLEŽAL, K., LENOBEL, R., STRNAD, M.: Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 480: 207-218, 2003.
19. TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., ZATLOUKAL, M., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., MAREK, J.: Mixed ligand complexes of platinum(II) and palladium(II) with cytokinin-derived compounds Bohemine and Olomoucine: X-ray structure of [Pt(BohH⁺ - N7)Cl₃]·9/5H₂O {Boh=6-(benzylamino)-2-[(3-hydroxypropyl)-amino]-9-isopropylpurine, Bohemine}. *Journal of Inorganic Biochemistry* 94: 307-316, 2003.
20. TARKOWSKÁ, D., DOLEŽAL, K., TARKOWSKI, P., ÁSTOT, C., HOLUB, J., FUKSOVÁ, K., SCHMÜLLING, T., SANDBERG, G., STRNAD, M.: Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* 117: 579-590, 2003
21. TARKOWSKÁ, D., KOTOUČEK, M., DOLEŽAL, K.: Electrochemical reduction of 6-benzylaminopurine at mercury electrodes and its analytical application. *Collection of Czech Chemical Communications* 68: 1076-1093, 2003.
22. NORDSTRÖM, A., TARKOWSKI, P., TARKOWSKÁ, D., NORBAEK, R., ÁSTOT, C., DOLEŽAL, K., SANDBERG, G.: Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8039-8044, 2004.
23. NORDSTRÖM, A., TARKOWSKI, P., TARKOWSKÁ, D., DOLEŽAL, K., ÁSTOT, C., SANDBERG, G., MORITZ, T.: Derivatization for LC electrospray ionization-MS: A tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Analytical Chemistry* 76: 2869-2877, 2004.
24. TRÁVNÍČEK, Z., POPA, I., DOLEŽAL, K.: 6-(4-methoxybenzylamino)purin-3-ium chloride. *Acta Crystallographica C* 60: o662-o664, 2004.

25. TARKOWSKI, P., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: Analytical methods in cytokinin research. *Chemicke listy* 98: 834-841, 2004.
26. YANAI, O., SHANI, E., DOLEŽAL, K., TARKOWSKI, P., SABLÓWSKI, R., SANDBERG, G., SAMACH, A., ORI, N.: Arabidopsis KNOXI Proteins Activate Cytokinin Biosynthesis. *Current Biology* 15: 1566-1571, 2005.
27. HAUSEROVÁ, E., SWACZYNOVÁ, J., DOLEŽAL, K., LENOBEL, R., POPA, I., HAJDÚCH, M., VYDRA, M., FUKSOVÁ, K., STRNAD, M.: Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *Journal of Chromatography A* 1100: 116-125, 2005
27. DOLEŽAL, K., POPA, I., KRYŠTOF, V., SPÍCHAL, L., FOJTÍKOVÁ, M., HOLUB, J., LENOBEL, R., SCHMÜLLING, T., STRNAD, M.: Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14: 875-884, 2006.
28. VLČKOVÁ, A., ŠPUNDOVÁ, M., KOTABOVÁ, E., NOVOTNÝ, R., DOLEŽAL, K., NAUŠ, J.: Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267, 2006.
29. KLANICOVÁ, A., TRÁVNÍČEK, Z., POPA, I., ČAJAN, M., DOLEŽAL, K.: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of Co(II) complexes with N6-substituted adenine derivatives: X-ray structures of 6-(4-chlorobenzylamino)purin-di-ium diperchlorate dihydrate and [Co-6(μ -L-6)(4)Cl-8(DMSO)(10)] · 4DMSO. *Polyhedron* 25: 1421-1432, 2006.
30. KOPEL, P., ČERMÁKOVÁ, S., DOLEŽAL, K., KALINSKA, B., BIENKO, A., MROZINSKI, J.: Synthesis and properties of a trinuclear copper(II) complex with trithiocyanurate bridge. *Polish Journal of Chemistry* 81: 327-335, 2007.
31. KOPEL, P., DOLEŽAL, K., MACHALA, L., LANGER, V.: Synthesis, characterization and screening of biological activity of Zn(II), Fe(II) and Mn(II) complexes with trithiocyanuric acid. *Polyhedron* 26: 1583-1589, 2007.
32. DOLEŽAL, K., POPA, I., HAUSEROVÁ, E., SPÍCHAL, L., CHAKRABARTY, K., NOVÁK, O., KRYŠTOF, V., VOLLER, J., HOLUB, J., STRNAD, M.: Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N⁶-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 3737-3747, 2007.
33. BAIRU, M. W., STIRK, W. A., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J.: Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90: 15-23, 2007.
34. YIN, X. J., VOLK, S., LJUNG, K., MEHLMER, N., DOLEŽAL, K., DITENGOU, F., HANANO, S., DAVIS, S. J., SCHMELZER, E., SANDBERG, G., TEIGE, M., PALME, K., PICKART, C., BACHMAIR, A.: Ubiquitin lysine 63 chain-forming ligases regulate apical dominance in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1898-1911, 2007.
35. DEPUYDT, S., DOLEŽAL, K., VAN LIJSEBETTENS, M., MORITZ, T., HOLSTERS, M., VEREECKE, D.: Modulation of the hormone setting by *Rhodococcus fascians* results in ectopic *KNOX* activation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 146: 1267-1281, 2008.
36. STEPANOVA, A. S., ROBERTSON-HOYT, J., YUN, Y., BENAVENTE, L. M., XIE, D., DOLEŽAL, K., SCHLERETH, A., JÜRGENS, G., ALONSO, J. M.: TAA1-Mediated

Auxin Biosynthesis Is Essentials of Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell* 133: 177-191, 2008.

37. NOVÁK, O., HAUSEROVÁ, E., AMAKOROVÁ, P., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: Cytokinin profilig in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69: 2214-2224, 2008.

38. ZATLOUKAL, M., GEMROTOVÁ, M., DOLEŽAL, K., HAVLÍČEK, L., SPÍCHAL, L., STRNAD, M.: Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 9268-9275, 2008.

39. BAIRU, M. W., STIRK, W. A., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J.: The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95: 373-379, 2008.

40. NIEMINEN, K., IMMANEN, J., LAXELL, M., KAUPPINEN, L., TARKOWSKI, P., DOLEŽAL, K., TÄHTIHARJU, S., ELO, A., DECOURTEIX, M., LJUNG, K., BHALERAO, R., KEINONEN, K., ALBERT, V. A., HELARIUTTA, Y.: Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20032-20037, 2008.

41. BAIRU, M. W., JAIN, N., STIRK, W. A., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J.: Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany* 75: 122-127, 2009.

42. SZŮČOVÁ, L., SPÍCHAL, L., DOLEŽAL, K., ZATLOUKAL, M., GREPLOVÁ, J., GALUSZKA, P., KRYŠTOF, V., VOLLER, J., POPA, I., MASSINO, F. J., JORGENSEN, J. E., STRNAD, M.: Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 1938-1947, 2009.

43. ŠILLER, M., ANZENBACHER, P., ANZENBACHEROVÁ, E., DOLEŽAL, K., POPA, I., STRNAD, M.: Interactions of Olomoucine II with Human Liver Microsomal Cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition* 37: 1198-1202, 2009.

44. MADLENER, S., SVAČINOVÁ, J., KITNER, M., KOPECKÝ, J., EYTNER, R., LACKNER, A., VO, T. P. N., FRISCH, R., GRUSCH, M., DE MARTIN, R., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., KRUPITZA, G.: In vitro anti-inflammatory and anticancer activities of extracts of *Acalypha alopecuroidea* (Euphorbiaceae). *International Journal of Oncology* 35: 881-891, 2009.

45. MALÁ, J., MÁCHOVÁ, P., CVRČKOVÁ, H., KARADY, M., NOVÁK, O., MIKULÍK, J., HAUSEROVÁ, E., GREPLOVÁ, J., STRNAD, M., DOLEŽAL, K.: Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 341-348, 2009.

46. KOPEL, P., MROZINSKI, J., DOLEŽAL, K., LANGER, A., BOČA, R., BIENKO, A., POCHABA, A.: Ferromagnetic Properties of a Trinuclear Nickel(II) Komplex with a Trithiocyanurate Bridge. *European Journal of Inorganic Chemistry* 36: 5475-5482, 2009.

47. NISLER, J., ZATLOUKAL, M., POPA, I., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., SPÍCHAL, L.: Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry* 71: 823-830, 2010.

48. ŠMEJKAL, K., SVAČINOVÁ, J., ŠLAPETOVÁ, T., SCHNEIDEROVÁ, K., DALL'ACQUA, S., INNOCENTI, G., ZÁVALOVÁ, V., KOLLÁR, P., CHUDÍK, S., MAREK, R., JULÍNEK, O., URBANOVÁ, M., KANTAL, M., CSÖLLEI, M., DOLEŽAL, K.: Cytotoxic activities of several geranyl-substituted flavanones. *Journal of Natural Products* 73: 568-572, 2010.
49. ZHAO, Z., ANDERSEN, S. U., LJUNG, K., DOLEŽAL, K., MIOTK, A., SCHULTHEISS, S. J., LOCHMAN, J. U: Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* 465: 1089-1092, 2010.
50. VOLLER, J., ZATLOUKAL, M., LENOBEL, R., DOLEŽAL, K., BÉREŠ, T., KRYŠTOF, V., SPÍCHAL, L., NIEMANN, P., DŽUBÁK, P., HAJDÚCH, M., STRNAD, M: Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study. *Phytochemistry* 71: 1350-1359, 2010.
51. WALLA, J., SZŮČOVÁ, L., CÍSAŘOVÁ, I., GUCKÝ, T., ZATLOUKAL, M., DOLEŽAL, K., GREPLOVÁ, J., MASSINO, F. J., STRNAD, M: X-ray structure, NMR and stability-in-solution study of 6-furfurylamino-9-(terahydropyran-yl)purine – A new active compound for cosmetology. *Journal of Molecular Structure* 975: 376-380, 2010.
52. PROKOPOVÁ, J., ŠPUNDOVÁ, M., SEDLÁŘOVÁ, M., HUSIČKOVÁ, A., NOVOTNÝ, R., DOLEŽAL, K., NAUŠ, J., LEBEDA, A.: Photosynthetic response of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 716-723, 2010.
53. BÉRES, T., ZATLOUKAL, M., VOLLER, J., NIEMANN, P., GASHCHE, M. C., TARKOWSKI, P., NOVÁK, O., HANUŠ, J., STRNAD, M., DOLEŽAL, K.: Tandem mass spectrometry identification and LC-MS quantification of intact cytokinin nucleotides in K-562 human leukemia cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 2071-2080, 2010.
54. JONES, B., GUNNERAS, S. A., PETERSSON, S. V., TARKOWSKI, P., GRAHAM, N., MAY, S., DOLEŽAL, K., SANDBERG, G., LJUNG, K.: Cytokinin Regulation of Auxin Synthesis in Arabidopsis Involves a Homeostatic Feedback Loop Regulated via Auxin and Cytokinin Signal Transduction. *Plant Cell* 22: 2956-2969, 2010.
55. TARKOWSKI, P., FLOKOVÁ, K., VÁCLAVÍKOVÁ, K., JAWOREK, P., RAUS, M., NORDSTROM, A., NOVÁK, O., DOLEŽAL, K., SEBELA, M., FRÉBORTOVÁ, J.: An Improved in Vivo Deuterium Labeling Method for Measuring the Biosynthetic Rate of Cytokinins. *MOLECULES* 15: 9214-9229, 2010.
56. BAIRU, M. W., NOVÁK, O., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J.: Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regulation* 63: 105–114, 2011.
57. STIRK, W. A., VAN STADEN, J., NOVAK, O., DOLEZAL, K., STRNAD, M., DOBREV, P. I., SIPOS, G., ORDOG, V., BALINT, P.: Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (Chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle. *Journal of Phycology* 47: 291-301, 2011.
58. MIK, V., SZŮČOVÁ, L., SMEHILOVÁ, M., ZATLOUKAL, M., DOLEZAL, K., NISLER, J., GRUZ, J., GALUSZKA, P., STRNAD, M., SPÍCHAL, L.: N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *PHYTOCHEMISTRY* 72: 821-831, 2011.
59. ŠILLER, M., ANZENBACHER, P., ANZENBACHEROVÁ, E., DOLEŽAL, K.,

- STRNAD, M.: In vitro interaction of a novel neutrophil growth factor with human liver microsomal cytochromes P450 and the contribution of UDP-glucuronosyltransferases to its metabolism. *Xenobiotica* 41: 934-944, 2011.
60. MIK, V., SZUČOVÁ, L., SPÍCHAL, L., PLÍHAL, O., NISLER, J., ZAHAJSKÁ, L., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: N9-Substituted N(6)-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]purine derivatives and their biological activity in selected cytokinin bioassays. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 7244-7251, 2011.
61. KARADY, M., NOVÁK, O., HORNA, A., STRNAD, M., DOLEŽAL, K.: High Performance Liquid Chromatography-Electrochemistry-Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HPLC/EC/ESI-MS) for Detection and Characterization of Roscovitine Oxidation Products. *Electroanalysis* 23 (12): 2898 – 2905, 2011.
62. AREMU, A. O., BAIRU, M. W., DOLEŽAL, K., FINNIE, J. F., VAN STADEN, J.: Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108: 1–16, 2012.
63. AREMU, A. O., BAIRU, M. W., SZUČOVÁ, L., DOLEŽAL, K., FINNIE, J. F., VAN STADEN, J.: Shoot and root proliferation in ‘Williams’ banana: are the topolins better cytokinins? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 111: 209-218, 2012.
64. AREMU, A. O., BAIRU, M. W., SZUČOVÁ, L., DOLEŽAL, K., FINNIE, J. F., VAN STADEN, J.: Assessment of the role of meta-topolins on in vitro produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated ‘Williams’ banana. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 2265–2273, 2012.
65. SVAČINOVÁ, J., NOVÁK, O., PLAČKOVÁ, L., LENOBEL, R., HOLÍK, J., STRNAD, M., DOLEŽAL, K.: A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* 8: 17, 2012.
66. BERÉS, T., GEMROTOVÁ, TARKOWSKI, P., GANZERA, M., MAIER, V., FRIEDECKÝ, D., DESSOYF, M., WESSJOHANN, L. A., SPÍCHAL, L., STRNAD, M., DOLEŽAL, K.: Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme in vitro reaction. *Analytica Chimica Acta* 751: 176– 181, 2012.
67. UNGER, C., POPESCU, R., GIESSRIGL, B., RÁROVÁ, L., HERBACEK, L., SEELINGER, M., DIAZ, R., WALLNÖFER, B., FRITZER-SZEKERES, M., SZEKERES, T., FRISCH, R., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., DE MARTIN, R., GRUSCH, M., KOPP, B., KRUPITZA, G.: An apolar extract of *Critonia morifolia* inhibits c-Myc, cyclin D1, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C and Akt and induces apoptosis. *International Journal of Oncology* 40: 2131-2139, 2012.
68. PODLEŠÁKOVÁ, K., ZALABÁK, D., ČUDEJKOVÁ, M., PLÍHAL, O., SZUČOVÁ, L., DOLEŽAL, K., SPÍCHAL, L., STRNAD, M., GALUSZKA, P.: Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range. *PLOS ONE* 7: e39293, 2012.
69. HABIB, S. H., OOI, S. E., NOVÁK, O., TARKOWSKÁ, D., ROLČÍK, J., DOLEŽAL, K., SYED-ALWEE, S. S. R., HO, C. L., NAMASIVAYAM, P.: Comparative mineral and hormonal analyses of wild type and TLS somaclonal variant derived from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*) tissue culture. *Plant Growth Regulation* 68: 313-317, 2012.
70. PODWYSZYNSKA, M., WEGRZYNOWICZ-LESIK, E., DOLEŽAL, K., KREKULE,

J., STRNAD, M., SANIEWSKI, M.: New cytokinins – *meta*-methoxytopolins in micropropagation of *Cotinus coggygria* Scop. 'Royal Purple'. Propagation of Ornamental Plants 12: 220-228, 2012.

71. AREMU, A. O., BAIRU, M. W., NOVÁK, O., PLAČKOVÁ, L., ZATLOUKAL, M., DOLEŽAL, K., FINIE, J. F., STRNAD, M., VAN STADEN, J.: Physiological responses and endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured 'Williams' bananas in relation to roscovitine and an inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase (INCYDE) treatments. Planta 236: 1775-1790, 2012.

72. CUESTA, C., NOVÁK, O., ORDÁS, R. J., FERNÁNDEZ, B., STRNAD, M., DOLEŽAL, K., RODRÍGUEZ, A.: Endogenous cytokinin profiles and their relationships to between-family differences during adventitious caulogenesis in *Pinus pinea* cotyledons. Journal of Plant Physiology 169: 1830– 1837, 2012.

73. MALÁ, J., MÁCHOVÁ, P., CVRČKOVÁ, H., KARADY, M., NOVÁK, O., MIKULÍK, J., DOSTÁL, J., STRNAD, M., DOLEŽAL, K.: The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. Biologia Plantarum 57: 174-178, 2013.

74. AREMU, A. O., GRUZ, J., ŠUBRTOVÁ, M., SZÜČOVÁ, L., DOLEŽAL, K., BAIRU, M. W., FINNIE, J. F., VAN STADEN, J. : Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins. Journal of Plant Physiology 170: 1303– 1308, 2013.

75. MOYO, M., AREMU, A. O., GRUZ, J., ŠUBRTOVÁ, M., SZÜČOVÁ, L., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J.: Conservation strategy for *Pelargonium sidoides* DC: Phenolic profile and pharmacological activity of acclimatized plants derived from tissue culture. Journal of Ethnopharmacology 149: 557–561, 2013.

76. AREMU, A. O., BAIRU, M. W., SZÜČOVÁ, L., DOLEŽAL, K., FINNIE, J. F., VAN STADEN, J.: Genetic fidelity in tissue-cultured 'Williams' bananas – The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. Scientia Horticulturae 161: 324–327, 2013.