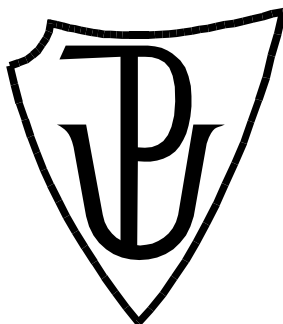


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Cukerné konjugáty cytokininů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Alena Zemánková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Alena Zemánková
Název práce:	Cukerné konjugáty cytokininů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	Diplomová práce je zaměřena na syntézu cukerných konjugátů cytokininů a jejich biologickou aktivitu. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se cytokininy a jejich metabolismem, zvláště pak cytokininovými glykosidy. V experimentální části byly připraveny cytokininové konjugáty odvozené převážně od aromatických cytokininů s glukosovou a galaktosovou cukernou jednotkou připojenou na dusíkové atomy N3 a N9 purinového skeletu. Připravené sloučeniny byly charakterizovány dostupnými fyzikálně-chemickými metodami a jejich biologická aktivita byla testována v kořenovém biotestu na semenáčcích <i>A. thaliana</i>, v kompetičním ligand-vazebném testu na receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z <i>A. thaliana</i> a na <i>in vivo</i> toxicitu na buněčných liniích ARPE-19, BJ a HaCat.
Klíčová slova:	<i>A. thaliana</i> , cytokininy, cytokininové glykosidy, cytotoxicita, kompetiční ligand-vazebný test, kořenový biotest, N-glykosylace.
Počet stran:	57
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Alena Zemánková
Title of thesis:	Cytokinin sugar conjugates
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
The year of presentation:	2018
Abstract:	The thesis is focused on synthesis of cytokinin sugar conjugates and their biological activity. In the theoretical part the current knowledge about cytokinins, their metabolism and particularly about cytokinin glycosides is summarized. In the experimental part, cytokinin conjugates preferentially derived from aromatic cytokinins with glucose or galactose sugar unit connected to nitrogen atom at the position <i>N</i>3 and <i>N</i>9 of purine moiety have been prepared. The compounds were characterized by available physico-chemical methods and their biological activity was tested in <i>A. thaliana</i> root assay, in the competitive ligand-binding assay on <i>A. thaliana</i> cytokinin receptors AHK3 and CRE1/AHK4 and finally the cytotoxicity of prepared substances was screened <i>in vivo</i> on selected cell lines (ARPE-19, BJ and HaCat).
Keywords:	<i>A. thaliana</i> , competitive ligand-binding assay, cytokinin, cytokinin glycosides, cytotoxicity, <i>N</i> -glycosylation, root bioassay.
Number of pages:	57
Number of appendices:	0
Language:	Czech

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

V Olomouci dne 11. 5. 2018

Bc. Alena Zemánková

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému vedoucímu Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho cenné rady, čas, vstřícnost a trpělivost. Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Noemi Bucharové za pomoc při biologických testech, Mgr. Zuzaně Pěkné za provedení kompetičního biotestu, výzkumnému týmu Mgr. Jiřího Vollera, Ph.D. za testy na cytotoxicitu a Mgr. Haně Omámkové za změření a zpracování HPLC/MS dat. Mé poděkování patří rovněž celému kolektivu laboratoře organické syntézy na Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná za jejich rady během práce v laboratoři. V neposlední řadě také děkuji za finanční podporu univerzitnímu grantu IGA_PrF_2018_023.

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Úvod a cíle práce.....	9
1 Cytokininy	11
1.1 Rozdělení cytokininů.....	11
2 Cukerné konjugáty	13
2.1 Metabolismus	14
2.1.1 Biosyntéza	14
2.1.2 O- a N-glykosylace	15
2.1.3 Degradace.....	17
2.1.4 Signalizace a biologická aktivita	18
2.2 Lokalizace a transport.....	20
2.3 Syntéza a biologická aktivita N-glukosidů	21
3 Materiály a metody	27
3.1 Chemikálie.....	27
3.2 Biologický materiál.....	27
3.3 Metody	27
3.4 Syntéza	29
3.4.1 Syntéza prekurzorů	29
3.4.2 Syntéza N9-glykosidů	30
3.4.3 Syntéza N3-glykosidů	32
3.4.4 Syntéza N7-glukosidu.....	33
3.5 Biologické testování.....	33
3.5.1 Kořenový test	33
3.5.2 Kompetiční cytokininový receptorový test	34
3.5.3 Cytotoxicita.....	34
4 Výsledky a diskuze	35
4.1 Syntéza	35
4.2 Testování biologické aktivity	47
5 Závěr	52
6 Seznam použité literatury	53

Seznam použitých zkratek

AHK	hybridní kinasový receptor z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AHP	histidin fosfotransferový protein z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ARPE-19	imortalizovaná buněčná linie lidského sítnicového epitelu, ATCC: CRL-2302
ARR	regulátory odpovědi z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtCKX	cytokinindehydrogenasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin
BJ	lidské kožní fibroblasty, ATCC: CRL-2522
bs	široký singlet
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
CRF	faktory cytokininové odpovědi
cZ	<i>cis</i> -zeatin
CKX	cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12)
d	dublet
dd	dublet dubletu
DCM	dichlormethan
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
DPU	<i>N,N'</i> -difenylmočovina
ekv.	ekvivalent
ENT	rovnovážné nukleosidové transportéry
ER	endoplasmatické retikulum
ESI ⁺ -MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód
FAD	flavinadenindinukleotid
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HaCat	imortalizovaná buněčná linie lidských kožních keratinocytů, RRID:CVCL_0038
HMBDP	(<i>E</i>)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin
IPT	adenylátisopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27)
<i>J</i>	interakční konstanta

Kin	kinetin
LOG	lonely guy (EC 3.2.2.n1)
lt	laboratorní teplota
m	multiplet
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
MEP	methylerythritol-4-fosfátová dráha
MS	hmotnostní spektrometrie
MS médium	Murashige a Skoog médium
MVA	mevalonátová dráha
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
PUP	purinové permeasy
s	singlet
t	triplet
td	triplet dubletu
TDZ	thidiazuron
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
UGT	uridindifosfátglykosyltransferasa
δ	chemický posun

Obecné zkratky pro cytokininové deriváty

<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin (volná báze)
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-ribosid
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin-ribosid-5'-monofosfát
<i>tZRDP</i>	<i>trans</i> -zeatin-ribosid-5'-difosfát
<i>tZRTP</i>	<i>trans</i> -zeatin-ribosid-5'-trifosfát
<i>tZ3G</i>	<i>trans</i> -zeatin-3-glukosid
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin-O-glukosid

Úvod a cíle práce

Cytokinininy jsou malé organické molekuly, strukturně odvozené od adeninu, které v rostlinách ovlivňují řadu významných vývojových a fyziologických procesů. Jelikož se zde vyskytují ve velmi nízkých koncentracích a vykazují silnou biologickou aktivitu, jsou klasifikovány jako rostlinné hormony. Hladiny jejich aktivních forem tudíž musí být velmi pečlivě regulovány, přičemž nenahraditelnou roli zde hraje glykosylace. Ke glykosylaci cytokininů může docházet na hydroxylové skupině postranního řetězce za vzniku *O*-glykosidů nebo na dusíkových atomech purinového skeletu, kdy hovoříme o *N*-glykosidech. Připojením cukerné složky, nejčastěji glukosy, dochází k inaktivaci cytokininů, která je v případě *N*7- a *N*9-glukosidů ireversibilní, zatímco u *O*- a *N*3-glukosidů byla prokázána metabolická konverze β -glukosidasou zpět na aktivní formy. Doposud publikovaná data o biologické aktivitě ukazují, že *N*7- a *N*9-glukosidy byly ve standardních cytokininových testech neaktivní oproti *N*3-glukosidům, jejichž aktivita byla srovnatelná s aktivitou odpovídající volné báze. Nebylo však jednoznačně prokázáno, zda za biologické účinky *N*3-glukosidů je zodpovědná volná báze uvolněná *in vivo* β -glukosidasou nebo jsou aktivní *per se*.

Cílem této diplomové práce bylo:

- vypracování literární rešerše na téma cytokininové cukerné konjugáty (cytokininový metabolismus) a chemická příprava cukerných konjugátů cytokininů/purinů
- syntéza a charakterizace nových cukerných konjugátů cytokininů
- biologická aktivita připravených látek

Teoretická část

1 Cytokininy

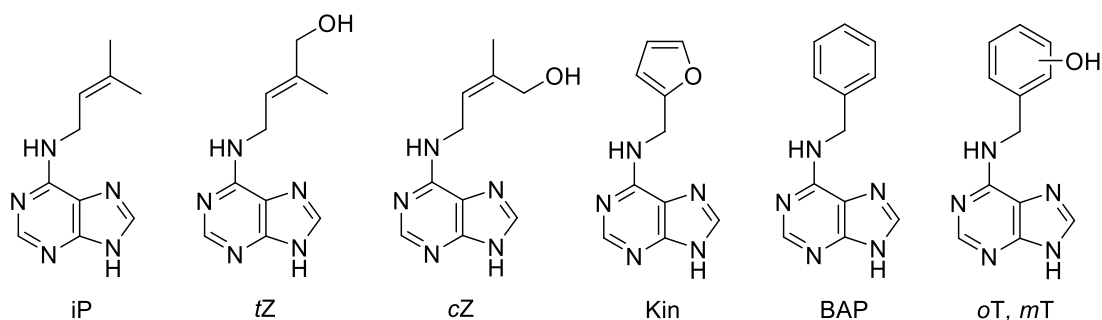
První poznatky o existenci rostlinných hormonů cytokininů pochází již z roku 1913 od rakouského rostlinného fyziologa G. Haberlandta. Haberlandt prokázal, že v přítomnosti floémové šťávy z různých druhů rostlin dochází k indukci dělení parenchymatických buněk bramboru (*Solanum tuberosum*) (Haberlandt, 1913). V polovině 20. století pak skupina vědců prof. F. Skooga hledala látku, která by byla schopna podporovat buněčné dělení neboli cytokinezi v tkáňové kultuře. Úspěšným se jim stal rok 1955, kdy se jim podařilo izolovat z autoklávované DNA sledího spermatu 6-furfurylamino-9H-purin (kinetin), který v přítomnosti auxinů podporoval cytokinezi (Miller a kol., 1955a, Miller a kol., 1955b). Z tohoto důvodu byly tyto látky nazvány cytokininy. Ačkoliv však kinetin nebyl v té době prokázán ještě jako přirozený cytokinin, byly pomocí něj definovány biologické a fyziologické účinky cytokininů.

První nativní cytokinin, *trans*-zeatin, byl získán až v roce 1961 z nezralého endospermu obilky kukuřice (*Zea mays*) (Miller, 1961). V následujících letech se pak předpokládalo, že endogenními látkami jsou pouze isoprenoidní cytokininy. Tvzení bylo vyvráceno, když byl vyizolován ze zralých listů topolu (*Populus robusta*) derivát aromatických cytokininů 6-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin (Horgan a kol., 1973).

Cytokininy jsou tedy relativně jednoduché malé organické sloučeniny tvořící jednu z nejdůležitějších skupin fytohormonů. Včetně schopnosti regulovat a stimulovat buněčné dělení mají cytokininy také vliv na klíčení semen, vývoj chloroplastů, oddálení listové senescence, inhibici kořene, apikální dominanci a odpověď rostlin na abiotický a biotický stres (Werner a Schmülling, 2009).

1.1 Rozdělení cytokininů

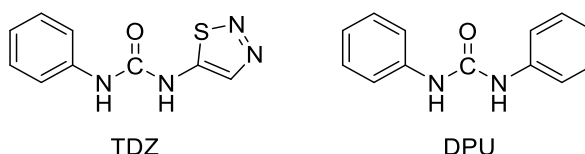
Všechny přirozeně se vyskytující cytokininy jsou z chemického pohledu *N*⁶-substituované deriváty adeninu nesoucí isoprenoidní či aromatický postranní řetězec (Mok a Mok, 2001). Mezi základní isoprenoidní cytokininy řadíme *N*⁶-isopentenyladenin (iP; 6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9H-purin) a zeatin (6-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9H-purin), který má vedlejší řetězec zakončen hydroxyskupinou, a vyskytuje se ve dvou isomerických formách *cis*- (*cZ*) a *trans*- (*tZ*). Dále do této skupiny patří dihydrozeatin (DHZ; 6-[(3-methylbutyl)amino]-9H-purin), ačkoliv má nasycený 3-methylbutylový vedlejší řetězec (Obr. 1).



Obr. 1. Chemické struktury vybraných přirozených cytokininových bází. Zleva první tři látky reprezentují isoprenoidní a poslední tři aromatické cytokininy. iP – *N*⁶-isopentenyladenin; tZ – *trans*-zeatin; cZ – *cis*-zeatin; Kin – kinetin; BAP – *N*⁶-benzyladenin; oT, mT – *ortho*- nebo *meta*-topolin.

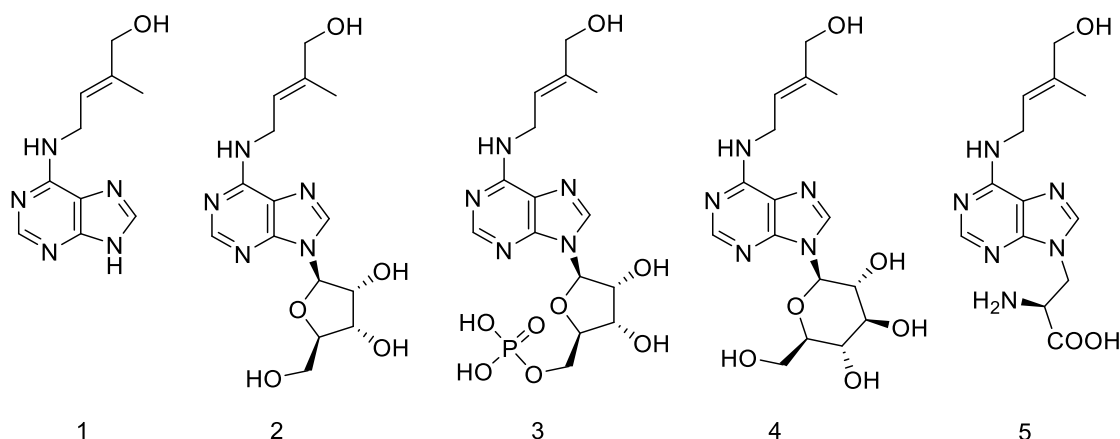
Skupinu aromatických cytokininů zastupuje kinetin s furan-2-ylmethylovým zbytkem (Kin; 6-(furfurylamino)-9*H*-purin) a *N*⁶-benzyladenin (BAP, 6-(benzylamino)-9*H*-purin) spolu s topoliny. Topoliny jsou látky, jež byly izolovány z topolu (*Populus canadensis*) a mají benzylový kruh hydroxylovaný v *ortho*- či *meta*- pozici, konkrétně se jedná o *ortho*-topolin (oT, 6-[(2-hydroxybenzyl)amino]-9*H*-purin) a *meta*-topolin (mT, 6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9*H*-purin).

Taktéž existují syntetické látky s cytokininovou aktivitou, mezi které patří sloučeniny odvozené od fenyльмоčoviny. Hlavními představiteli jsou thidiazuron (TDZ, *N*-fenyl-*N'*-(1,2,3-thidiazol-5-yl)močovina) a *N,N'*-difenyльмоčovina (DPU) (Obr. 2) (Ricci a Bertolletti, 2009).



Obr. 2. Chemické struktury vybraných syntetických cytokininových derivátů. TDZ - thidiazuron a DPU - *N,N'*-difenyльмоčovina.

Přirozené cytokininy s purinovým skeletem se v rostlinné buňce vyskytují ve formě volných bází, nukleosidů a mono-, di- či trinukleotidů. Dále mohou vznikat v rámci metabolismu konjugáty se sacharidy, aminokyselinami, kyselinou octovou či deriváty s methylsulfanylovou skupinou (Obr. 3). Připojením L-alaninu do *N*⁹-pozice zeatinu či DHZ vzniká kyselina lupinová, respektive dihydrolupinová (Entsch a kol., 1983). Na druhou stranu 2-methylsulfanylové deriváty cytokininů byly identifikovány u několika druhů bakterií a rostlin (Tarkowski a kol., 2010). Tyto sloučeniny jsou součástí tRNA, kde je pravděpodobně jejich úkolem stabilizovat průběh translace a po degradaci tRNA dochází k jejich uvolňování do buněk.

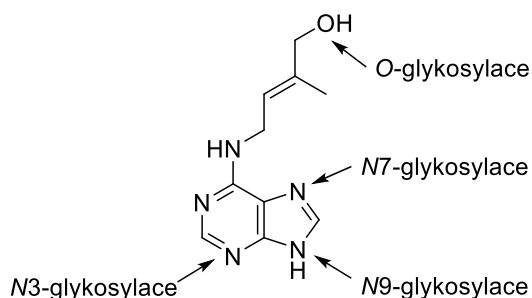


Obr. 3. Různé formy cytokininů ukázané na *trans*-zeatinu. 1 – volná báze; 2 – nukleosid (ribosid); 3 – nukleotid (ribosid-5'-monofosfát); 4 – *N*9-glukosid; 5 – kyselina lupinová.

2 Cukerné konjugáty

Cukerné konjugáty cytokininů rozdělujeme podle připojení cukerné jednotky na *O*- a *N*-glykosidy (Obr. 4). *O*-glykosidy vznikají vazbou β -D-glukosy nebo β -D-xylosy na terminální hydroxyskupinu isopentenylového postranního řetězce. Připojením cukerné složky dochází k dočasné inaktivaci cytokininů a vytvoření transportní a zásobní formy (Bajguz a Piotrowska, 2009).

Další skupinou jsou *N*-glykosidy, k jejichž vzniku dochází konjugací sacharidové složky na dusíkové atomy *N*3, *N*7 a *N*9 purinového skeletu. β -D-glukosa se převážně váže do polohy *N*7, *N*9 a také v menší míře do *N*3 pozice. V případě vzniku *N*7- a *N*9-glukosidů u cytokininů jako *tZ*, *DHZ* či *iP* dochází obvykle k jejich ireversibilní inaktivaci. Dusíkový atom v poloze 9 může být mimo jiné také modifikován pomocí β -D-ribosy nebo β -D-ribosa-5'-mono(di-, tri-)fosfátů, přičemž ribosidy i cytokininové nukleotidy představují nepostradatelnou složku v *de novo* biosyntéze isoprenoidních cytokininů (Frébort a kol., 2011).

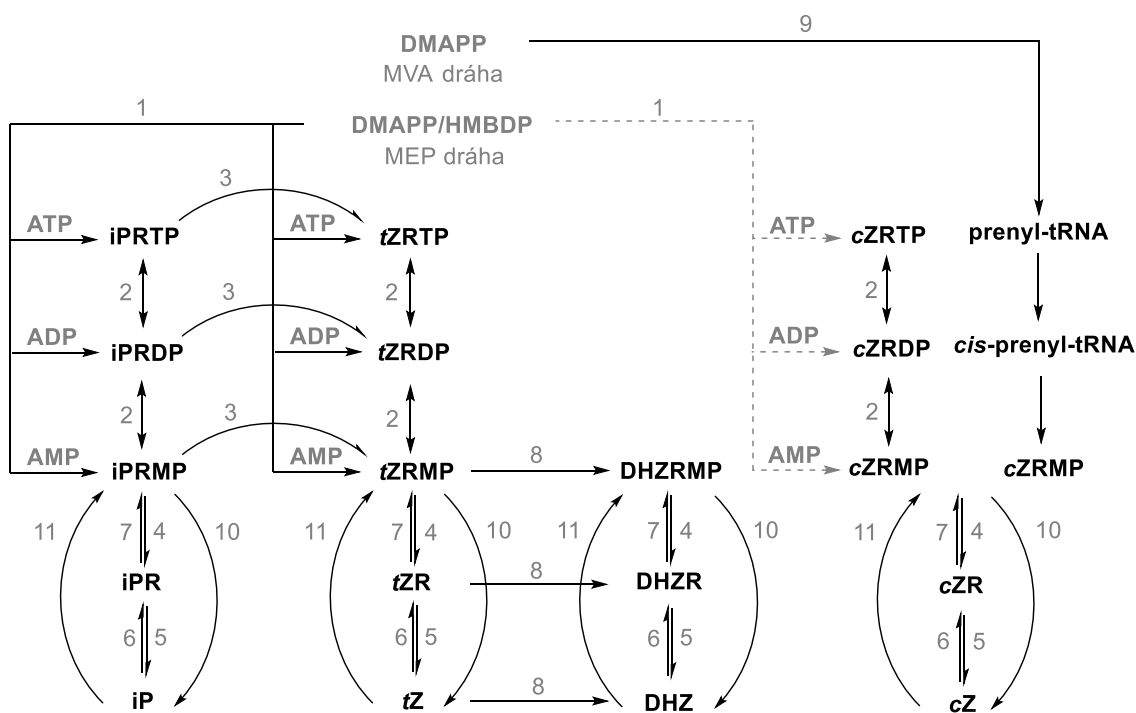


Obr. 4. Možné pozice vazby cukerné jednotky na *trans*-zeatin.

2.1 Metabolismus

2.1.1 Biosyntéza

De novo biosyntéza isoprenoidních cytokininů je tvořena mnoha enzymatickými reakcemi a využívá produkty dvou metabolických drah, methylerythritol-4-fosfátové (MEP) či mevalonátové (MVA). MEP dráha se nachází v plastidech a její produkty dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) či (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldifosfát (HMBDP) jsou zde využívány jako donory prenylového řetězce při biosyntéze iP, tZ a pravděpodobně také cZ (Spíchal, 2012).



Obr. 5. Schéma biosyntézy isoprenoidních cytokininů. 1 – adenylatisopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27); 2 – fosfatasa (EC 3.1.3.1), 3 – cytochrom P450 monooxygenasa (CYP731A1 a CYP731A2), 4 – 5'-ribonukleotidfosfohydrolasa (EC 3.1.3.5); 5 – adenosinnukleosidasa (EC 3.2.2.7); 6 – purinnukleosidfosforylasa (EC 2.4.2.1); 7 – adenosinkinasa (EC 2.7.1.20); 8 – zeatinreduktasa (EC 1.3.1.69); 9 – tRNA-specifická isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.8); 10 – nukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa, tzv. *lonely guy* (LOG, EC 3.2.2.n1); 11 – adeninfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.7); MVA – mevalonátová dráha; MEP – methylerythritol-4-fosfátová dráha; 4DMAPP – dimethylallylpyrofosfát; HMBDP – (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldifosfát; iP – *N*⁶-isopentenyladenin; tZ – *trans*-zeatin; cZ – *cis*-zeatin; DHZ – dihydrozeatin; -R – ribosid; -RMP/RDP/RTP – ribosid-5'-mono/di/trifosfát, upraveno podle Spíchal, 2012 .

Prvním krokem biosyntézy cytokininů je navázání isopentenylového řetězce do polohy *N*₆ na adeninové nukleotidy (AMP/ADP/ATP) za vzniku isopentenyladenosin-5'-fosfátů (iPRMP/iPRDP/iPRTP). Tato *N*-prenylační reakce probíhá za katalýzy adenylatisopentenyltransferasy (IPT, EC 2.5.1.27) a vzniklé nukleotidy následně podléhají defosforylaci prostřednictvím fosfatasy (EC 3.1.3.1). Dále

následuje přeměna monofosfátů 5'-ribonukleotidfosfohydrolasou (EC 3.1.3.5) na příslušné ribosidy, které jsou vzápětí převedeny pomocí adenosinnukleosidasy (EC 3.2.2.7) na aktivní formy cytokininů. Součástí těchto biosyntetických drah je také cytokinin-specifický enzym nukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa, tzv. *lonely guy* (LOG, EC 3.2.2.n1), která je schopna hydrolyzovat ribosid-5'-monofosfát za vzniku biologicky aktivní volné báze (Kurakawa a kol., 2007, Kuroha a kol., 2009).

Alternativní cestou k biosyntéze tZ je oxidace vedlejšího isoprenoidního řetězce iP nukleotidů. Tato reakce je katalyzovaná cytochrom P450 monooxygenasami (CYP731A1 a CYP731A2) a vede ke vzniku odpovídajících tZ nukleotidů. Vznik DHZ a jeho derivátů je spojen s činností zeatinreduktasy (EC 1.3.1.69), která katalyzuje redukci násobné vazby v postranním řetězci tZ, tZR a tZRMP.

Tvorba cZ je taktéž pravděpodobně umožněna několika cestami. Dominantní dráhou pro jeho biosyntézu je degradace prenylované tRNA (Miyawaki a kol., 2006). Donorem prenylového řetězce je DMAPP, který je poskytován MVA dráhou v cytosolu, a reakce s tRNA probíhá za katalýzy tRNA-IPT (EC 2.5.1.8). Po specifické *cis*-hydroxylaci a při následné degradaci tRNA vzniká *cis*-zeatin-ribosid-5'-monofosfát, který je dále enzymaticky převáděn přes cZ ribosid na volnou bázi. Další možností pro vytvoření cZ bylo donedávna izomerace zeatinisomerasou, která měla převádět zeatin z formy *trans* na *cis* (Bassil a kol., 1993). Ovšem tento způsob vzniku byl v roce 2017 vyvrácen, jelikož se zjistilo, že se jedná o neenzymatický proces (Hluska a kol., 2017).

2.1.2 O- a N-glykosylace

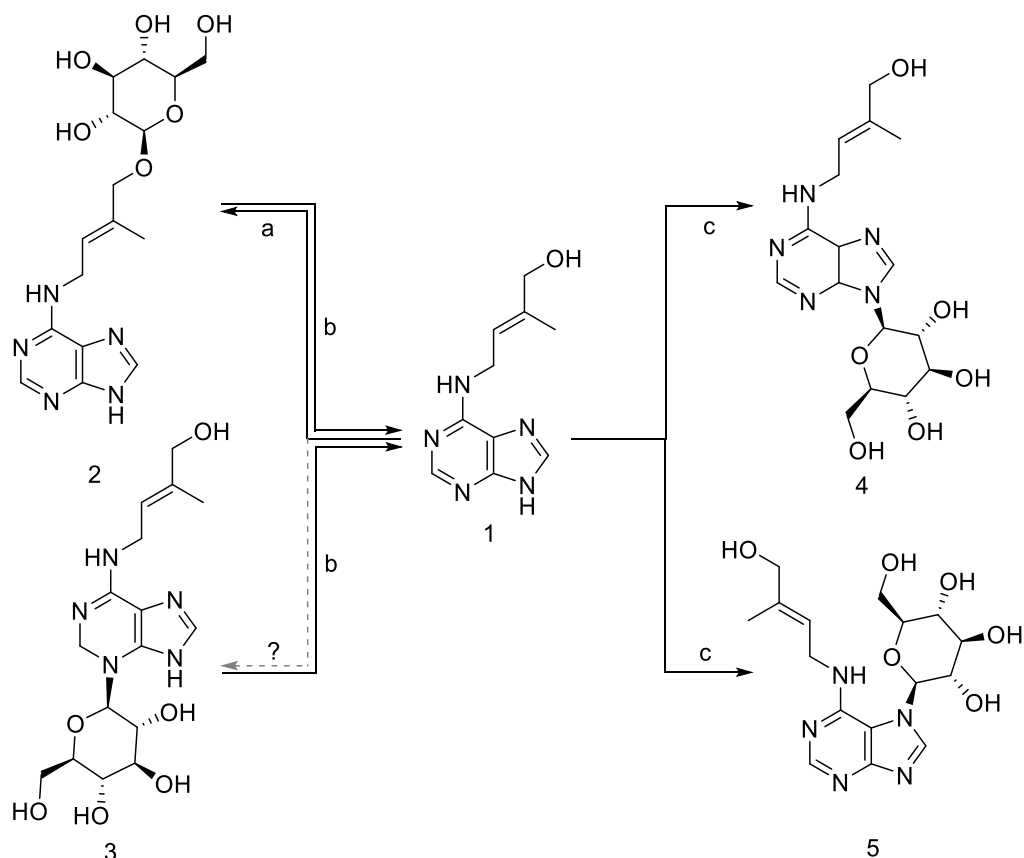
Hladina volnýchází cytokininů jakožto aktivních signálních látek musí být v rostlinách neustále pečlivě regulována. Primárním regulačním procesem je tvorba cukerných konjugátů, přičemž tento proces je obecným regulačním mechanismem i pro další rostlinné hormony a nejčastěji konjugovaným sacharidem je glukosa (Piotrowska a Bajguz, 2011).

Glukosylace v rostlinách obvykle zajišťují uridindifosfátglykosyltransferasy (UGT) využívající jako donor glukosy její aktivovanou formu v podobě UDP-glukosy. V *A. thaliana* bylo identifikováno celkem pět UGT (UGT76C1, UGT76C2, UGT85A1, UGT73C1 a UGT73C5) schopných katalyzovat glykosylaci malých molekul jako jsou cytokininy (Hou a kol., 2004). Později však bylo zjištěno, že pouze tři z nich jsou cytokinin-specifické (UGT76C1, UGT76C2 a UGT85A1) (Wang a kol., 2011). UGT76C1 a UGT76C2 vykazují N-glukosyltransferasovou aktivitu vůči běžným cytokininům jako tZ, cZ, iP a BAP, přičemž vznikají oba isomery N7 a N9 (Hou a kol., 2004). Ve větší míře však vznikají N7-glukosidy. Původ N3-glukosidů nebyl doposud

objasněn, jelikož žádná z testovaných 105 rekombinantních glykosyltransferas v *A. thaliana* nebyla schopna připojit glukosu do pozice N3. UGT85A1 je oproti tomu známa jako *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa, které je schopna však glukosylovat kromě *tZ* i *cZ* a DHZ (Hou a kol., 2004, Jin a kol., 2013).

S cytokininy jako *tZ* či DHZ je kromě glukosy schopna vytvářet *O*-konjugáty také xylosa, ve fazolu obecném (*Phaseolus vulgaris*) za účasti zeatin-*O*-xylosyltransferasy (EC 2.4.2.40) a ve fazolu měsíčním (*Phaseolus lunatus*) pomocí *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasy (EC 2.4.1.203) (Dixon a kol., 1989, Martin a kol., 1999).

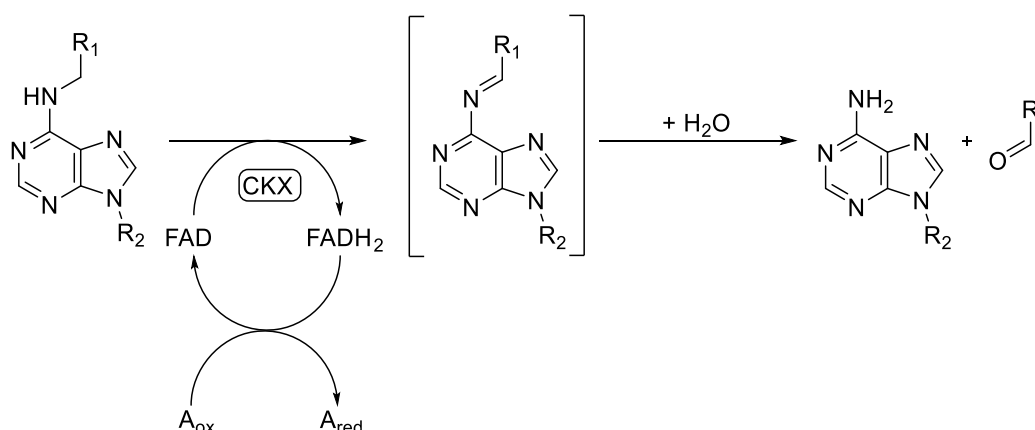
Jak již bylo uvedeno *O*-glukosylací dochází ke vzniku zásobních forem cytokininů, které mohou být opět snadno konvertovány pomocí β -glukosidasy (EC 3.2.1.21) na biologicky aktivní volné báze (Brzobohatý a kol., 1993). β -glukosidasa je také schopna hydrolyzovat N3-glukosidy, což bylo demonstrováno u 3-glukosidů odvozených od kinetinu a BAP (Letham a kol., 1975). Na druhou stranu vznikem N7- a N9-glukosidů dochází k nezvratné inaktivaci, jelikož jsou rezistentní vůči β -glukosidase.



Obr. 6. Inaktivace *trans*-zeatinu v rostlinách tvorbou cukerných konjugátů s β -D-glukosou. 1 – *trans*-zeatin; 2 – *trans*-zeatin-*O*-glukosid; 3 – *trans*-zeatin-3-glukosid; 4 – *trans*-zeatin-9-glukosid; 5 – *trans*-zeatin-7-glukosid; a – *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa (UGT85A1); b – β -glukosidasa (EC 3.2.1.21); c – N-glukosyltransferasa (UGT76C1 a UGT76C2).

2.1.3 Degradace

Degradace cytokininů je ireversibilní proces, který využívá specifického enzymu cytokinindehydrogenasy (CKX, EC 1.5.99.12). Aktivita CKX byla poprvé popsána u kalusové kultury tabáku (*Nicotiana tabacum*) a po mnoho let se předpokládalo, že se jedná o oxidasu (Pačes a kol., 1971). Ovšem tvrzení bylo pozdějšími analýzami reakčního mechanismu vyvráceno a enzym byl překlasifikován jako dehydrogenasa (Galuszka a kol., 2001). Mechanismus degradace je založen na oxidativním odštěpení *N*⁶-isoprenoidního vedlejšího řetězce za vzniku derivátu adeninu a příslušného aldehydu (Obr. 7). Součástí CKX je kovalentně vázaný FAD kofaktor, který je během reakce redukován na FADH₂. Přirozený elektronový akceptor CKX dosud nebyl jednoznačně identifikován, ale enzymatickou aktivitu zvyšují látky chinoidní struktury a volné radiály vytvořené činností laktasy a peroxidasy z DIMBOA a koniferonu (Frébortová a kol., 2004)



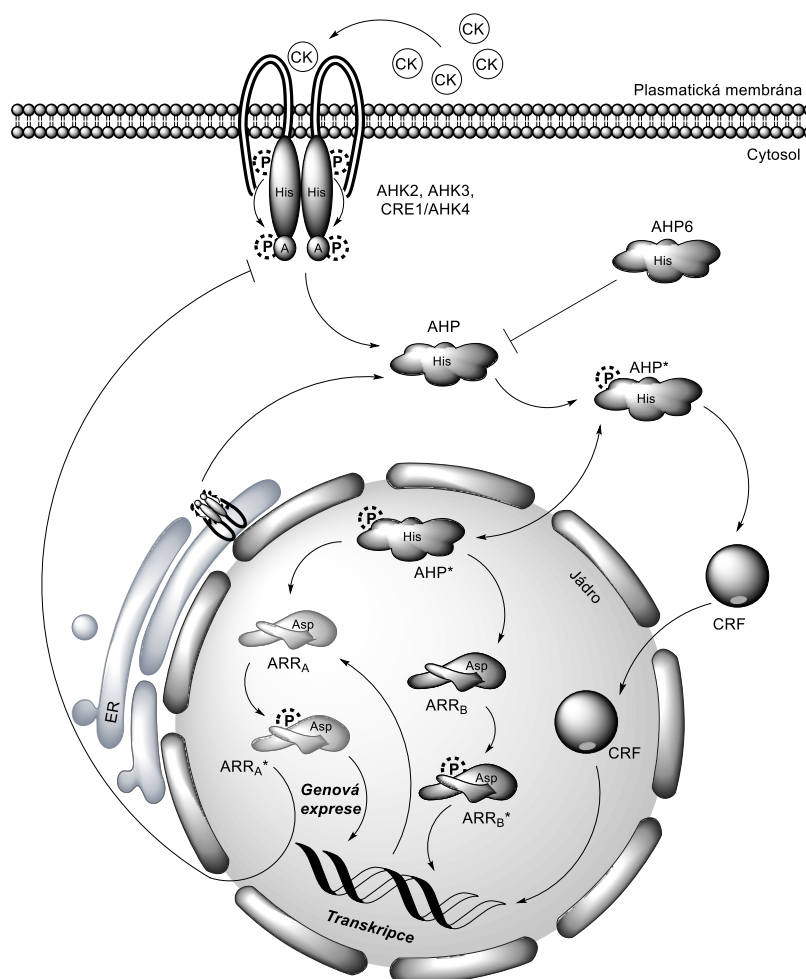
Obr. 7. Reakční schéma degradace cytokininu pomocí cytokinindehydrogenasy (EC 1.5.99.12) na adenin a příslušný aldehyd (Frébortová a kol., 2004).

V rostlinách se CKX vyskytuje v několika isoformách, přičemž u *A. thaliana* bylo identifikováno celkem sedm funkčních isoformů AtCKX1-AtCKX7 (Galuszka a kol., 2007). AtCKX7 se nachází v cytosolu, zatímco AtCKX6, AtCKX5, AtCKX4 a AtCKX2 v apoplastu a AtCKX3 společně s AtCKX1 ve vakuole. Všechny formy AtCKX upřednostňují jako substrát isoprenoidní cytokininy před aromatickými, ale jednotlivé isoenzymy se dále liší v substrátové specifitě. Zatímco AtCKX2 a AtCKX4 přednostně štěpí volné báze, AtCKX1 a AtCKX7 degradují *N*9-glukosidy, tak AtCKX3 preferují mononukleotidy. Stejně jako *O*-glukosidy, tak i *N*7-glukosidy, DHZ a cZ jsou vůči AtCKX rezistentní.

2.1.4 Signalizace a biologická aktivita

Cytokininový signál je v rostlinné buňce přenášen a zpracováván pomocí modifikované dvousložkové His-Asp fosforylační signální dráhy. Jejími klíčovými složkami u *A. thaliana* jsou hybridní kinasové receptory (AHK), histidin fosfotransferové proteiny (AHP), regulátory odpovědi (ARR) a také faktory cytokininové odpovědi (CRF) (Keshishian a Rashotte, 2015).

Mechanismus cytokininové signální kaskády spočívá v navázání cytokininu na vazebnou CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular) doménu AHK, která je pravděpodobně lokalizována jak na extracelulární straně plasmatické membrány, tak i v lumen endoplasmatického retikula (Caesar a kol., 2011, Kim a kol., 2006). Po navázání ligandu na receptor dochází ke konformačním změnám receptoru, jeho dimerizaci a následné autofosforylaci. Signál je poté přenesen na mobilní cytoplasmatické AHP1-AHP5, které jsou vzápětí translokovány do jádra, kde fosforylují ARRs typu A nebo B.



Obr. 8. Modifikovaný model signální kaskády cytokininů u *A. thaliana*. CK – cytokinin; P – fosfát; His – histidin; Asp, A – aspartát; AHK – histidin kinasový receptor; AHP – histidin fosfotransferové proteiny; ARR_A – regulátor odpovědi typu A; ARR_B – regulátor odpovědi typu B; CRF – faktory cytokininové odpovědi; ER – endoplasmatické retikulum (Keshishian a Rashotte, 2015).

Aktivované ARR typu B regulují genovou expresi ARR typu A a mnoha jiných genů zapojujících se například do regulace vývoje kořene a stonku, listové expanze či senescence. Na druhou stranu fosforylované ARR typu A ovlivňují regulaci cirkadiálních rytmů či funkci fytochromu, a mimo jiné také fungují jako negativní zpětná vazba při přenosu cytokininového signálu na receptor (Ishida a kol., 2008). Dalším negativní regulátorem cytokininové signální dráhy je také AHP6. Nedávno objevené CRF jsou doplňkovou součástí cytokininové signální kaskády. Po aktivaci AHP jsou translokovány z cytosolu do jádra, kde fungují jako transkripční faktory a ovlivňují expresi genů obdobných jako ARR typu-B (To a Kieber, 2008).

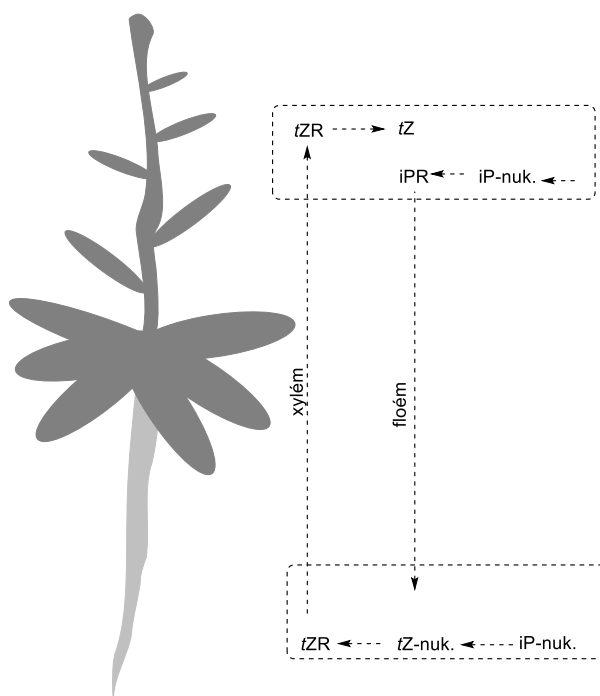
V současné době jsou známy u *A. thaliana* tři hybridní kinasové receptory CRE1/AHK4, AHK2 a AHK3 (Hwang a kol., 2002, Inoue a kol., 2001, Suzuki a kol., 2001). Schopnost cytokininových receptorů AHK3 a CRE1/AHK4 interagovat s cytokininy byla ověřena pomocí kompetičního ligand-vazebného testu s 2-[³H]tZ a v *in vivo* ARR5::*GUS* receptorovém testu (Tab. 1). Z analýz vyplývá, že největší afinitu k receptoru a schopnost aktivovat signální dráhu vykazovaly volné báze (tZ, iP) a slaběji jejich ribosidy. Nejaktivnějším aromatickým cytokininem byl mT následovaný BAP. Zatímco testované O- a N-cukerné konjugáty byly zcela neaktivní (Romanov a kol., 2006, Spíchal a kol., 2004).

Tab. 1. Substrátová specifita cytokininových receptorů AHK3 a CRE1/AHK4. ^aSchopnost cytokininu se vázat na receptor CRE/AHK4 a AHK3 (Romanov a kol., 2006). ^bRelativní aktivita různých cytokininů změřena pomocí *in vivo* ARR5::*GUS* receptorového testu (Spíchal a kol., 2004). tZ – *trans*-zeatin; tZR – *trans*-zeatinribosid; tZOG – *trans*-zeatin-O-glukosid; tZ7G – *trans*-zeatin-7-glukosid; tZ9G – *trans*-zeatin-9-glukosid; iP – *N*⁶-isopentenyladenin; iPR – *N*⁶-isopentenyladenosin; Kin – kinetin; KinR – kinetinribosid; BAP – *N*⁶-benzyladenin; BAPR – *N*⁶-benzyladenosin; mT – *meta*-topolin; mTR – *meta*-topolin-ribosid; nd - nestanoveno.

	Zdánlivá disociační konstanta K_D [nM] ^a		ARR5:: <i>GUS</i> relativní aktivita [%] ^b	
	CRE1/AHK4	AHK3	CRE1/AHK4	AHK3
tZ	3,9	1,3	100,0	100,0
tZR	50	15	0,0	92,5
tZOG	nd	nd	0,0	0,0
tZ7G	-	-	0,0	0,0
tZ9G	-	-	0,0	0,0
iP	17	150	89,2	72,9
iPR	130	≥2300	10,0	10,1
Kin	-	-	2,5	23,8
KinR	-	-	0,0	5,0
BAP	300	1050	7,7	23,6
BAPR	-	-	0,0	4,0
mT	-	-	28,6	79,8
mTR	-	-	0,0	6,3

2.2 Lokalizace a transport

Cytokininy jsou v rostlinách syntetizovány v místech aktivního dělení – kořenové špičce a vrcholových pupenech, a jelikož nepůsobí pouze lokálně, musí být do místa působení přemístěny (Kudo a kol., 2010). Transport probíhá pomocí vodivých pletiv, přičemž *tZ* vznikající v kořenech je do vzrostných vrcholů transportován xylémem ve formě ribosidu, tak *iP* vytvářející se ve vrcholových pupenech je distribuován pomocí floému (Obr. 9).

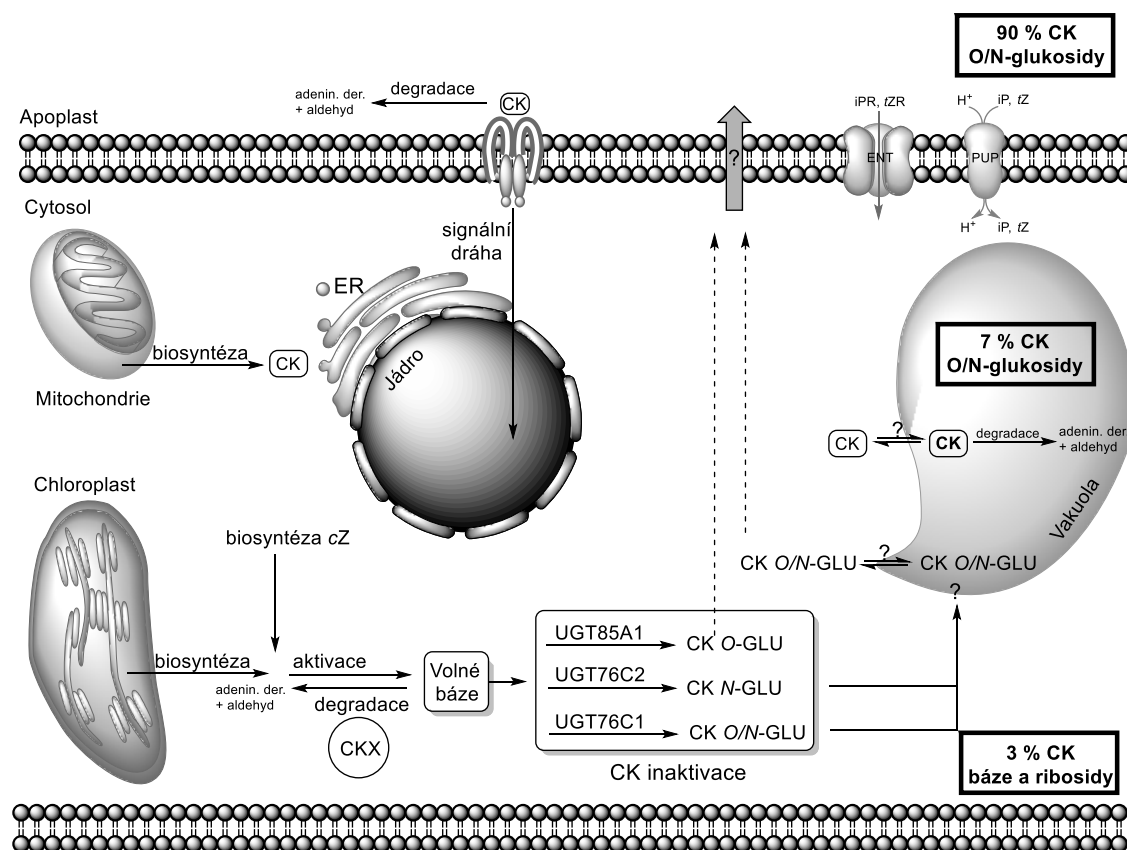


Obr. 9. Transport *tZ* a *iP* v rostlině na dlouhé vzdálenosti. *iP*-nuk. – *N*⁶-isopentenyladeninové nukleotidy; *tZ*-nuk. – *trans*-zeatinové nukleotidy (Kudo a kol., 2010).

Cytokininový transport přes plasmatickou membránu je v rámci *A. thaliana* umožněn pravděpodobně dvěma rodinami nespecifických nízkoafinitních transportních proteinů, a to purinovými permeasami (PUP) a rovnovážnými nukleosidovými transportéry (ENT) (Obr. 10). PUP jsou malé hydrofobní membránové proteiny, které transportují cytokininy symportem s protony. Transport *tZ* a *iP* je umožněn dvěma proteiny (AtPUP1 a AtPUP2) z rodiny PUP (Bürkle a kol., 2003). Zatímco jejich ribosidy jsou přemísťovány pomocí rovnovážných nukleosidových transportérů, konkrétně ENT6, který preferuje *iP*-typ ribosidů (Hirose a kol., 2008).

V roce 2016 byla provedena studie na stanovení hladin cytokininů v listech, protoplastech a vakuolách u 45 dní starých rostlin *A. thaliana* (Jiskrová a kol., 2016). V rámci tohoto experimentu bylo zjištěno, že z celkového počtu cytokininů se v extracelulárním prostoru nachází 90 % z nich, dále 3 % v intracelulárním prostoru

mimo vakuoly a zbývajících 7 % ve vakuolách. Z hlediska jednotlivých forem cytokininů v extracelulárním prostoru převažují *N*-glykosidy (*tZ* a *iP*) a v menší míře se zde vyskytují také *O*-glykosidy (*tZ*) a nukleotidy (*iP*). Uvnitř buněk tvořili majoritu ribosidy (*cZ* a *iP*) a minoritní podíl nukleotidy isoprenoidních cytokininů. Ve vakuolách byly opět nejvíce zastoupeny *N*-glykosidy (*tZ*, *iP* a *DHZ*) a *O*-glykosidy (*cZ* a *tZ*).

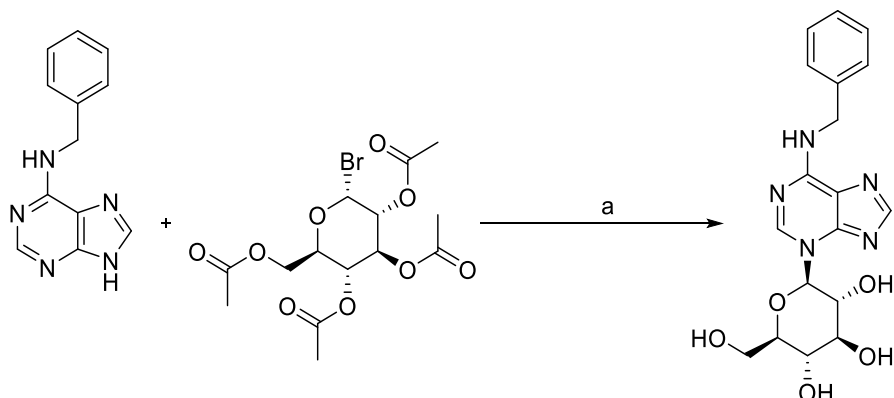


Obr. 10. Schéma distribuce cytokininů a jejich metabolitů v listech *A. thaliana*. CK – cytokininy; CKX – cytokininidehydrogenasa (EC 1.5.99.12); *cZ* – *cis*-zeatin; ER – endoplasmatické retikulum; *iP* – *N*⁶-isopentenyladenin; *iPR* – *N*⁶-isopentenyladenosin; *tZ* – *trans*-zeatin; *tZR* – *trans*-zeatinribosid (Šmehilová a kol., 2016).

2.3 Syntéza a biologická aktivita *N*-glukosidů

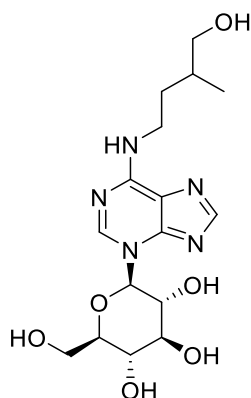
Prvním objeveným konjugátem cytokininů s cukernou jednotkou připojenou do pozice *N*3 byl 6-benzylaminopurin-3-β-D-glukopyranosid. Tento *N*3-glukosid byl vyizolován jako minoritní forma společně s *N*7- a *N*9-glukosidy ze sazenic ředkve seté (*Raphanus sativus*), kterým byly odstraněny kořeny, a které byly kultivovány s exogenně dodaným BAP (Letham a kol., 1975). Izolovaný *N*3-glukosid byl identifikován na základě dat z hmotnostní a UV-VIS spektrometrie. Jeho struktura byla dále potvrzena porovnáním dat se synteticky připraveným *N*3-glukosidem. Reakce probíhala zahříváním BAP s α-D-tetra-*O*-acetylglukopyranosylbromidem při 100 °C v *N,N*'-dimethylformamidu

po dobu dvaceti hodin. Chráncí skupiny (acetyly) byly následně odstraněny vymícháním v methanolickém amoniaku (Obr. 11).



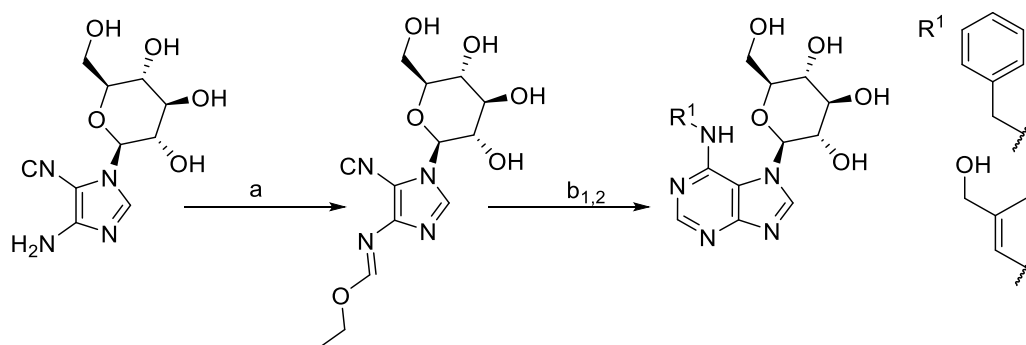
Obr. 11. Syntéza 6-benzylaminopurin-3-β-D-glukopyranosidu. a – DMF - *N,N'*-dimethylformamid; 100 °C, 20 h, methanolický amoniak.

Na rozdíl od *N7*- či *N9*-isomerů vykazoval *N3*-glukosid v ředkvičkovém biotestu větší schopnost podporovat růst odštířezného kotyledonu a nižší stabilitu vůči β-glukosidase. Dále byl při obdobném experimentu na sazenicích ředkve seté (*Raphanus sativus*), které byly kultivovány s radioaktivně značeným (±)-8-[¹⁴C]DHZ, pozorován kromě *N9*- a *N7*-isomerů i vznik dihydrozeatin-3-*D*-glukopyranosidu (Obr. 12) (McGaw a kol., 1984).



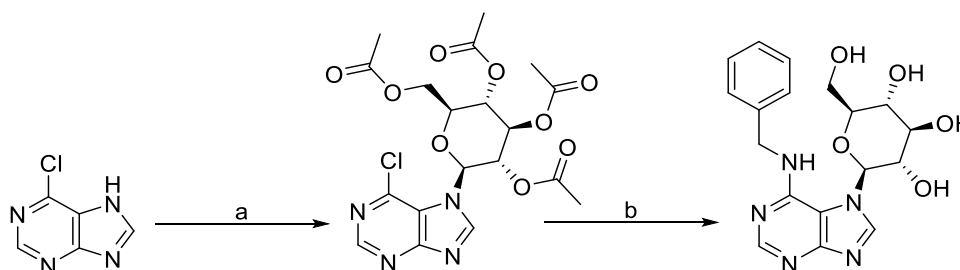
Obr. 12. Struktura dihydrozeatin-3-β-D-glukopyranosidu.

N7-glukosidy odvozené od BAP a zeatinu, jenž je známý jako rafanatin, byly poprvé úspěšně nasyntetizovány v roce 1978. V rámci dané publikace byly zmíněny tři metody, přičemž jednou z nich byla cyklizace pyrimidinového kruhu reakcí 4-amino-5-kyano-1-(tetra-*O*-acetyl-β-*D*-glukopyranosyl)imidazolu s diethoxymethylacetátem za refluxu a následnou substitucí v poloze C6 mícháním s příslušným aminem v nadbytku (Obr. 13) (Cowley a kol., 1978).



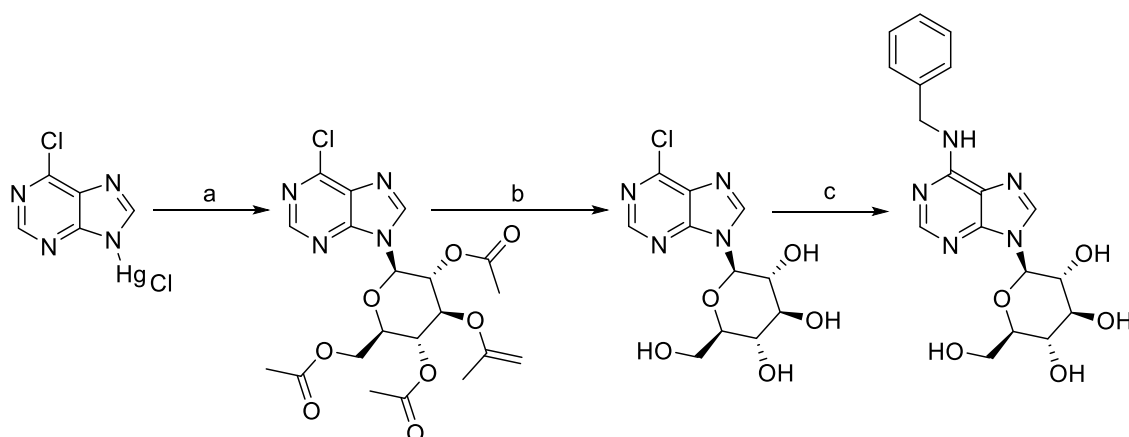
Obr. 13. První metoda přípravy 6-benzylaminopurin-7-β-D-glukopyranosidu a 6-zeatin-7-β-D-glukopyranosidu. a – diethoxymethylacetát, reflux, 5 h; b₁ – MeOH, benzylamin, lt; b₂ – MeOH, (E)-4-amino-2-methylbut-2-en-1-ol acetát, Et₃N, lt.

Druhou metodou přípravy 6-benzylaminopurin-7-β-D-glukopyranosidu byla rovněž dvoukroková syntéza. Prvním krokem byla reakce 6-chlorpurinu s acetobromglukosou za použití dipolárního rozpouštědla propylen karbonátu a uhličitanu draselného jako báze. Vzniklý 6-chlorpurin-7-β-D-tetra-O-acetylglukopyranosid byl následně chromatograficky oddělen od přítomného N9-isomeru. Reakcí s nadbytkem benzylaminu byl mícháním za laboratorní teploty připraven výsledný produkt (Obr. 14).



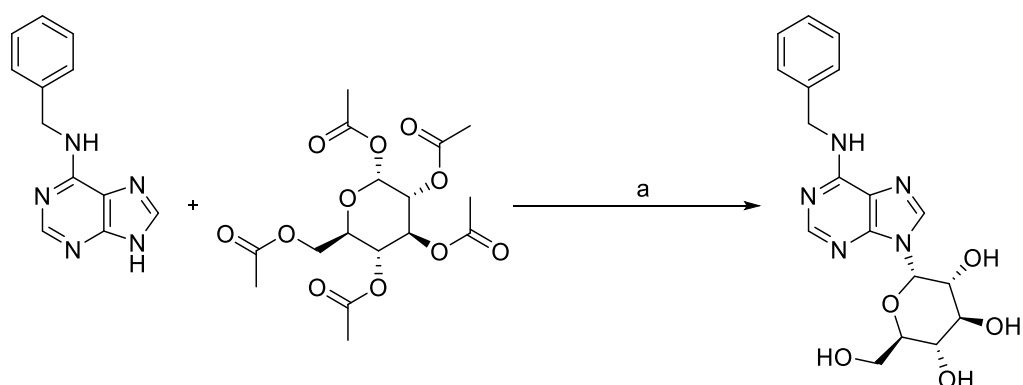
Obr. 14. Druhá metoda přípravy 6-benzylaminopurin-7-β-D-glukopyranosidu. a – acetobromglukosa, uhličitán draselný, propylen karbonát, 24 h; b – benzylamin, 48 h, ethanol, 3 h.

Ve stejném roce byl také připraven 6-benzylaminopurin-9-β-D-glukopyranosid. Výchozí sloučeninou byl 6-chlor-9-chlormerkuripurin, ke kterému byla přikapána acetobromglukosa v xylenu za vzniku 6-chlorpurin-9-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosidu, jenž byl následně míchán v methanolickém amoniaku při 0 °C. Posledním krokem pak byla reakce vzniklého produktu s benzylaminem v butan-1-olu za refluxu (Obr. 15).



Obr. 15. První metoda přípravy 6-benzylaminopurin-9-β-D-glukopyranosidu. a – acetobromglukosa, xylen, reflux, 2 h; b - NH_3 v MeOH, 0 °C, 3-5 h; c - benzylamin, butan-1-ol, reflux, 1 h.

Další možnou reakcí, kterou byl připraven BAP glukosylovaný v pozici *N*9, je přímá konjugace 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-β-D-glukopyranosy s BAP za použití bis-(*p*-nitrofenyl)hydrogenfosfátu a následná deacetylace pomocí methanolického amoniaku (Obr. 16) (Hashizume a Yoshida, 1976).



Obr. 16. Druhá metoda přípravy 6-benzylaminopurin-9-β-D-glukopyranosidu. a – bis-(*p*-nitrofenyl)hydrogenfosfát, 190 – 200 °C, 45 min; NH_3 v MeOH, 0 °C.

Biologická aktivita *N*3-, *N*7- a *N*9- BAP-glukosidů byla zjišťována v amarantovém testu, který je založen na indukcii biosyntézy betacyaninu v odstřížených kotyledonech laskavce (*Amaranthus tricolor*) kultivovaných ve tmě (Letham a kol., 1983). *N*7-glukosid byl ve všech měřených koncentracích zcela neaktivní, zatímco *N*9-glukosid vykazoval mírné zvýšení biologické aktivity až při nejvyšší testované koncentraci (cca 70 μmol/l). Oproti tomu *N*3-glukosid byl aktivní již při koncentraci 0,1 μmol/l, přičemž v koncentraci vyšší než 10 μmol/l byla jeho aktivita větší než u BAP.

Dále byl studován vliv *N*-glukosidů na fotosyntetická barviva. V senescenčních testech u listových segmentů ovsa setého (*Avena sativa*) a nezralé ředkve seté (*Raphanus sativus*) na zpomalení degradace chlorofylu, a také na indukcii biosyntézy

chlorofylu v kotyledonech okurky seté (*Cucumis sativus*) (Gasque, 1982, Letham a kol., 1983). Aktivita *N*3-glukosidu byla v senescenčních testech téměř srovnatelná s BAP na rozdíl od *N*7-glukosidu, jenž byl zcela neaktivní. *N*9-glukosid byl taktéž neaktivní ve všech testech, kromě biotestu na listových segmentech ředkve, kdy vykazoval podobnou aktivitu jako BAP.

Experimentální část

3 Materiály a metody

3.1 Chemikálie

Benzylamin, chlorid cíničitý, deuterovaný dimethylsulfoxid, β -D-galaktosa, β -D-glukosa a MES hydrát byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Chloroform, triethylamin, hydroxid sodný, methanol a pyridin byly dodány z firmy Penta. Ethyl-acetát, petrolether, propan-1-ol, hydrogenuhličitan sodný a bezvodý síran sodný byly zakoupeny od firmy Lach:NER. Od firmy VWR byly použity dichlormethan, deuterovaný chloroform, diethylether a *N,N'*-dimethylformamid. 7 mol/l amoniak v methanolu a dimethylsulfoxid byl zakoupen od firmy Acros Organics, furfurylamin od firmy Fluka, 2,6-dichlor-9*H*-purin od firmy Olchemim s.r.o, 33% bromovodík v kyselině octové od firmy Riedel-de-Haën, Murashige a Skoog základní směs solí (MS soli) a rostlinný agar od firmy Duchefa Biochemistry B.V., acetonitril a sacharosa od firmy Merck. Některé výchozí aminy jako 3-(aminomethyl)fenol, 3-methoxybenzylamin hydrochlorid, 3-methylbut-2-en-1-amin hydrochlorid a standardy cytokininů *N*⁶-benzyladenin, 2-chlor-*N*⁶-benzyladenin, 2-chlorkinetin, 2-chlor-*N*⁶-isopentenyladenin, 2-chlor-*meta*-methoxytopolin, 2-chlor-*meta*-topolin byly připraveny v oddělení Chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná.

Suchá rozpouštědla jako acetonitril a dichlormethan byla připravena destilací nad hydridem vápenatým, zatímco dimethylsulfoxid a *N,N'*-dimethylformamid byl vysušen stáním nad aktivovaným 3 Å molekulovým sítem (24 hodin, 300 °C) pod chlorkalciovou zátokou po dobu nejméně 72 hodin (Bradley a kol., 2010).

½ MS médium pro kořenový test rostlin (500 ml) se skládalo z MS solí (1,075 g); MES hydrátu (0,25 g); sacharosy (5 g) a rostlinného agaru (4 g), přičemž pH roztoku bylo upraveno pomocí 5 mol/l KOH na hodnotu 5,7.

3.2 Biologický materiál

Kořenový test vybraných sloučenin byl prováděn na semenech *A. thaliana* ekotyp Columbia 8 dodaných Mgr. Markétou Pernisovou, Ph.D.

3.3 Metody

Všechny provedené reakce byly průběžně kontrolovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách potažených silikagelem 60 F254 (Merck, US) a jako mobilní fáze byly použity směsi chloroform/methanol (9:1 nebo 4:1)

a petrolether/ethyl-acetát (1:1). Vizualizace byla provedena pomocí UV lampy (Camag, Švýcarsko) při vlnové délce 254 nm a u některých látek byl využit i barvicí roztok vanilinu (3,2 g vanilinu, 200 ml ethanolu, 1 ml konc. kyseliny octové, 2 ml konc. kyseliny sírové) pro detekci cukerných jednotek.

Purifikace připravených látek byla prováděna pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ve skleněných kolonách naplněných silikagelem Davisil LC60A 40-63 Micron (Grace Davison Discovery Sciences, UK) za použití mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem methanolu. Dále byly některé látky podrobeny separaci pomocí reverzního C18 silikagelu Davisil 633NC18E (Grace Vydac, USA) a mobilní fáze voda/methanol s gradientem methanolu.

Čistota připravených látek byla zjištěna pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC Alliance 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA, USA) s kolonou C18 Symmetry (Waters, UK) o délce 150 mm a průměru 2,1 mm s pórovitostí 5 μm . Vzorky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (1 mg/ml) a naředěny počáteční mobilní fází na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Na kolonu bylo nastříknuto 10 μl roztoku. Separace probíhala gradientovou elucí (0' – 90 % A; 25' – 10 % A; 35' – 10 % A; 36' – 90 % A; 45' – 10 % A) o průtoku 0,25 ml/min, přičemž mobilní fázi tvořil 15 mmol/l mravenčan amonný o pH 4,0 a mobilní fázi B methanol. Detekce analytů byla provedena UV-VIS detektorem s diodovým polem (PDA 2996, Waters, UK), který měřil v rozmezí vlnových délek 210–400 nm.

Molekulová hmotnost (MS) připravených látek byla určena na hmotnostním spektrometru s hybridní analyzátorem doby letu QqTOF (Waters, UK), který se skládá z kvadrupólu (Q), kolizní cely (q) a průletového analyzátoru (TOF). Eluent byl veden z HPLC do iontového zdroje (ESI), jenž byl vyhříván na 120 °C. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 3 kV a na vstupní štěrbině na 20 V. K desolvataci docházelo při 250 °C, přičemž jako desolvační i zmlžovací plyn byl použit dusík. Ionizace probíhala v pozitivním módu (ESI⁺) a detekce ve FULLSCAN módu v rozmezí m/z 50-1000.

K charakterizaci připravených peracetylovaných či bromovaných sacharidů byla využita metoda GC/MS. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu na koncentraci 1 mg/ml a dále 1000× naředěny do hexanu. Takto připravený roztok byl v objemu 1 μl nastříknut na kolonu TRACETM GC Ultra TR-1701 o rozměrech 30 m×0,25 mm×0,25 μm na plynovém chromatografu TRACE GC Ultra (Thermo Scientific, USA). Analýza probíhala za těchto podmínek: teplota injektoru 200 °C, splitless mód, teplotní gradient: 40 °C (1 min), gradient 10 °C/min, 260 °C (5 min), teplota lineru 280 °C, průtok helia 1,2 ml/min. Eluenty byly dále analyzovány v hmotnostním spektrometru Finnigan Polaris Q (Thermo Scientific, USA) s iontovou pastí a iontovým zdrojem v podobě nárazu elektronů (EI) s kolizním napětím 70 eV.

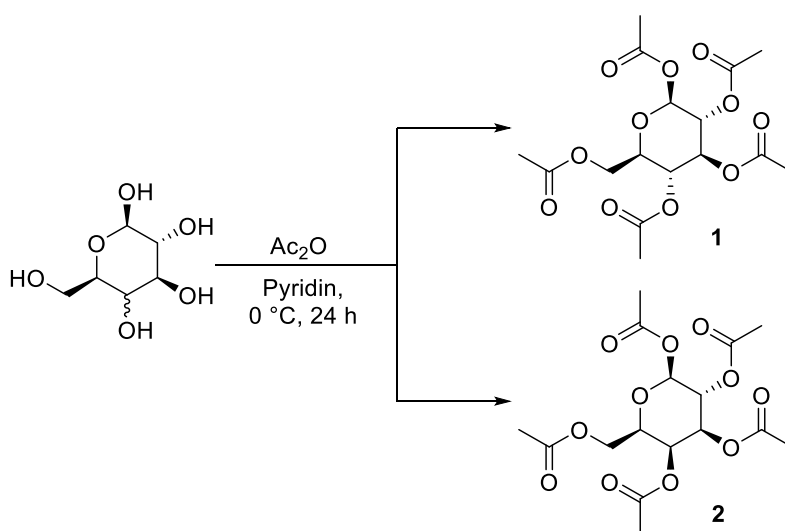
Specifická optická otáčivost byla měřena na polarimetru polAAR 3001 (Optical Activity, UK). Vzorky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu na výslednou koncentraci 0,5 nebo 0,25 g/dl a měřeny při vlnové délce 589 nm a teplotě 25 °C.

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla získána na spektrometru ECA-500 (Jeol, Japonsko) při frekvencích 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Vzorky byly rozpuštěny v deuterovaném dimethylsulfoxidu ($\text{DMSO}-d_6$) nebo v deuterovaném chloroformu (CDCl_3) a chemické posuny byly kalibrovány na signál použitého rozpouštědla: pro ^1H reziduální pík rozpouštědla $\text{DMSO}-d_6$ $\delta = 2,49$ ppm, CHCl_3 $\delta = 7,26$ ppm a pro ^{13}C pík rozpouštědla $\text{DMSO}-d_6$ $\delta = 39,5$ ppm a CDCl_3 $\delta = 77,0$ ppm.

3.4 Syntéza

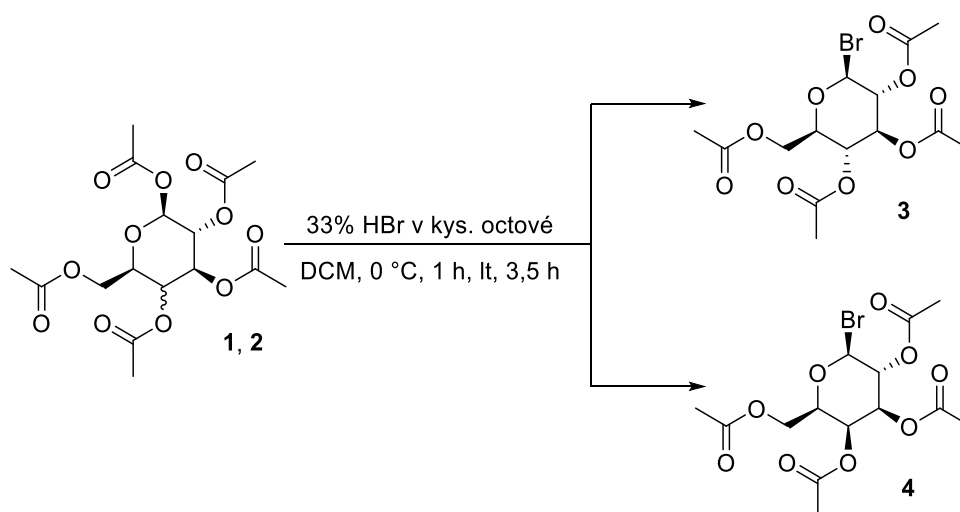
3.4.1 Syntéza prekurzorů

K suspenzi β -D-glukosy nebo β -D-galaktosy (1 ekv.) v pyridinu (60 ml) byl při 0 °C pod inertní atmosférou přikapán acetanhydrid (11 ekv.) a reakce byla dále míchána 24 hodin za laboratorní teploty (Obr. 17). Následně byla reakční směs nalita do ledové tříště (600 ml). V případě vzniku pevné látky následovala filtrace pevného podílu, promytí vodou a poté vysušení při 50 °C. Pokud však vznikl gel, byla vzniklá směs extrahována do chloroformu. Spojené organické frakce byly poté promyty nasyceným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a zahuštěny na rotační vakuové odparce. Následně byla peracetylovaná galaktosa (**2**) přečištěna krystalizací z EtOH.



Obr. 17. Syntéza peracetylovaných sacharidů. **1** – penta-O-acetyl-glukosa; **2** – penta-O-acetyl-galaktosa.

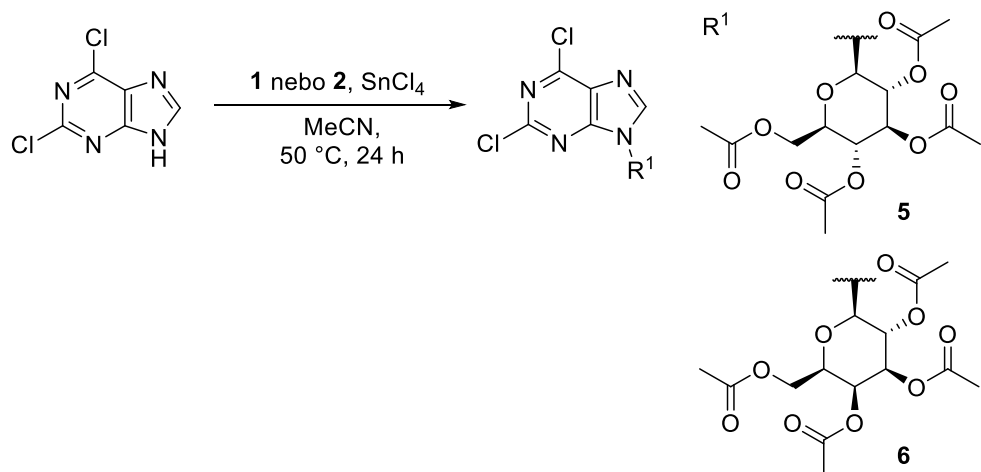
K roztoku peracetylované β -D-glukosy či β -D-galaktosy (12,8 mmol) v suchém dichlormethanu (37,5 ml) byl za chlazení přikapán 33% bromovodík v kyselině octové (30 ml) (Obr. 18). Reakční směs byla poté míchána 1 hodinu při 0 °C a 3,5 h za laboratorní teploty. Výsledná směs byla rozdělena mezi DCM a vodu, a poté byla vodní fáze re-extrahována DCM. Spojené organické fáze byly dále promývány nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného do dosažení pH 8. Následně byly promyty nasyceným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným, zahuštěny za snížené teploty na rotační vakuové odparce a uchovány při -20 °C (Floyd a kol., 2009).



Obr. 18. Bromace peracetylované D-glukosy a D-galaktosy. 3 – acetobromglukosa; 4 – acetobromgalaktosa.

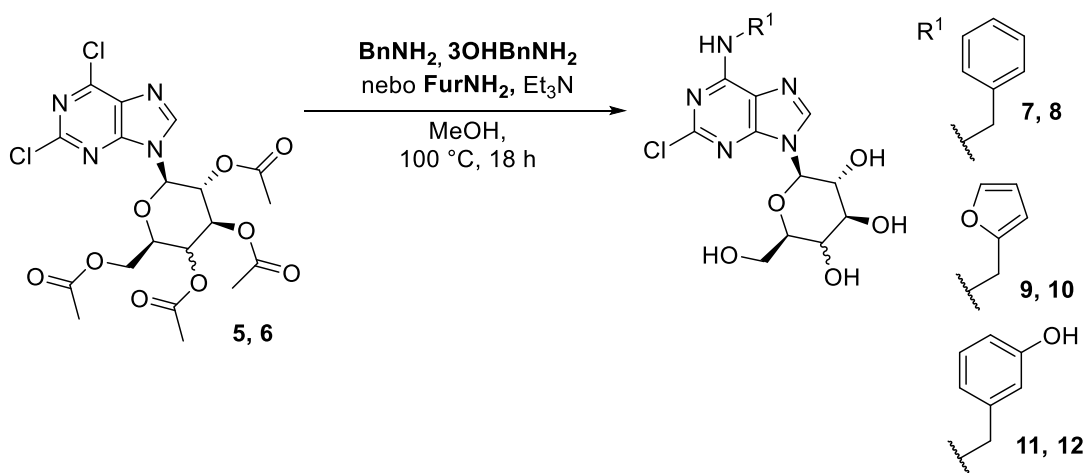
3.4.2 Syntéza *N*9-glykosidů

K suspenzi **1** nebo **2** (2,56 mmol) a 2,6-dichlorpurinu (1,05 ekv.) a v suchém acetonitrilu (12,4 ml) byl pod inertní atmosférou přikapán chlorid cínčitý (2,5 ekv.) (Obr. 19). Reakční směs byla míchána 24 h při 50 °C a poté zakoncentrována na rotační vakuové odparce. Následně byl odparek rozdělen mezi saturovaný NaHCO₃ a EtOAc. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a zahuštěny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Vzniklý produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH (100:1 – 80:1).



Obr. 19. Glykosylace 2,6 – dichlorpurinu peracetylovanou glukosou a galaktosou do pozice N9. **5** – 2,6-dichlorpurin-tetra-O-acetylglukosid; **6** – 2,6-dichlorpurin-tetra-O-acetylgalaktosid.

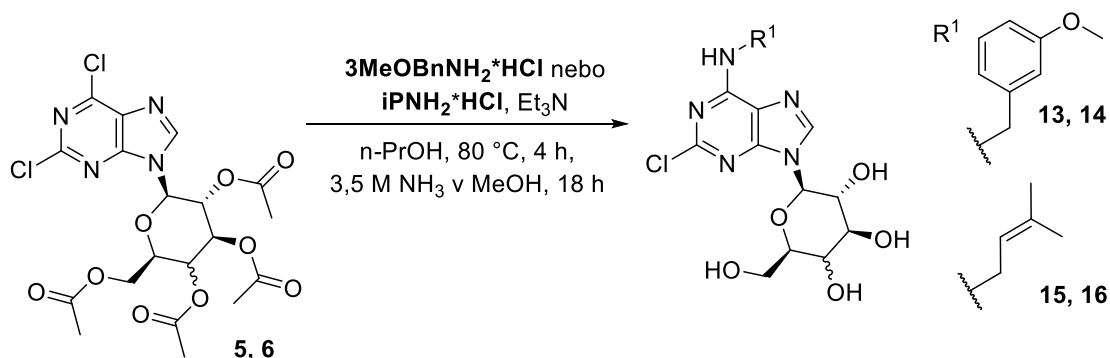
Látka **5** nebo **6** (0,39 mmol) byla zahřívána s nadbytkem příslušného aminu (1,2 ekv.) a Et₃N (2,5 ekv. pro **7**, **8** a 5 ekv. pro **9**, **10**, **11**, **12**) v MeOH (3 ml) v tlakové ampuli 18 hodiny při 100 °C (Obr. 20). Reakční směs byla následně zahuštěna na rotační vakuové odparce. Vzniklý odparek byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH (100:1 – 5:1). Látka **10** byla také přečištěna pomocí reverzního C18 silikagelu s mobilní fází voda/methanol s gradientem MeOH (1:0 – 1:2).



Obr. 20. Nukleofilní substituce v pozici C6 reakcí 2,6-dichlorpurin-tetra-O-acetylglukosidu s příslušným aminem. 3OHBnNH₂ - 3-(aminomethyl)fenol, FurNH₂ – furfurylamin.

Látka **5** nebo **6** (0,39 mmol) byla míchána s nadbytkem příslušného aminu (1,2 ekv.) a Et₃N (3 ekv. pro **15**, **16** a 6 ekv. pro **13**, **14**) v n-PrOH (3 ml) v tlakové ampuli 4 hodiny při 80 °C (Obr. 21). Reakční směs byla následně zahuštěna na rotační vakuové odparce a vzniklý odparek byl míchán v 3,5 mol/l methanolicke amoniaku 18 hodin

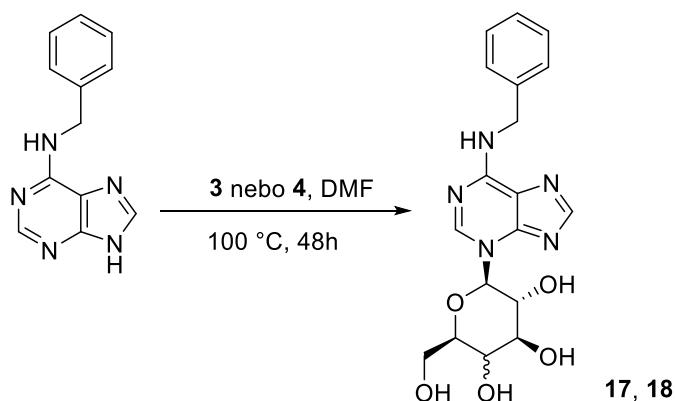
za laboratorní teploty. Po odpaření byl produkt purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH (100:1 – 5:1)



Obr. 21. Nukleofilní substituce v pozici C6 reakcí 2,6-dichlorpurin-tetra-O-acetylglukosidu s příslušným aminem. 3MeOBnNH₂*HCl - 3-methoxybenzylamin hydrochlorid; iPNH₂*HCl – 3-methylbut-2-en-1-amin hydrochlorid.

3.4.3 Syntéza N3-glykosidů

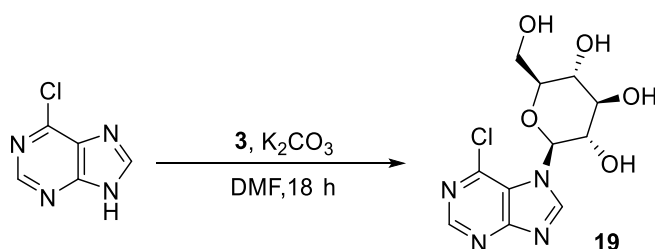
Směs N⁶-benzyladeninu (1,66 mmol) a **3** nebo **4** (2,4 ekv.) v suchém N,N'-dimethylformamidu (4,2 ml) byla míchána za inertní atmosféry při 100 °C po dobu 48 hodin (Obr. 22). Výsledná směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce a následně rozdělena mezi EtOAc a vodu. Spojené organické frakce byly poté promyty nasyceným roztok NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a zahuštěny na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH (100:1 – 5:1). Dále byl produkt míchán v 3,5 mol/l methanolicém amoniaku. Vzniklé látky **17** a **18** byly přečištěny pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH (100:1 – 5:1) a následně i pomocí C18 silikagelu s mobilní fází voda/methanol s gradientem MeOH (1:0 – 1:2).



Obr. 22. Příprava N3-glykosidů reakcí BAP s acetobromglukosou a acetobromgalaktosou.

3.4.4 Syntéza N7-glukosidu

6-Chlorpurin (1,30 mmol) a uhličitan draselný (2,5 ekv.) byl míchán v suchém *N,N'*-dimethylformamidu (3 ml) po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Následně byla ke směsi přidána látka **3** (1,2 ekv.) a vše bylo mícháno dalších 18 hodin (Obr. 23). Poté byla opět přidána látka **3** (1,2 ekv.) a reakce probíhala 18 hodin. Výsledná směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce a následně rozdělena mezi EtOAc a vodu. Spojené organické frakce byly poté promyty nasyceným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a zahuštěny na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol s gradientem MeOH (100:1 – 80:1).



Obr. 23. Glukosylace 6-chlorpurinu v pozici N7.

3.5 Biologické testování

3.5.1 Kořenový test

Kořenový test byl prováděn na semenáčcích *A. thaliana* ekotyp Columbia 8. Testované látky (**7-18**) byly rozpuštěny v DMSO, přidány do $\frac{1}{2}$ MS média bez vitamínů a nality za sterilních podmínek ve flowboxu na Petriho misky o rozměrech 12×12 cm. Finální koncentrace látek v médiu byly 0,1 μ mol/l, 1 μ mol/l a 10 μ mol/l, přičemž obsah DMSO byl v médiu do 0,1 %. Jako pozitivní kontroly byly použity odpovídající volné báze cytokininů, a to *N*⁶-benzyladenin, 2-chlor-*N*⁶-benzyladenin, 2-chlorkinetin, 2-chlor-*N*⁶-isopentenyladenin, 2-chlor-*meta*-methoxytopolin a 2-chlor-*meta*-topolin. Negativní kontrolou byl DMSO. Po zatuhnutí média byla na kultivační desky nanesena semena *A. thaliana* ve dvou řadách po deseti a pro každou koncentraci byly připraveny nejméně dvě desky. Synchronizace semen na deskách probíhala ve tmě při 4 °C po dobu dvou dní a následná kultivace ve fytotronu při 20 °C, 60% vzdušné vlhkosti po dobu 6 dní v režimů dlouhého dne (16 hodin světlo, 8 hodin tma). Po uběhnutí kultivační doby byly Petriho misky s rostlinami nafoceny pomocí fotoaparátu (Canon EOS 600D) a délka kořenů byla změřena pomocí programu ImageJ verze 1.51j8.

3.5.2 Kompetiční cytokininový receptorový test

Schopnost vybraných sloučenin (7-18) interagovat s cytokininovými receptory AHK3 a CRE1/AHK4 z *A. thaliana* byla zjišťována v kompetičním ligand-vazebném testu, který byl proveden podle modifikovaného protokolu dostupného na severu Aesculab (Aesculab 1). Látky byly rozpuštěny v DMSO a otestovány ve finální koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$, přičemž jako pozitivní kontrola byl použit tZ a jako negativní kontrola DMSO.

3.5.3 Cytotoxicita

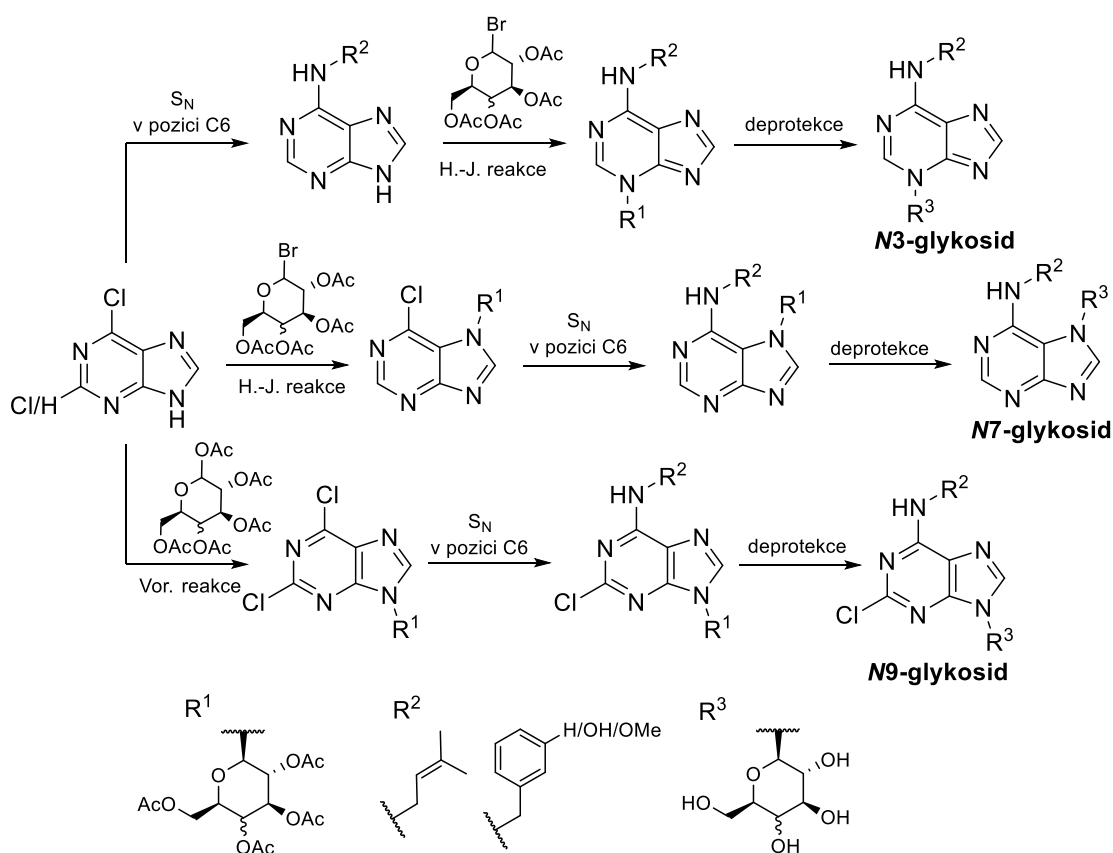
U sloučenin (7-18) byla zjišťována *in vitro* toxicita na nenádorových lidských buněčných liniích HaCat (imortalizované kožní keratinocyty, RRID:CVCL_0038), BJ (kožní fibroblasty, ATCC: CRL-2522) a APRE-19 (imortalizované buňky sítnicového epitelu ATCC: CRL-2302). Účinky testovaných sloučenin v 6 koncentracích (maximální koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$) byly hodnoceny po 72 h od přidání látek do media. DMSO sloužil jako negativní kontrola. Vyhodnocení bylo provedeno fluorimetricky pomocí resazurin redukčního testu při vlnových délkách $\text{ex} = 570 \text{ nm}$, $\text{em} = 610 \text{ nm}$.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza

Syntetickým cílem této diplomové práce bylo nalezení vhodné metodologie pro přípravu cukerných konjugátů cytokininů, jenž budou mít cukernou jednotku (glukosu nebo galaktosu) připojenou na dusíkových atomech v pozici *N3*, *N7* nebo *N9* purinového skeletu. Pro syntézu byly vybrány převážně aromatické cytokinininy, jelikož jsou snáze připravitelné a vykazují vysokou biologickou aktivitu, přestože se nevážou na cytokininové receptory v takové míře jako isoprenoidní cytokinininy (Doležal a kol., 2006).

Modifikace dusíkových atomů purinového heterocyklu ve většině případů neprobíhá selektivně a dochází ke vzniku směsi isomerů, jejichž poměr závisí na reakčních podmínkách. Pro zvýšení výtěžků konkrétního isomeru je nutné zvolit vhodnou reakční sekvenci (Mik, osobní sdělení). K přípravě *N9*-glykosidů byl vybrán následující postup – Vorbrüggenova reakce mezi 2,6-dichlorpurinem a peracetylovaným sacharidem katalyzovaná Lewisovou kyselinou (chlorid cínitý), nukleofilní substituce v pozici C6 a deprotektace acetylových chránících skupin (Obr. 24).



Obr. 24. Reakční schéma pro přípravu cytokininových *N3*-, *N7*- a *N9*-glykosidů. S_N – nukleofilní substituce; H.-J. – Hilbert-Johnsonova reakce; Vor. - Vorbrüggenova reakce.

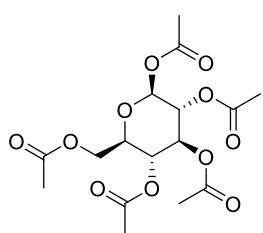
Dále pro vznik *N*7-glykosidů byla zvolena Hilbert-Johnsonova reakce 6-chlorpurinu s acetobromglukosou v přítomnosti uhličitanu draselného jako báze s následnou nukleofilní substitucí v pozici C6 a deprotekcí chránících skupin. Hilbert-Johnsonova metoda byla také vybrána pro přípravu *N*3-glykosidů, ovšem v tomto případě reagoval přímo BAP s acetobromsacharidem bez použití báze.

Prvním krokem v rámci *N*-glykosylace byla tedy příprava vhodných prekurzorů, konkrétně peracetylované glukosy (**1**) a galaktosy (**2**). Syntéza spočívala v ochránění hydroxylových skupin pomocí acetanhydridu v přítomnosti pyridinu, který byl použit zároveň jako rozpouštědlo a báze (Zhang a Vasella, 2007). V případě glukosy byl výtěžek 94 %, zatímco u galaktosy byl pouze 51 %, což způsobila obtížná krystalizace (Tab. 2). Pro následnou Hilbert-Johnsonovu reakci byly potřeba acetobromsacharidy, které byly připraveny reakcí **1** a **2** s 33% bromovodíkem v kyselině octové podle publikace Floyd a kol, 2009.

Tab. 2. Přehled připravených prekurzorů pro *N*-glykosylaci a jejich fyzikálně-chemických vlastností.
GC – plynová chromatografie; α_D^{25} – specifická optická otáčivost.

Látka	Výtěžek [%]	GC [min]	α_D^{25} [°]
1	93,8	19,91	108,2
2	51,4	19,83	115,0
3	77,4	20,08	178,6
4	93,6	20,07	169,8

(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát (1**)**



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₆H₂₂O₁₁.

Výtěžek (%): 93,8.

α_D^{25} (°): 108,2 (c = 0,5 g/dl).

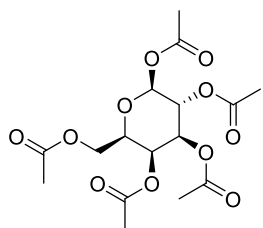
GC retenční čas (min): 19,91.

EI⁺-MS m/z: 73,0; 81,1; 97,0; 98,0; 114,8; 139,7; 168,7; 181,8; 198,7; 199,6; 210,8.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,97 (s, 3H); 1,98 (s, 3H); 1,99 (s, 3H); 2,00 (s, 3H); 2,17 (s, 3H); 3,98-4,02 (m, 1H); 4,13-4,18 (m, 2H); 5,00 (dd, *J* = 10,4; 3,7 Hz, 1H); 5,07 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H); 5,32 (t, *J* = 9,9 Hz, 1H); 6,16 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20,29; 2×20,34; 20,51; 20,65; 61,26; 67,36; 68,70; 2×69,17; 88,23; 169,00; 169,15; 169,58; 169,68; 170,04.

(2S,3R,4S,5S,6R)-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetraol tetraacetát (2)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₆H₂₂O₁₁.

Výtěžek (%): 51,4.

α_D^{25} (°): 115,0 (c = 0,5 g/dl).

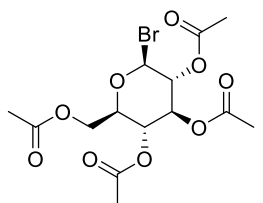
GC retenční čas (min): 19,83.

El⁺-MS m/z: 73,0; 81,0; 97,0; 98,0; 114,8; 139,8; 157,9; 168,8; 198,7; 199,8; 330,8.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,95 (s, 3H); 1,97 (s, 3H); 1,99 (s, 3H); 2,12 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 3,98-4,05 (m, 2H); 4,43 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H); 5,09 (dd, *J* = 11,0; 3,7 Hz, 1H); 5,27 (dd, *J* = 11,0; 3,4 Hz, 1H); 5,41 (dd, *J* = 3,4; 1,2 Hz, 1H); 6,21 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20;32, 20;36, 20;38, 20;51, 20;61, 61;10, 66;20, 66;75, 67;39, 68;38, 88;71, 169;10, 169;54, 169;83, 169;88, 169;95.

(2S,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-bromotetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetát (3)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₄H₁₉BrO₉.

Výtěžek (%): 77,4.

α_D^{25} (°): 178,6 (c = 0,5 g/dl).

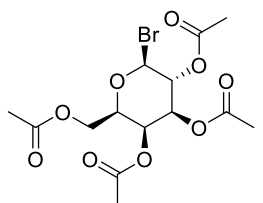
GC retenční čas (min): 20,08.

El⁺-MS m/z: 81,0; 97,0; 109,0; 126,9; 138,8; 167,8; 168,9; 210,8.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,03 (s, 3H); 2,05 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 2,10 (s, 3H); 4,12 (dd, *J* = 12,4; 1,7 Hz, 1H); 4,28-4,34 (m, 2H); 4,83 (dd, *J* = 9,9; 4,1 Hz, 1H); 5,16 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H); 5,55 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H); 6,61 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,54; 20,61; 20,63; 20,66; 60,91; 67,13; 70,12; 70,57; 72,10; 86,53; 169,45; 169,79; 169,84; 170,49.

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-bromotetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetát (4)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₄H₁₉BrO₉.

Výtěžek (%): 98,6.

α_D^{25} (°): 169,8 (c = 0,5 g/dl).

GC retenční čas (min): 20,07.

El⁺-MS m/z: 81,0; 97,0; 109,0; 126,9; 138,8; 167,8; 168,9; 210,8.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,01 (s, 3H); 2,06 (s, 3H); 2,11 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 4,11 (dd, *J* = 11,6; 6,7 Hz, 1H); 4,18 (dd, *J* = 11,6; 6,4 Hz, 1H); 4,48 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H); 5,04 (dd, *J* = 10,7; 4,0 Hz, 1H); 5,40 (dd, *J* = 10,7; 3,4 Hz, 1H); 5,51 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H); 5,51 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H); 6,69 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,54; 20,57; 20,62; 20,73; 60,80; 66,93; 67,72; 67,95; 71,00; 88,06; 169,77; 169,90; 170,07; 170,33.

Dalším krokem byla *N*9-glykosylace 2,6-dichlorpurinu s **1** nebo **2** katalyzovaná chloridem cínitým za vzniku **5** a **6** s výtěžky 42 %, respektive 36 %. Tato reakce byla provedena pomocí modifikovaného protokolu Hocek a kol., 2006 a následovala ji nukleofilní substituce příslušným aminem v pozici C6. Při použití methanolu jako rozpouštědla byl při monitorování průběhu reakcí pozorován na TLC vznik polárnějších látek, svědčících o postupné deprotekcí cukerné jednotky. Reakce probíhala při 100 °C 18 hodin, čímž se dosáhlo úplného odstranění ochranných skupin. Na druhou stranu, pokud byl použit *n*-propanol jako rozpouštědlo a reakce probíhaly při 80 °C, po 4 hodinách došlo k úplnému odreagování výchozí látky (**5** a **6**), ale nedocházelo k ochránění acetylů. Deprotekce byla uskutečněna až vymícháním sloučenin v 3,5 mol/l methanolicím amoniaku (Tab. 3).

Tab. 3. Přehled připravených *N*9-glykosidů a jejich fyzikálně-chemických vlastností. Glu – glukosa; Gal – galaktosa; BnNH – benzylamino-; FurNH – furfurylamino-; 3OHNH – 3-hydroxybenzylamino-; 3MeONH – 3-metoxybenzylamino-; iPNH – isopentenylamino-; α_D²⁵ – specifická optická otáčivost.

Látka	<i>N</i> 9	C2	C6	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺	α _D ²⁵ [°]
5	Glu	-Cl	Cl-	42,0	23,10 / 96,3	540,5*	-
6	Gal	-Cl		36,4	23,10 / 97,3	540,5*	-
7	Glu	-Cl	BnNH-	74,1	17,34 / 99,9	422,1	6,8
8	Gal	-Cl		43,8	17,01 / 99,9	422,3	14,0
9	Glu	-Cl	FurNH-	62,0	18,50 / 98,2	412,7	8,4
10	Gal	-Cl		13,9	18,15 / 99,0	412,7	13,6
11	Glu	-Cl	3OHNH-	58,3	18,60 / 99,0	438,8	4,8
12	Gal	-Cl		76,7	13,44 / 99,9	438,3	9,6
13	Glu	-Cl	3MeONH-	14,6	21,53 / 94,9	452,8	2,0
14	Gal	-Cl		66,1	21,25 / 99,9	452,8	19,6
15	Glu	-Cl	iPNH-	60,8	22,00 / 97,4	400,7	7,4
16	Gal	-Cl		51,0	22,38 / 99,1	400,7	25,2

Z hlediska purifikace finálních látek se jako vhodnější jeví použití *n*-propanolu a nižší reakční teploty, jelikož při extrakci intermediátu do EtOAc dochází k přechodu

nezreagovaných výchozích aminů a solí do vody, čímž dojde k částečné purifikaci látek. Výťažky reakcí se pohybují od 14 - 77 %, přičemž nízké výtěžky jsou způsobeny obtížnou purifikací, nikoli neodreagováním výchozí látky.

N3-glykosidy (**17** a **18**) byly připravovány podle postupu uvedeného v publikaci Letham a kol., 1975. Při dodržení reakčních podmínek bylo po uplynutí 20 hodin pozorováno na TLC velké množství výchozí látky, proto bylo zvýšeno množství alkylačního činidla a prodloužena doba reakce na dvojnásobek. Ani po uplynutí této doby nedošlo k úplnému odreagování BAP, přesto byla reakční směs zpracována. Při purifikaci byly vyizolovány dvě frakce, přičemž polárnější z nich byla tvořena N3-isomerem a druhou byl pravděpodobně N9-isomer. Podle HPLC-MS bylo zjištěno, že při reakci nedošlo k odstranění acetylů, tudíž byly sloučeniny vymíchány v 3,5 mol/l methanolickém amoniaku. Výťažky reakcí jsou velmi nízké (10,5 % a 17,4 %), což je způsobeno především vznikem N9-glykosidu a obtížnou purifikací (Tab. 4). U produktů **17** a **18** byly po rozpuštění v DMSO-*d*₆ změřeny NMR spektra, přičemž v nich byly pozorovány dvě tautomerní formy v poměru přibližně 2,5:1. Chemické posuny obou tautomerů odpovídaly připraveným látkám a připojení cukerné jednotky na N3 atom purinového heterocyklu bylo potvrzeno pomocí 2D experimentů. Získaná data byla porovnána s chemickými posuny pro BAP3G uvedenými v publikaci (Vicha a kol., 2010), které odpovídají tautomerní formě ve větším zastoupení. Autoři však neuvádějí přítomnost dvou tautomerních forem.

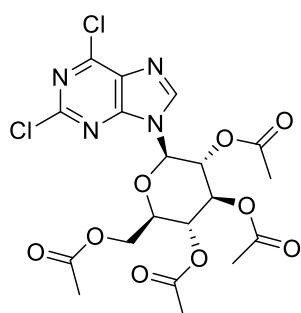
Tab. 4. Přehled připravených N3-glykosidů a jejich fyzikálně-chemických vlastností. Glu – glukosa; Gal – galaktosa; BnNH – benzylamino-; α_D^{25} – specifická optická otáčivost.

Látka	N3	C2	C6	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺	α_D^{25} [°]
17	Glu	-H	BnNH-	10,5	18,66 / 99,9	388,7	5,6
18	Gal	-H		17,4	11,38 / 95,6	388,6	7,8

V rámci syntetické části byla také snaha připravit N7-glukosid. Jako první krok byla zvolena reakce 6-chlorpurinu s **3** v přítomnosti uhličitanu draselného jako báze. Při kontrole reakce pomocí TLC však bylo pozorováno velké množství neodreagované výchozí látky. Z tohoto důvodu byla prodloužena reakční doba a byla znovu ve stejném množství přidána acetobromglukosa (**3**). Po extrakci do EtOAc a následné chromatografické purifikaci byly získány dvě frakce, přičemž ani v jedné z nich nebyla nalezena látka s požadovanou molekulovou hmotností, ani její patřičné fragmenty odpovídající například ztrátě acetylů. Tudíž metoda nebyla dále nijak optimalizována a od syntézy N7-isomeru se odstoupilo. Podobnou reakci však publikoval v roce 1978 Cowley a kol., ovšem v ní byl jako rozpouštědlo použit propylen karbonát a výtěžek

v jejich případě byl 14 %. Z tohoto důvodu by bylo vhodné v budoucnu vyzkoušet pro tuto reakci i jiná rozpouštědla.

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-(2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetát (5)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₉.

Výtěžek (%): 42,0.

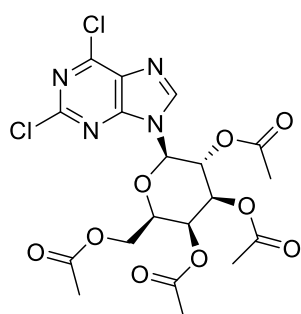
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,10; 96,3.

ESI⁺-MS m/z: 540,497 [M+Na]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,71 (s, 3H); 1,97 (s, 3H); 1,98 (s, 3H); 2,03 (s, 3H); 4,10 (d, *J* = 3,7 Hz, 2H); 4,45-4,42 (m, 1H); 5,23 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H); 5,66 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H); 5,78 (t, *J* = 9,3 Hz, 1H); 6,35 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 9,08 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 19,94; 20,26; 20,44; 20,54; 61,69; 67,44; 70,39; 71,73; 73,21; 79,24; 130,38; 146,42; 150,24; 151,72; 153,03; 169,06; 2×169,48; 170,04.

(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-(2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetát (6)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₉.

Výtěžek (%): 36,4.

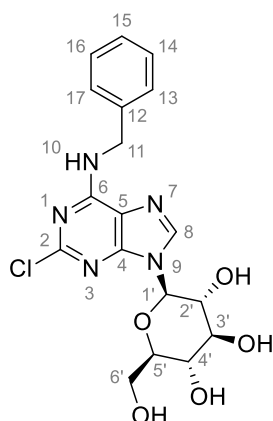
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,10; 97,34.

ESI⁺-MS m/z: 540,475 [M+Na]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,75 (s, 3H); 1,95 (s, 3H); 1,97 (s, 3H); 2,22 (s, 3H); 4,01 (dd, *J* = 11,0, 7,3 Hz, 1H); 4,13 (dd, *J* = 11,5, 5,0 Hz, 1H); 4,64 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 5,41 (s, 1H); 5,56 (dd, *J* = 9,9, 2,6 Hz, 1H); 5,70 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H); 6,25 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 9,00 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 19,98; 20,35; 20,41; 20,49; 61,50; 67,08; 67,85; 70,17; 72,86; 80,30; 130,55; 146,38; 150,34; 151,67; 153,08; 169,22; 169,48; 169,93; 170,06.

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[6-(benzylamino)-2-chlor-9H-purin-9-yl]-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (7)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: $C_{18}H_{20}ClN_5O_5$.

Výtěžek (%): 74,1.

α_D^{25} (°): 6,8 (c = 0,5 g/dl).

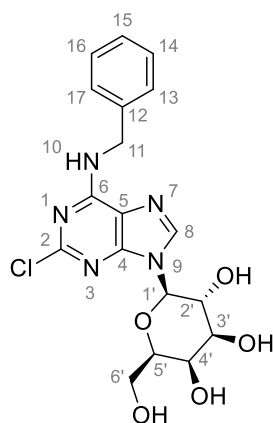
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 17,34; 99,9.

ESI⁺-MS m/z: 422,1 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,23 (s, 1H, -H^{4'}); 3,34-3,42 (m, 3H, -H^{3'}, -H^{5'}, -H^{6'}); 3,70 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H, -H^{6'}); 3,91 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -H^{2'}); 4,58 (s, 1H, -OH^{6'}); 4,64 (s, 2H, -H¹¹); 5,15 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH^{4'}); 5,29-5,35 (m, 3H, -H^{1'}, -OH^{2'}, -OH^{3'}); 7,22 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -H¹⁵); 7,30 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H, -H¹³, -H¹⁴, -H¹⁶, -H¹⁷); 8,38 (s, 1H, -H⁸); 8,86 (s, 1H, -H¹⁰).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43,12 (C¹¹); 60,90 (C^{6'}); 69,73 (C^{4'}); 71,39 (C^{2'}); 77,01 (C^{3'}); 80,04 (C^{5'}); 82,90 (C^{1'}); 118,12 (C⁵); 126,84 (C¹⁵); 127,21 (C¹⁴, C¹⁶); 128,32 (C¹³, C¹⁷); 139,24 (C¹²); 140,39 (C⁸); 150,15 (C⁴); 153,24 (C²); 154,93 (C⁶).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-[6-(benzylamino)-2-chlor-9H-purin-9-yl]-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (8)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: $C_{18}H_{20}ClN_5O_5$.

Výtěžek (%): 43,8.

α_D^{25} (°): 14,0 (c = 0,5 g/dl).

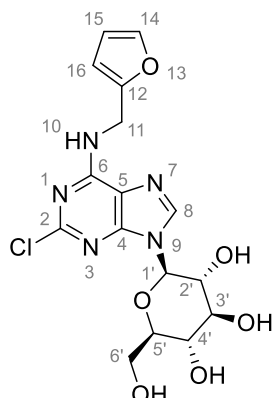
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 17,01; 99,9.

ESI⁺-MS m/z: 422,3 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,45-3,58 (m, 3H, -H^{3'}, -H^{6'}); 3,70 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, -H^{5'}); 3,75 (q, *J* = 3,0 Hz, 1H, -H^{4'}); 4,08-4,11 (m, 1H, -H^{2'}); 4,57 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, -OH^{4'}); 4,63-4,68 (m, 3H, -OH^{6'}, -H¹¹); 5,02 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH^{3'}); 5,22 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH^{2'}); 5,31 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H^{1'}); 7,20-7,23 (m, 1H, -H¹⁵); 7,28-7,31 (m, 4H, -H¹³, -H¹⁴, -H¹⁶, -H¹⁷); 8,33 (s, 1H, -H⁸); 8,88 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H, -H¹⁰).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43,12 (C¹¹); 60,47 (C^{6'}); 68,61 (C^{4'}); 69,11 (C^{2'}); 73,74 (C^{3'}); 78,47 (C^{5'}); 82,91 (C^{1'}); 117,90 (C⁵); 126,83 (C¹⁵); 127,20 (C¹⁴, C¹⁶); 128,32 (C¹³, C¹⁷); 139,25 (C¹²); 139,87 (C⁸); 150,23 (C⁴); 153,31 (C²); 154,94 (C⁶).

(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-{2-chlor-6-[(furan-2-ylmethyl)amino]-9*H*-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (9)



Žlutá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₈ClN₅O₆.

Výtěžek (%): 62,0.

α_D^{25} (°): 8,4 (c = 0,5 g/dl).

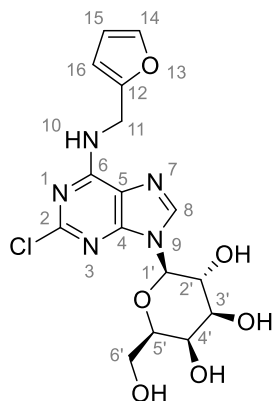
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 18,50; 98,2.

ESI⁺-MS m/z: 412,7 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,20-3,25 (m, 1H, -H^{4'}); 3,37-3,44 (m, 3H, -H^{3'}, -H^{5'}, -H^{11'}); 3,69 (dd, *J* = 10,4; 5,8 Hz, 1H, -H^{11'}); 3,91 (td, *J* = 9,0; 5,8 Hz, 1H, -H^{2'}); 4,58-4,63 (m, 3H, -H¹¹, -H^{6'}); 5,16 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH^{4'}); 5,30-5,36 (m, 3H, -H^{1'}, -OH^{2'}, -OH^{3'}); 6,26 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, -H¹⁶); 6,37 (s, 1H, -H¹⁴); 7,55 (q, *J* = 0,8 Hz, 1H, -H¹⁵); 8,38 (s, 1H, -H⁸); 8,77 (s, 1H, -H¹⁰).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 36,71 (C¹¹); 60,90 (C^{6'}); 69,74 (C^{4'}); 71,40 (C^{2'}); 77,02 (C^{3'}); 80,07 (C^{5'}); 82,91 (C^{1'}); 107,10 (C¹⁶); 110,55 (C¹⁴); 118,23 (C⁵); 140,53 (C⁸); 142,06 (C¹⁵); 150,28 (C⁴); 152,05 (C¹²); 153,13 (C²); 154,75 (C⁶).

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-{2-chlor-6-[(furan-2-ylmethyl)amino]-9*H*-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (10)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₈ClN₅O₆.

Výtěžek (%): 13,9.

α_D^{25} (°): 13,6 (c = 0,25 g/dl).

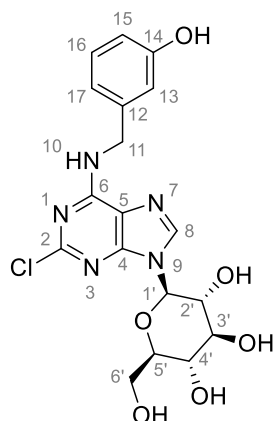
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 18,15; 99,0.

ESI⁺-MS m/z: 412,7 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,44-3,58 (m, 3H, -H^{3'}, -H^{6'}); 3,70 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H, -H^{5'}); 3,75 (dd, *J* = 5,2; 3,4 Hz, 1H, -H^{4'}); 4,11 (td, *J* = 9,2; 5,6 Hz, 1H, -H^{2'}); 4,57-4,64 (m, 3H, -H¹¹, -OH^{4'}); 4,67 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, -H^{6'}); 5,03 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH^{3'}); 5,23 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH^{2'}); 5,31 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H, -H^{1'}); 6,26 (s, 1H, -H¹⁶); 6,37 (s, 1H, -H¹⁵); 7,55 (q, *J* = 0,9 Hz, 1H, -H¹⁴); 8,33 (s, 1H, -H⁸); 8,78 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, -H¹⁰).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 36,71 (C¹¹); 60,48 (C^{6'}); 68,62 (C^{4'}); 69,11 (C^{2'}); 73,75 (C^{3'}); 78,50 (C^{5'}); 82,94 (C^{1'}); 107,07 (C¹⁶); 110,54 (C¹⁵); 118,01 (C⁵); 140,01 (C⁸); 142,05 (C¹⁴); 150,36 (C⁴); 152,05 (C¹²); 153,19 (C²); 154,75 (C⁶).

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-{2-chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (11)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: $C_{18}H_{20}ClN_5O_6$.

Výtěžek (%): 58,3.

α_D^{25} (°): 4,8 (c = 0,5 g/dl).

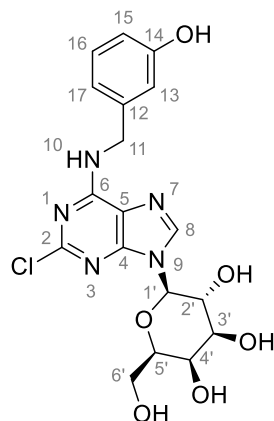
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 18,60; 99,0.

ESI⁺-MS m/z: 438,8 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,20-3,25 (m, 1H, -H^{3'}); 3,37-3,45 (m, 3H, -H^{3'}, -H^{5'}, -H^{6'}); 3,70 (dd, *J* = 10,2; 5,7 Hz, 1H, -H^{6'}); 3,92 (td, *J* = 8,9; 5,9 Hz, 1H, -H^{2'}); 4,56-4,60 (m, 3H, -H¹¹, -OH^{6'}); 5,15 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH^{4'}); 5,30 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, -OH^{3'}); 5,33 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H, -OH^{2'}); 5,36 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -H^{1'}); 6,59 (dd, *J* = 7,9; 1,5 Hz, 1H, -H¹⁷); 6,69 (s, 1H, -H¹³); 6,72 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H¹⁵); 7,08 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, -H¹⁶); 8,38 (s, 1H, -H⁸); 8,81 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H, -H¹⁰); 9,30 (s, 1H, -OH¹⁴).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,94 (C¹¹); 60,91 (C^{6'}); 69,75 (C^{4'}); 71,38 (C^{2'}); 77,03 (C^{3'}); 80,05 (C^{5'}); 82,88 (C^{1'}); 2×113,74 (C¹³, C¹⁷); 117,70 (C¹⁵); 118,10 (C⁵); 129,30 (C¹⁶); 140,36 (C⁸); 140,70 (C¹²); 150,15 (C⁴); 153,30 (C²); 154,98 (C⁶); 157,37 (C¹⁴).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-{2-chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (12)



Světle žlutá pevná látka.

Sumární vzorec: $C_{18}H_{20}ClN_5O_6$.

Výtěžek (%): 76,7.

α_D^{25} (°): 9,6 (c = 0,5 g/dl).

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 13,44; 99,9.

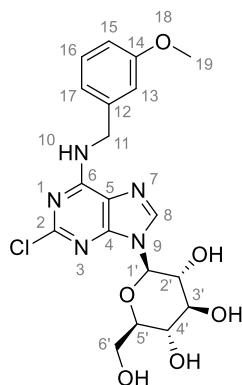
ESI⁺-MS m/z: 438,3 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,45-3,52 (m, 2H, -H^{6'}); 3,56 (dd, *J* = 9,3; 3,2 Hz, 1H, -H^{3'}); 3,70 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, -H^{5'}); 3,75 (s, 1H, -H^{4'}); 4,11 (t, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H^{2'}); 4,57 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, -H¹¹, -OH^{6'}); 4,68 (s, 1H, -OH^{4'}); 5,06 (s, 1H, -OH^{3'}); 5,25 (s, 1H, -OH^{2'}); 5,31 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H^{1'}); 6,59 (dd, *J* = 7,9; 1,8 Hz, 1H, -H¹⁵); 6,69 (s, 1H, -H¹³); 6,73 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H, -H¹⁷); 7,08 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H¹⁶); 8,34 (s, 1H, -H⁸); 8,83 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H, -H¹⁰); 9,32 (s, 1H, -OH¹⁴).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,94 (C¹¹), 60,50 (C^{6'}), 68,64 (C^{4'}), 69,10 (C^{2'}), 73,76 (C^{3'}), 78,49 (C^{5'}), 82,91 (C^{1'}), 113,74 (C¹³), 117,68 (C¹⁷), 117,90 (C⁵),

129.12 (C¹⁵), 129.29 (C¹⁶), 139.84 (C⁸), 140.70 (C¹²), 150.24 (C⁴), 153.37 (C²), 154.99 (C⁶), 157.37 (C¹⁴).

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-{2-chlor-6-[(3-methoxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (13)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₉H₂₂ClN₅O₆.

Výtěžek (%): 14,6.

α_D^{25} (°): 2,0 (c = 0,25 g/dl).

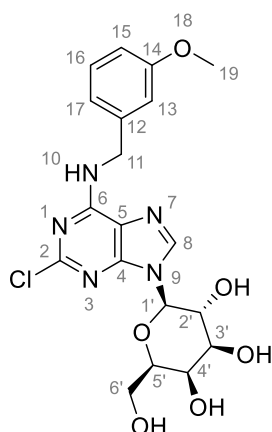
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 21,53; 94,9.

ESI⁺-MS m/z: 452,8 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,22-3,23 (m, 1H, -H^{4'}); 3,40-3,44 (m, 3H, -H^{3'}, -H^{5'}, -H^{6'}); 3,71 (s, 4H, -H¹⁹, -H^{6'}); 3,90-3,92 (m, 1H, -H^{2'}); 4,60 (s, 3H, -H¹¹, -OH^{6'}); 5,15 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, -OH^{4'}); 5,30-5,35 (m, 3H, -OH^{1'}, -OH^{2'}, -OH^{3'}); 6,79 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, -H¹⁷); 6,88 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, -H¹⁵); 6,91 (s, 1H, -H¹³); 7,21 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H¹⁶); 8,38 (s, 1H, -H⁸); 8,85 (s, 1H, -H¹⁰).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43,12 (C¹¹); 54,96 (C¹⁹); 60,91 (C^{6'}); 69,74 (C^{4'}); 71,40 (C^{2'}); 77,01 (C^{3'}); 80,05 (C^{5'}); 82,93 (C^{1'}); 112,17 (C¹⁷); 113,09 (C¹³); 118,14 (C^{5'}); 119,41 (C¹⁵); 129,42 (C¹⁶); 140,43 (C⁸); 140,84 (C¹²); 150,17 (C⁴); 153,23 (C²); 154,92 (C⁶); 159,25 (C¹⁴).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-{2-chlor-6-[(3-methoxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (14)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₉H₂₂ClN₅O₆

Výtěžek (%): 66,1.

α_D^{25} (°): 19,6 (c = 0,25 g/dl).

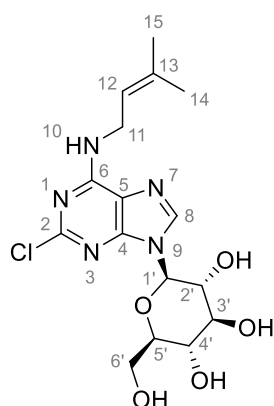
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 21,25; 99,9.

ESI⁺-MS m/z: 452,8 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,46-3,58 (m, 3H, -H^{6'}, -H^{3'}); 3,69-3,71 (m, 4H, -H¹⁸, -H^{5'}); 3,75 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, -H^{4'}); 4,11 (dd, *J* = 15,0; 9,2 Hz, 1H, -H^{2'}); 4,57 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, -OH^{4'}); 4,61 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, -H¹¹); 4,66 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH^{6'}); 5,02 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH^{3'}); 5,22 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH^{2'}); 5,31 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H^{1'}); 6,79 (dd, *J* = 8,1; 2,0 Hz, 1H, -H¹⁵); 6,88 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, -H¹⁷); 6,92 (s, 1H, -H¹³); 7,21 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, -H¹⁶); 8,33 (s, 1H, -H⁸); 8,86 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H, -H¹⁰).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 43,11 (C^{11}); 54,95 (C^{19}); 60,48 (C^6); 68,62 (C^4); 69,12 (C^2); 73,72 (C^3); 78,48 (C^5); 82,93 (C^1); 112,16 (C^{15}); 113,05 (C^{13}); 117,91 (C^5); 119,38 (C^{17}); 129,40 (C^{15}); 139,90 (C^8); 140,84 (C^{12}); 150,25 (C^4); 153,27 (C^2); 154,91 (C^6); 159,24 (C^{14}).

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-{2-chloro-6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (15)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_5\text{O}_5$.

Výtěžek (%): 60,8.

α_D^{25} (°): 7,4 ($c = 0,5$ g/dl).

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 22,00; 97,4.

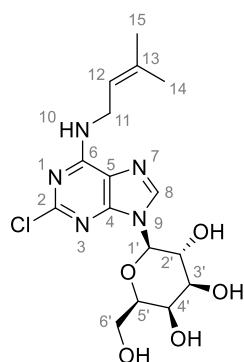
ESI⁺-MS m/z : 400,7 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,66 (s, 3H, $-\text{H}^{14}$); 1,71 (s, 3H, $-\text{H}^{15}$); 3,20-3,25 (m, 1H, $-\text{H}^{4'}$); 3,36-3,45 (m, 3H, $-\text{H}^{3'}$, $-\text{H}^{5'}$, $-\text{H}^{6'}$); 3,68-3,71 (m, 1H, $-\text{H}^{6'}$); 3,89 (td, $J = 9,1; 5,9$ Hz, 1H, $-\text{H}^{2'}$);

3,99 (s, 2H, $-\text{H}^{11}$); 4,59 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, $-\text{OH}^{6'}$); 5,14 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, $-\text{OH}^{4'}$); 5,25 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, $-\text{H}^{12}$); 5,28-5,34 (m, 3H, $-\text{H}^{1'}$, $-\text{OH}^{1'}$, $-\text{OH}^{3'}$); 8,33 (s, 1H, $-\text{H}^8$); 8,38 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, $-\text{H}^{10}$).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 17,90 (C^{15}); 25,45 (C^{14}); 37,94 (C^{11}); 60,90 (C^6); 69,74 (C^4); 71,40 (C^2); 77,03 (C^3); 80,03 (C^5); 82,82 (C^1); 118,14 (C^5); 121,21 (C^{12}); 134,01 (C^{13}); 140,07 (C^8); 149,93 (C^4); 153,26 (C^2); 154,68 (C^6).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-{2-chloro-6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (16)



Světle žlutá pevná látka.

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_5\text{O}_5$.

Výtěžek (%): 51,0.

α_D^{25} (°): 25,2 ($c = 0,5$ g/dl).

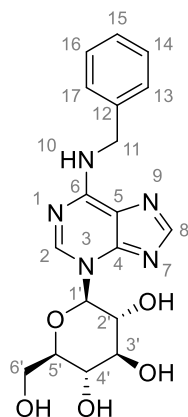
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 22,38; 99,1.

ESI⁺-MS m/z : 400,7 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,66 (s, 3H, $-\text{H}^{14}$); 1,71 (s, 3H, $-\text{H}^{15}$); 3,45-3,56 (m, 3H, $-\text{H}^{3'}$, $-\text{H}^{6'}$); 3,69 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, $-\text{H}^{5'}$); 3,75 (s, 1H, $-\text{H}^{4'}$); 3,96-4,03 (m, 2H, $-\text{H}^{11}$); 4,09 (td, $J = 9,1; 3,8$ Hz, 1H, $-\text{H}^{2'}$); 4,57 (s, 1H, $-\text{OH}^{4'}$); 4,67 (s, 1H, $-\text{OH}^{6'}$); 5,02 (s, 1H, $-\text{OH}^{3'}$); 5,24 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, $-\text{H}^{12}$, $-\text{OH}^{2'}$); 5,29 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, $-\text{H}^{1'}$); 8,29 (s, 1H, $-\text{H}^8$); 8,40 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, $-\text{H}^{10}$).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 17,91 (C^{15}); 25,46 (C^{14}); 37,95 (C^{11}); 60,47 (C^6); 68,62 (C^4); 69,13 (C^2); 73,76 (C^3); 78,47 (C^5); 82,86 (C^1); 117,93 (C^5); 121,22 (C^{12}); 134,01 (C^{13}); 139,57 (C^8); 150,03 (C^4); 153,34 (C^2); 154,69 (C^6).

(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-[6-(benzylamino)-3*H*-purin-3-yl]-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (17)



Bílá pevná látka.

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$.

Výtěžek (%): 10,5.

α_D^{25} ($^\circ$): 5,6 ($c = 0,5$ g/dl).

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 18,66; 99,9.

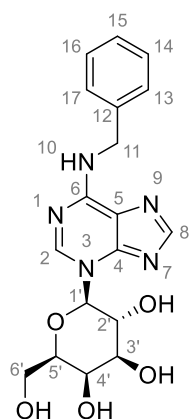
ESI⁺-MS m/z : 388,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

NMR - dvě tautomerní formy v poměru 2,5:1*:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,37-3,43 (m, $-\text{H}^{3'}$, $-\text{H}^{3'*}$, $-\text{H}^{4'}$, $-\text{H}^{4'*}$, $-\text{H}^{6'}$, $-\text{H}^{6'*}$); 3,64-3,71 (m, $-\text{H}^{6'}$, $-\text{H}^{6'*}$); 4,07-4,14 (m, $-\text{H}^{2'}$, $-\text{H}^{2'*}$); 4,60 (s, $-\text{OH}^{6'}$, $-\text{OH}^{6'*}$); 4,73-4,89 (m, $-\text{H}^{11}$); 5,19 (m, $-\text{OH}^{3'}$, $-\text{OH}^{3'*}$, $-\text{OH}^{4'}$, $-\text{OH}^{4'*}$); 5,29-5,37 (m, $-\text{OH}^{2'}$, $-\text{OH}^{2'*}$); 5,41 (d, $J = 4,6$ Hz, $-\text{H}^{11}$); 5,66 (d, $J = 9,2$ Hz, $-\text{H}^{1'}$, $-\text{H}^{1'*}$); 7,20-7,23 (m, $-\text{H}^{15}$, $-\text{H}^{15*}$); 7,28-7,31 (m, $-\text{H}^{14}$, $-\text{H}^{14*}$, $-\text{H}^{16}$, $-\text{H}^{16*}$); 7,33 (d, $J = 7,9$ Hz, $-\text{H}^{13}$, $-\text{H}^{17}$); 7,37 (d, $J = 7,6$ Hz, $-\text{H}^{13*}$, $-\text{H}^{17*}$); 7,75 (s, $-\text{H}^8$, $-\text{H}^{8*}$); 8,54 (m, $-\text{H}^2$, $-\text{H}^{2*}$); 8,90 (t, $J = 6,7$ Hz, $-\text{H}^{10*}$); 9,18 (s, 1H, $-\text{H}^{10}$).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43,39 (C^{11}); 45,65 (C^{11*}); 60,91 (C^6); 61,20 (C^{6*}); 69,55 ($\text{C}^{4'}$); 69,74 ($\text{C}^{4'*}$); 70,76 ($\text{C}^{2'}$, $\text{C}^{2'*}$); 76,69 (C^{3*}); 77,00 ($\text{C}^{3'}$); 80,37 (C^{5*}); 80,43 (C^5); 87,35 (C^{1*}); 87,84 (C^1); 119,08 (C^{5*}); 120,57 (C^5); 126,78 (C^{15}); 126,84 (C^{15*}); 127,15 (C^{13} , C^{17}); 127,34 (C^{13*} , C^{17*}); 128,24 (C^{14} , C^{14*} , C^{16} , C^{16*}); 139,35 (C^{12}); 139,61 (C^{12*}); 141,78 (C^{2*}); 142,53 (C^2); 148,93 (C^4); 150,96 (C^{4*}); 152,15 (C^8); 152,35 (C^{8*}); 152,96 (C^6); 153,46 (C^{6*}).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-[6-(benzylamino)-3H-purin-3-yl]-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (18)



Světle žlutá pevná látka.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁N₅O₅.

Výtěžek (%): 17,4.

α_D^{25} (°): 7,8 (c = 0,5 g/dl).

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 95,6.

ESI⁺-MS m/z: 388,6 [M+H]⁺.

NMR - dvě tautomerní formy v poměru 2,5:1*:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,47-3,48 (m, -H^{6'}, -H^{6*}); 3,52-3,57 (m, -H^{3'}, -H^{3*}, -H^{6'}, -H^{6*}); 3,69 (t, *J* = 6,1 Hz, -H^{5'}, -H^{5*}); 3,75 (s, -H^{4'}, -H^{4*}); 4,20-4,27 (m, 1H, -H^{2'}, -H^{2*}); 4,71-4,81 (m, -H¹¹, -OH^{4'}, -OH^{4*}, -OH^{6'}, -OH^{6*}); 5,06 (s, -OH^{3'}, -OH^{3*}); 5,34 (qd, *J* = 15,0; 7,1 Hz, -H^{11*}, -OH^{2'}, -OH^{2*}); 5,66 (d, *J* = 9,2 Hz, -H^{1'}); 5,68 (d, *J* = 8,9 Hz, -H^{1*}); 7,20-7,24 (m, -H¹⁵, -H^{15*}); 7,30 (td, *J* = 7,6; 1,6 Hz, -H¹⁴, -H^{14*}, -H¹⁶, -H^{16*}); 7,35 (d, *J* = 7,3 Hz, -H¹³, -H¹⁷); 7,38 (d, *J* = 7,6 Hz, -H^{13*}, -H^{17*}); 7,75 (s, -H⁸); 7,76 (s, -H^{8*}); 8,46 (s, -H^{2*}); 8,57 (s, -H²); 8,94 (t, *J* = 7,0 Hz, -H^{10*}); 9,20 (s, -H¹⁰).

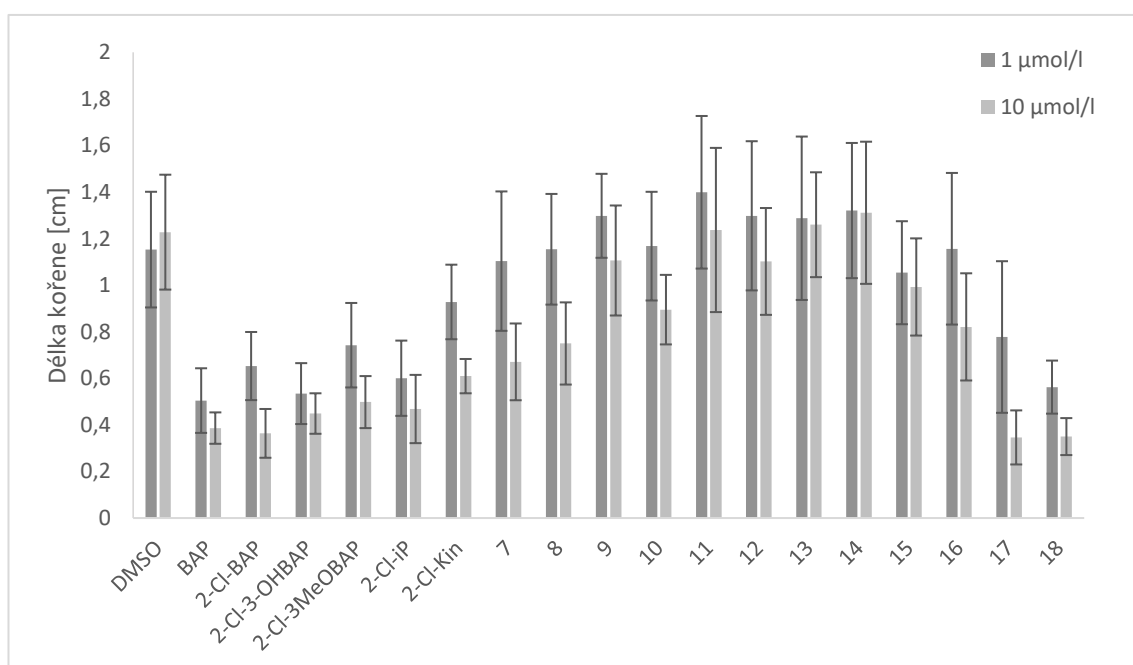
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43,47 (C¹¹); 45,68 (C^{11*}); 60,44 (C^{6'}, C^{6*}); 68,81 (C^{2'}, C^{2*}, C^{4'}, C^{4*}); 73,68 (C^{3'}, C^{3*}); 78,71 (C^{5'}, C^{5*}); 87,74 (C^{1*}); 88,26 (C^{1'}); 119,09 (C^{5*}); 120,66 (C⁵); 126,88 (C¹⁴, C¹⁶); 126,95 (C^{14*}, C^{16*}); 127,29 (C¹³, C¹⁷); 127,41 (C^{13*}, C^{17*}); 128,34 (C¹⁵, C^{15*}); 139,42 (C¹²); 139,66 (C^{12*}); 141,51 (C^{2*}); 142,22 (C²); 148,87 (C⁴); 150,90 (C^{4*}); 152,15 (C⁸); 152,30 (C^{8*}); 153,11 (C⁶); 153,62 (C^{6*}).

4.2 Testování biologické aktivity

Cytokiny jakožto rostlinné hormony ovlivňují v rostlinách řadu biologických a fyziologických procesů, například stimulují buněčné dělení a diferenciaci, oddalují listovou senescenci či jsou zodpovědné za reakce rostlin na abiotický či biotický stres (Zürcher a Müller, 2016). Mimo jiné mají vliv i na vývoj a architekturu kořene. U semenáčků *A. thaliana* kultivovaných na médiu s BAP byly pozorovány výrazné morfologické změny, především inhibice růstu primárního kořene a hypokotylu (Cary a kol., 1995). Bylo zjištěno, že tato inhibice se děje působením ethylenu, jehož produkci indukují cytokiny přítomné v médiu.

Pro zjištění biologické aktivity vybraných sloučenin **7-18** byl zvolen kořenový biotest. Tento experiment probíhal na semenáčcích *A. thaliana* (ekotyp Columbia 8), které byly kultivovány na ½ MS médiu společně s látkami **7-18** rozpuštěnými v DMSO ve finální koncentraci 1 a 10 μmol/l, přičemž cílem bylo zjistit, jestli testované látky jsou

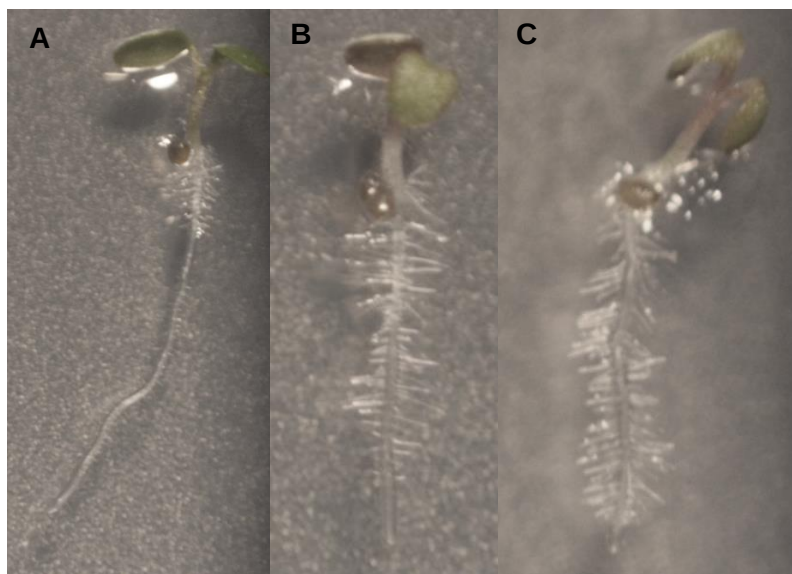
schopny inhibovat růst kořene (Graf 1). U rostlin, které byly kultivovány pouze v přítomnosti DMSO, dosahovala délka kořene v průměru 1,2 cm, přičemž u pozitivních kontrol (odpovídající volné báze) testovaných v koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ se pohybovala pouze v rozmezí od 0,5 do 0,9 cm. Ještě silnější efekt na zkrácení kořene byl pozorován u pozitivních kontrol při 10 $\mu\text{mol/l}$. Připravené *N*9-glykosidy (**7-16**) byly při koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ neaktivní nebo téměř neaktivní, zatímco při vyšší koncentraci látky **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12** a **16** způsobily zkrácení primárního kořene. Nejvíce redukci délky kořene způsobily **7** a **8**, kde v porovnání s negativní kontrolou byly kořeny pouze poloviční (0,6 a 0,7 cm). Nejvýraznější účinek na zkrácení délky hlavního kořene vykazovaly *N*3-glykosidy (**17** a **18**). Jejich vliv byl v obou testovaných koncentracích srovnatelný s účinkem odpovídající pozitivní kontroly, konkrétně BAP.



Graf 1. Kořenový biotest na semenáčcích *A. thaliana* kultivovaných 6 dní na $\frac{1}{2}$ MS médiu s přidavkem testovaných látek (7-18**).** Připravené sloučeniny **7-18** byly společně s pozitivními kontrolami (odpovídající volné báze) testovány v koncentracích 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Jako negativní kontrola byl použit DMSO. BAP - *N*⁶-benzyladenin; 2-Cl-BAP – 2-chlor-*N*⁶-benzyladenin; 2-Cl-3-OHBAP – 2-chlor-6-(3-hydroxybenzylamino)purin; 2-Cl-3-MeOBAP – 2-chlor-6-(3-methoxybenzylamino)purin; 2-Cl-iP – 2-chlor-*N*⁶-isopentenyladenin; 2-Cl-Kin – 2-chlorkinetin.

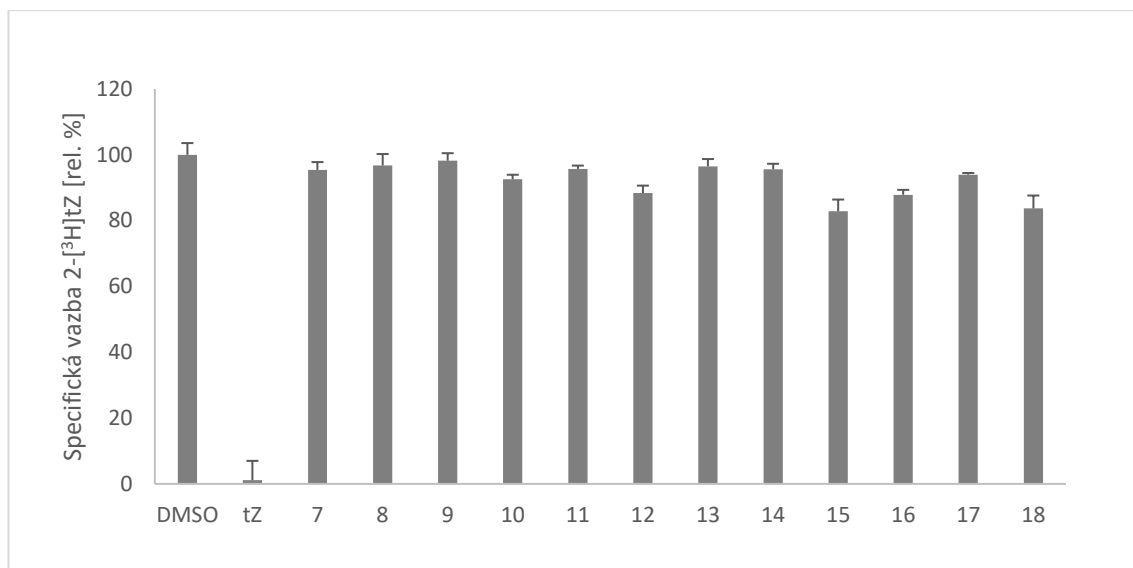
Další pozorovanou morfologickou změnou byl větší výskyt laterálních kořenů. Přestože bylo v roce 2007 publikováno, že cytokininy prostřednictvím exprese auxinových transportních proteinů PIN1 inhibují iniciaci a zpožďují vývoj laterální kořenů, respektive jej zastavují v určitých vývojových fázích, bylo u rostlin ošetřených **17**, **18** a BAP (1 $\mu\text{mol/l}$) v porovnání s DMSO a ostatními látkami pozorováno větší množství postranních kořenů (Obr. 25) (Laplaze a kol., 2007). Z tohoto důvodu byly

tyto semenáčky zamražené a budou v nich dále stanovovány hladiny jednotlivých fytohormonů.



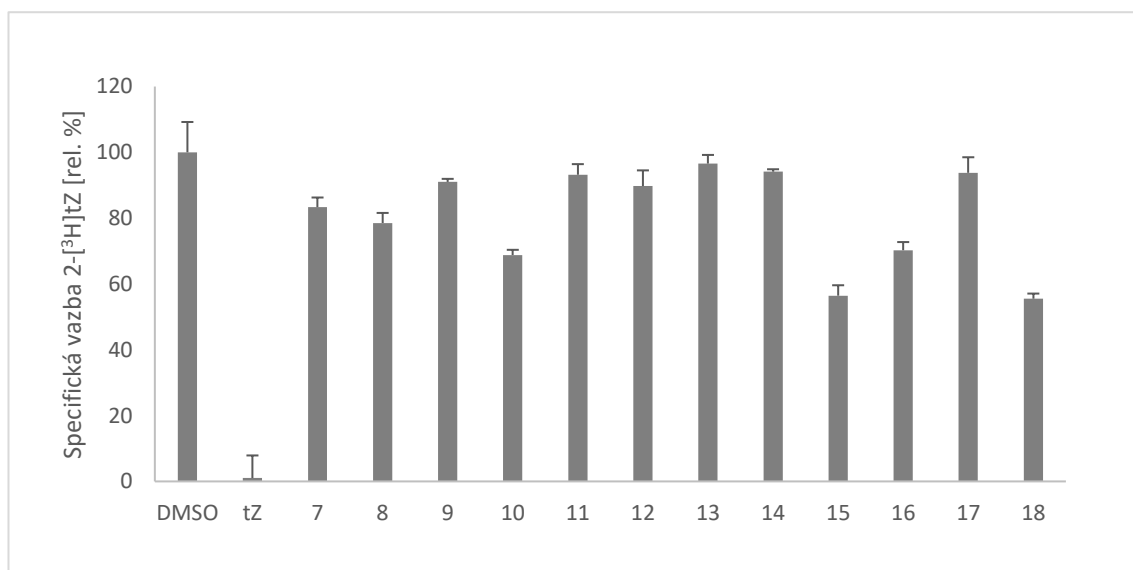
Obr. 25. Detail kořenů semenáčků *A. thaliana* z kořenového biotestu kultivovaných 6 dní na ½ MS médiu s přidavkem odpovídajících látek. A – DMSO; B – BAP (1 μmol/l); C – **17** (1 μmol/l).

Získané výsledky korelují s dříve publikovanými daty, které ukazují, že v rámci cytokininových glukosidů vykazují biologickou aktivitu pouze *N3*-isomery (Gasque, 1982, Letham a kol., 1983). Dále bylo publikováno, že cytokininové *N3*-glukosidy podléhají na rozdíl od *N7*- a *N9*-glukosidů hydrolýze β -glukosidasou za poskytnutí volné báze (Brzobohatý a kol., 1993, Letham a kol., 1975). Z tohoto důvodu není zcela jasné, jestli vykazují aktivitu *per se* nebo se projevuje aktivita volné báze po jejich metabolické přeměně uvnitř rostlin. Proto byly dále připravené sloučeniny testovány v kompetičním ligand-vazebném testu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z *A. thaliana*, který je založen na soupeření mezi testovanou látkou a radioaktivně značeným 2-[^3H]tZ o vazebné místo receptoru, přičemž se měří zbytková radioaktivita. Jeho výhodou oproti kořenovému testu je, že se jedná o *in vitro* experiment, kde kultivace buněčné kultury s testovanou látkou probíhá při 4 °C pouze po dobu 30 minut, čímž by měly být potlačeny její metabolické konverze (Romanov a kol., 2005). Ze získaných výsledků vyplývá, že vybrané sloučeniny **7-18** nevykazovaly žádnou afinitu k cytokininovému receptoru AHK3 (Graf 2).



Graf 2. Kompetiční ligand-vazebný test na cytokininovém receptoru AHK3 z *A. thaliana*. Látky 7-18 byly testovány v koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a pozitivní kontrola tZ v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.

Na druhou stranu mírnou schopnost kompetovat s 2-[^3H]tZ o vazebné místo receptoru CRE1/AHK4 měly látky **10**, **15**, **16** a **18** (69 %, 56 %, 70 % a 55 % reziduální radioaktivity) (Graf 3). Nejlepším ligandem u N9-glykosidů byla látka **15**, což mohlo být způsobeno tím, že se jedná o derivát odvozený od N^6 -isopentenyladeninu, který vykazuje poměrně vysokou afinitu vůči CRE1/AHK4 (Romanov a kol., 2006). Schopnost vyvázat 2-[^3H]tZ měly dále **16** a **10**, což jsou galaktosidy odvozené od iP, respektive *mT*. Přičemž u *mT* bylo ukázáno, že byl z testovaných aromatických cytokininů nejlépe schopen aktivovat signální dráhu u *A. thaliana* (Spíchal a kol., 2004).



Graf 3. Kompetiční ligand-vazebný test na cytokininovém receptoru AHK4 z *A. thaliana*. Látky 7-18 byly testovány v koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a pozitivní kontrola tZ v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.

Zatímco látka **17** nevykazovala téměř žádnou afinitu k receptorům, nejlepším ligandem ze všech testovaných látek na CRE1/AHK4 byla sloučenina **18**. Jejich jediným strukturním rozdílem je orientace hydroxylové skupiny na cukerné jednotce v poloze 4'. Z toho důvodu by bylo zajímavé připravit další deriváty cytokininových N3-galaktosidů a ověřit jejich interakci s cytokininovými receptory. Dále by bylo vhodné látky **10**, **15**, **16** a **18** otestovat v *in vivo* ARR5:GUS receptorovém testu, kde by se ukázalo, jestli jsou kromě interakce s receptory také schopny aktivovat následnou signální kaskádu.

Ačkoli nebyla látka **17** testována na receptoru AHK2, dosažené výsledky ukazují na to, že s největší pravděpodobností byla biologická aktivita způsobena volnou bází, která vznikla *in vivo* odštěpením cukerné jednotky.

Dále byla u **7-18** zjišťována *in vitro* toxicita na nenádorových lidských buněčných liniích HaCat, BJ a APRE-19. Hodnocení biotestu bylo provedeno fluorimetricky pomocí resazurin redukčního testu, přičemž žádná z testovaných látek nebyla toxická ani při koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$. Výsledek cytotoxicity může být zavádějící vzhledem k povaze testovaných sloučenin, jelikož není jisté, zda došlo k jejich proniknutí do intracelulárního prostoru, jestli se projevil jejich skutečný cytotoxický efekt.

5 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala syntézou a biologickou aktivitou cukerných konjugátů cytokininů, konkrétně *N*3-, *N*7- a *N*9-glykosidů. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na cukerné konjugáty, konkrétně cytokininový metabolismus, signalizaci, transport, lokalizaci, chemickou přípravu cytokininových *N*-glykosidů a jejich biologickou aktivitu.

V experimentální části bylo připraveno 12 cytokininových konjugátů odvozených převážně od aromatických cytokininů 2-chlor-Kin, BAP, 2-chlor-BAP, 2-chlor-*m*T a 2-chlor-*meta*-methoxytopolinu s glukosovou a galaktosovou cukernou jednotkou připojenou na dusíkové atomy *N*3 a *N*9 purinového skeletu. Všechny připravené látky byly charakterizovány dostupnými fyzikálně-chemickými metodami.

Jejich biologická aktivita byla testována v kořenovém biotestu na semenáčcích *A. thaliana*. Zatímco *N*9-glukosidy inhibovaly délku kořene jen nepatrně, a to pouze při vyšších koncentracích, *N*3-glykosidy vykazovaly obdobnou aktivitu jako BAP. Dále se ukázalo, že rostliny kultivované na médiu s látkami **17**, **18** a BAP v koncentraci 1 μmol/l měly větší množství laterálních kořenů než rostliny inkubované s jinými látkami. Látky byly také testovány v kompetičním ligand-vazebném testu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z *A. thaliana*. Na receptor AHK3 se nevázala žádná látka, zatímco na receptor CRE1/AHK4 se v menší míře vázaly sloučeniny **10**, **15**, **16** a **18**. Jelikož látka **17** nebyla schopna interagovat ani s jedním z cytokininových receptorů, je pravděpodobně její biologická aktivita způsobena BAP uvolněním *in vivo* ze **17** prostřednictvím β-glukosidasy. Vzhledem k tomu, že *N*3-glykosidy jsou poměrně dobře rozpustné, mohly by být v budoucnu uplatněny například jako profarmaka pro aplikaci v rostlinných biotechnologiích.

6 Seznam použité literatury

- Aesculab 1 – Vazebný test ligand-receptor s živými buňkami – vsádková metoda.
<http://www.aesculab.upol.cz/ModuleView.aspx?Id=634326849994459119P>
(staženo 21. 2. 2018)
- Bajguz A., Piotrowska A. (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.
- Bassil N. V., Mok D. W. S., Mok M. C. (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **102**, 867-872.
- Bradley D., Williams G., Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W. B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**, 13-26.
- Caesar K., Thamm A. M. K., Witthoeft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **62**, 5571-5580.
- Cary A. J., Liu W., Howell S. H. (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Cowley D., Duke C., Liepa A., Macleod J., Letham D. (1978) The structure and synthesis of cytokinin metabolites I. The 7- and 9- β -D-glucofuranosides and pyranosides of zeatin and 6-benzylaminopurine. *Aust. J. Chem.* **31**, 1095-1111.
- Doležal K., Popa I., Kryštof V., Spíchal L., Fojtíková M., Holub J., Lenobel R., Schmülling T., Strnad M. (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Biorg. Med. Chem.* **14**, 875-884.
- Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375-381.

- Floyd N., Vijayakrishnan B., Koeppe A. R., Davis B. G. (2009) Thiyl glycosylation of olefinic proteins: S-linked glycoconjugate synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7798-7802.
- Frébort I., Kowalská M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121-130.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Pec P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.* **268**, 450-461.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Kollmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255-267.
- Gasque C. E. (1982) Comparison of cytokinin activities of 9-substituted N^6 -benzyladenines in the *Cucumis* and *Amaranthus* bioassays. *Phytochemistry* **21**, 1501-1507.
- Haberlandt G. (1913) Zur physiologie der zellteilung. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Berlin, Phys. Math. Kl.* 318-345.
- Hashizume T., Yoshida K. (1976) Glycosylation of N^6 -benzyladenine by fusion procedure using bis-(p-nitrophenyl)hydrogen phosphate. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 2001-2004.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75-83.
- Hluska T., Šebela M., Lenobel R., Frébort I., Galuszka P. (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin *cis-trans* isomerase in plants. *Front. Plant Sci.* **8**, 1473.
- Hocek M., Šilhár P., Shih I. h., Mabery E., Mackman R. (2006) Cytostatic and antiviral 6-aryl-purine ribonucleosides. Part 7: Synthesis and evaluation of 6-substituted purine l-ribonucleosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5290-5293.
- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1973) A new cytokinin from populus robusta. *Tetrahedron Lett.* **14**, 2827-2828.
- Hou B. K., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004) N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822-47832.

- Hwang D., Chen H. C., Sheen J. (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**, 500-515.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Ishida K., Yamashino T., Mizuno T. (2008) Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene ARR9 is regulated by the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **72**, 3025-3029.
- Jin S. H., Ma X. M., Kojima M., Sakakibara H., Wang Y. W., Hou B. K. (2013) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through O-glucosylation. *Planta* **237**, 991-999.
- Jiskrová E., Novák O., Pospíšilová H., Holubová K., Karády M., Galuszka P., Robert S., Frébort I. (2016) Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. *New Biotechnol.* **33**, 735-742.
- Keshishian E. A., Rashotte A. M. (2015) Plant cytokinin signalling. *Plant Hormone Signalling* **58**, 13-27.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 814-819.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010) Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53-60.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3152.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennett M. (2007) Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell* **19**, 3889-3900.
- Letham D. S., Wilson M. M., Parker C. W., Jenkins I. D., Macleod J. K., Summons R. E. (1975) Regulators of cell division in plant tissues XXIII. The identity of an unusual metabolite of 6-benzylaminopurine. *Biochim. Biophys. Acta* **399**, 61-70.

- Letham D. S., Palni L. M. S., Tao G. Q., Gollnow B. I., Bates C. M. (1983) Regulators of cell division in plant tissues XXIX. The activities of cytokinin glucosides and alanine conjugates in cytokinin bioassays. *J. Plant Growth Regul.* **2**, 103-115.
- McGaw B. A., Heald J. K., Horgan R. (1984) Dihydrozeatin metabolism in radish seedlings. *Phytochemistry* **23**, 1373-1377.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Vonsaltza M. H., Strong F. M. (1955a) Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2662-2663.
- Miller C. O., Skoog F., Vonsaltza M. H., Strong F. M. (1955b) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1392.
- Miller C. O. (1961) Kinetin-like compound in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 170-174.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16598-16603.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89-118.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971) Conversion of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in *Tabacco* tissue. *Plant Physiol.* **48**, 775-778.
- Piotrowska A., Bajguz A. (2011) Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**, 2097-2112.
- Ricci A., Bertolotti C. (2009) Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. *Plant Biol.* **11**, 262-272.
- Romanov G. A., Spíchal L., Lomin S. N., Strnad M., Schmülling T. (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal. Biochem.* **347**, 129-134.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmülling T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* **57**, 4051-4058.
- Spíchal L., Raková N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling T. (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299-1305.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct. Plant Biol.* **39**, 267-284.

- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.
- Šmehilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T., Galuszka P. (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Front. Plant Sci.* **7**, 1264.
- Tarkowski P., Václavíková K., Novák O., Pertry I., Hanuš J., Whenham R., Vereecke D., Šebela M., Strnad M. (2010) Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **680**, 86-91.
- To J. P. C., Kieber J. J. (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci.* **13**, 85-92.
- Vicha J., Malon M., Vesela P., Humpa O., Strnad M., Marek R. (2010) ^1H -, ^{13}C -, and ^{15}N -NMR chemical shifts for selected glucosides and ribosides of aromatic cytokinins. *Magn. Reson. Chem.* **48**, 318-322.
- Wang J., Ma X.-M., Kojima M., Sakakibara H., Hou B.-K. (2011) N-Glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2200-2213.
- Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.
- Zhang F., Vasella A. (2007) Regioselective synthesis of $1^I, 1^{II}, 5^I, 5^{II}, 6^I, 6^{II}, 6^{II}, 6^{II}$ - $^2\text{H}_8$ -cellobiose. *Carbohydr. Res.* **342**, 2546-2556.
- Zürcher E., Müller B. (2016) Cytokinin synthesis, signaling, and function - advances and new insights. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 324 (Kwang W.J.), 1-38, Academic Press, New York, USA.