

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Syntéza, charakterizace a biologická aktivita caged-fytohormonů s 2-nitrobenzylovou chránicí skupinou

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Noemi Bucharová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Fyziologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Noemi Bucharová
Název práce	Syntéza, charakterizace a biologická aktivita caged-fytohormonů s 2-nitrobenzylovou chránící skupinou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	Diplomová práce je zaměřena na syntézu a charakterizaci vybraných derivátů caged-fytohormonů. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se strukturou a biologickou funkcí cytokininů a auxinů. Dále byl vytvořen přehled všech dosud připravených caged-fytohormonů a jejich aplikací v biologických výzkumech. V experimentální části byly připraveny deriváty cytokininů a auxinů s třemi typy fotolabilních chránících skupin odvozených od 2-nitrobenzylu. Připravené látky byly charakterizovány dostupnými fyzikálně-chemickými metodami a následně byla studována jejich fotolýza vlivem působení UV záření. Biologická aktivita vybraných caged-fytohormonů byla testována pomocí <i>ARR5::GUS</i> a <i>DR5::GUS</i> biotestu, kompetičního receptorového testu a interakce s cytokinindehydrogenasou.
Klíčová slova	2-nitrobenzyl, <i>ARR5::GUS</i> test, biologická aktivita, caged-fytohormony, deriváty fytohormonů, <i>DR5::GUS</i> test, fotolabilní chránící skupiny, syntéza
Počet stran	104
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Noemi Bucharová
Title	Synthesis, characterization and biological activity of caged-phytohormones with 2-nitrobenzyl protecting group
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>This master thesis deals with synthesis and characterization of selected caged-phytohormone derivatives. In theoretical part, current knowledge of structure and biological activity of cytokinins and auxins is summarized. In addition, list of caged-phytohormones previously synthesized and used in biological studies is outlined. In experimental part, cytokinin and auxin derivatives with three 2-nitrobenzyl-derived photolabile protecting groups were prepared. Physico-chemical properties of the compounds and their photolysis upon UV irradiation was investigated. Biological activity of selected compounds was also examined in <i>ARR5::GUS</i>, <i>DR5::GUS</i>, ligand binding assay and cytokinin dehydrogenase inhibition assay.</p>
Keywords	2-nitrobenzyl, <i>ARR5::GUS</i> assay, biological activity, caged-phytohormones, phytohormone derivatives, <i>DR5::GUS</i> assay, photolabile protecting groups, synthesis
Number of pages	104
Number of appendices	3
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Noemi Bucharová

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Mikovi Ph.D. za mnohé odborné informace a užitečné rady, trpělivé vedení při práci v laboratoři i následném sepsisování této práce. Poděkování patří také celému kolektivu laboratoře organické syntézy na Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná, zejména Mgr. Tomáši Popíšilovi, Ph.D. za poskytované cenné rady, dále také Mgr. Zuzaně Mičkové za asistenci a praktické provedení vybraných biotestů, a týmu „HPLC-MS“ za pomoc při měření a zpracování dat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala kolegům z oddělení biofyziky, zejména Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za ochotné zapůjčení UV lampy.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod a cíle práce	11
1 Cytokininy	13
1.1 Struktura	13
1.2 Metabolismus	15
1.3 Transport a signalizace	15
1.4 Biologická aktivita	18
1.4.1 Vývoj kořene a prýtu	19
1.4.2 Listová senescence	20
2 Auxiny	21
2.1 Struktura	21
2.2 Metabolismus	22
2.3 Transport a signalizace	23
2.4 Biologická aktivita	25
2.4.1 Tropismy	26
2.4.2 Expanze buněk	26
3 Caging a caged-fytohormony	27
3.1 Fotolabilní chránící skupiny	28
3.2 Caged-fytohormony	30
3.2.1 Kyselina abscisová	30
3.2.2 Gibereliny	32
3.2.3 Kyselina jasmonová	33
3.2.4 Kyselina salicylová	33
3.2.5 Cytokininy	34
3.2.6 Auxiny	35
4 Materiál a metody	38
4.1 Chemikálie	38
4.2 Metody	38
4.3 Syntéza	40
4.3.1 Příprava prekurzorů pro caged-fytohormony a příprava dvoufotonové chránící skupiny	40
4.3.2 Obecný postup pro přípravu caged-cytokininů (látka 7-35)	43
4.3.3 Obecný postup pro přípravu caged-auxinů (látka 36-41)	44

4.3.4	Příprava caged-fytohormonů s dvoufotonovou fotolabilní chránicí skupinou	45
4.4	Studium fotolýzy připravených caged-fytohormonů.....	46
4.5	Biologická aktivita	47
4.5.1	<i>ARR5::GUS</i> biotest.....	47
4.5.2	Kompetiční receptorový test	48
4.5.3	<i>DR5::GUS</i> biotest.....	48
4.5.4	Interakce s CKX.....	48
5	Výsledky a diskuze	49
5.1	Syntéza	49
5.1.1	Příprava prekurzorů pro caged-fytohormony a příprava dvoufotonové chránicí skupiny.....	49
5.1.2	Příprava caged-cytokininů	52
5.1.3	Příprava caged-auxinů.....	65
5.1.4	Příprava caged-fytohormonů s dvoufotonovou chránicí skupinou	69
5.2	Studium fotolýzy připravených caged-fytohormonů.....	70
5.3	Biologická aktivita	74
5.3.1	<i>ARR5::GUS</i> biotest.....	74
5.3.2	Kompetiční receptorový test	76
5.3.3	<i>DR5::GUS</i> biotest.....	77
5.3.4	Interakce s CKX.....	78
6	Závěr	80
7	Seznam použité literatury	81
	Přílohy A.....	91
	Přílohy B.....	97
	Přílohy C.....	103

Seznam použitých zkratek

2,4-D	2-(2,4-dichlorfenoxy)octová kyselina
6CIP	6-chlor-9 <i>H</i> -purin
ABA	kyselina abscisová
aceton- <i>d</i> ₆	deuterovaný aceton
AHK	histidinkinasový receptor z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AHPs	histidinofototransferové proteiny z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ARF, ARFs	transkripční faktor/y auxinů (auxin response factor/s)
ARR, ARRSs	regulátor/y odpovědi z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	6-benzylamino-9 <i>H</i> -purin, <i>N</i> ⁶ -benzylaminopurin
BPO	benzoyl peroxid
bs	široký singlet
BuOH	butanol
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CK, CKs	cytokinin, cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.2)
CLV	gen CLAVATA
CPIBA	2-(4-chlorfenoxy)isomáselná kyselina
CRF, CRFs	faktor/y odpovědi (cytokinin response factors)
cZ	(<i>Z</i>)-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9 <i>H</i> -purin), <i>cis</i> -zeatin
d	dublet
dd	dublet dubletu
dt	dublet tripletu
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCBA	3,4-dichlorbenzoová kyselina
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DEACM	[7-(diethylamino)kumarin-4-yl]methylová chránící skupina
DHZ	6-(4-hydroxy-3-methylbut-1-ylamino)-9 <i>H</i> -purin, dihydrozeatin
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMNB	4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyllová chránící skupina

DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ekviv.	ekvivalent
ESI ⁺ -MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód
ESI ⁻ -MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, negativní mód
Et ₃ N	triethylamin
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)octová kyselina
IBA	4-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)butanová kyselina, indol-3-máselná kyselina
INCYDE, INC	2-chlor-6-(3-methoxyfenylamino)-9 <i>H</i> -purin
iP	6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9 <i>H</i> -purin, <i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin
IPT	adenylátdimethylallyltransferasa, isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27)
<i>J</i>	interakční konstanta
Kin	6-furfurylaminopurin, kinetin
It	laboratorní teplota
MBAP	6-(3-methoxybenzylamino)-9 <i>H</i> -purin
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MeOH- <i>d</i> ₄	deuterovaný methanol
NB	nitrobenzylová chránící skupina
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOAA	2-(naftalen-1-yloxy)octová kyselina
NPE	1-(2-nitrofenyl)ethylová chránící skupina
PE	petrolether
ppm	parts per million
s	singlet
SAM	stonkový apikální meristém
t	triplet
TCBC	2,4,6-trichlorbenzoyl chlorid
td	triplet dubletu
THF	tetrahydrofuran

TLC	tenkovrstevná chromatografie
tZ	(<i>E</i>)-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9 <i>H</i> -purin, <i>trans</i> -zeatin
WUS	gen WUSCHEL
X-Gluc	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid
δ	chemický posun

Úvod a cíle práce

Cytokiny a auxiny představují jedny z nejvýznamnějších skupin fytohormonů podílejících se na regulaci mnoha procesů nezbytných pro růst a vývoj rostlin. Ačkoliv byly původně objeveny díky svému antagonistickému působení při *in vitro* organogenezi, pozdější výzkumy prokázaly zapojení těchto fytohormonů ve velkém množství dalších fyziologických procesů odehrávajících se v rámci celé rostliny, jako např. kontrola apikální dominance, větvení prýtu, zakládání postranních kořenů či regulace senescence. Studium funkcí rostlinných hormonů bývá nejčastěji založeno na sledování morfologických či metabolických změn po exogenní aplikaci zkoumaných látek nebo pomocí selektovaných mutantních linií. Caged-biomolekuly představují další alternativní způsob jak regulovat množství fytohormonů v daném biologickém systému. Fotolytického uvolnění aktivních látek je docíleno pomocí UV světla, jehož místo působení a dobu ozařování lze snadno specifikovat.

Před samotným vypracováním byly stanoveny cíle této diplomové práce:

- zpracování literární rešerše na téma fytohormony, fotolabilní chránící skupiny a caged-fytohormony
- syntéza vybraných caged-fytohormonů s 2-nitrobenzylou chránící skupinou
- charakterizace připravených látek pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod
- studium fotolýzy připravených caged-fytohormonů
- testování vybraných látek v *in vitro* a *in vivo* systémech

Teoretická část

1 Cytokininy

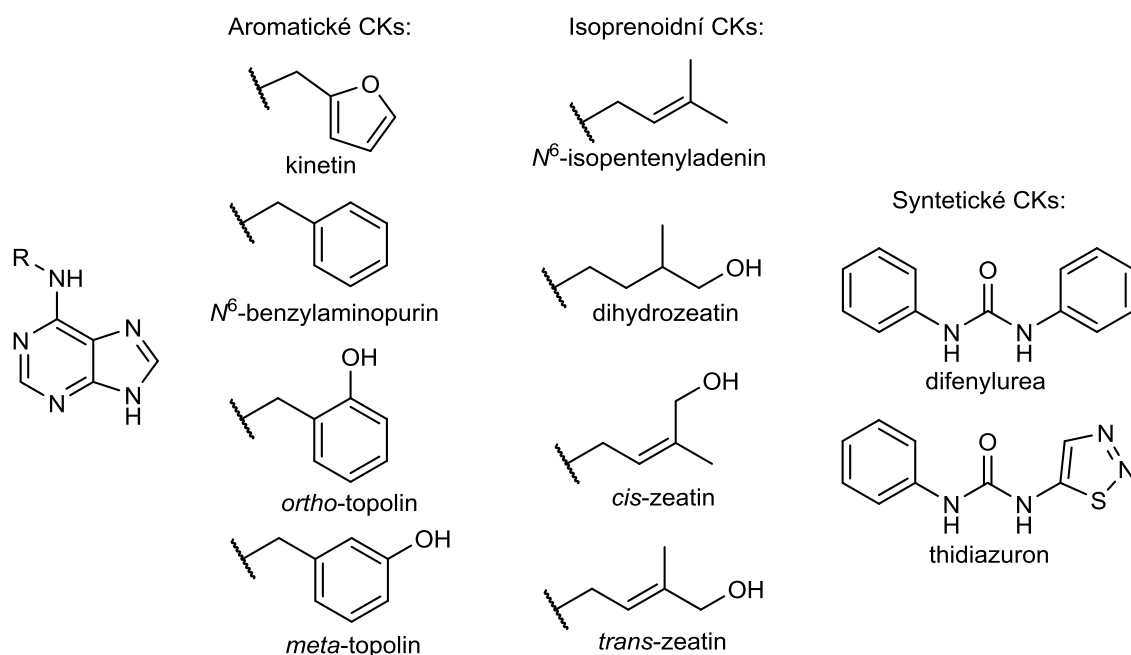
Rostlinné hormony (též fytohormony) jsou skupinou přirozeně se vyskytujících organických látek, které již ve velmi nízkých koncentracích ($1-50 \text{ pmol.g}^{-1}$ čerstvé hmoty) ovlivňují fyziologické procesy v rostlinách. Pro organismus nepředstavují žádné výživové hodnoty, avšak fungují jako signální molekuly, které zprostředkovávají a ovlivňují vývoj rostlin. Na rozdíl od savčích hormonů však nemusí být fytohormony syntetizovány pouze v konkrétním pletivu, ale může se jednat o soubory různých pletiv či jednotlivých buněk, ve kterých dané látky přímo působí nebo jsou dále transportovány do vzdálenějších částí rostliny. V současné době je známo mnoho strukturně odlišných skupin fytohormonů – mezi nejvýznamnější patří cytokininy (CKs), auxiny, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen (Davies, 2010).

Cytokininy byly poprvé objeveny skupinou prof. Skooga v roce 1955 jako faktory nezbytné pro dělení buněk kalusu v přítomnosti auxinů (Miller a kol., 1955). Prvním identifikovaným zástupcem se stal kinetin (6-furfurylaminopurin), izolovaný původně jako degradační produkt DNA ze sledího spermatu (Miller a kol., 1956). O několik let později byla v laboratoři prof. Lethama odhalena struktura prvního přírodního CK, zeatinu (6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9H-purinu), získaného z nezralého endospermu kukuřice (Letham, 1963). Tyto prvotní kroky vedly k objevům velkého počtu přirozených i syntetických látek, které mohou díky své cytokininové aktivitě regulovat růst a vývoj rostlin. Na buněčné úrovni CKs ovlivňují dělení a diferenciaci buněk; v rámci celé rostliny se podílejí na kontrole apikální dominance, oddalují listovou senescenci, regulují transport živin, stimulují vývoj chloroplastů a jsou zapojené v reakcích rostlin na různé typy biotických i abiotických stresů (Werner a Schmölling, 2009).

1.1 Struktura

Z pohledu chemické struktury jsou přirozené cytokininy deriváty adeninu substituované v poloze N^6 dvěma typy vedlejších řetězců (Obrázek 1). Isoprenoidní CKs obsahují nasycený nebo nenasycený alifatický řetězec isoprenoidního původu, zatímco druhá skupina nese heterocyklický furfurylový zbytek, benzyl nebo hydroxylovaný benzyl.

Dalším specifickým typem cytokininů jsou syntetické deriváty fenylmočoviny, které byly původně objeveny v kokosovém mléce, avšak jejich přirozených výskyt v rostlinách nebyl prozatím potvrzen (Mok a kol., 1982; Takahashi a kol., 1978).



Obrázek 1. Přehled vybraných struktur cytokininů.

Isoprenoidní

Skupinu isoprenoidních cytokininů lze dále dělit podle přítomnosti a pozice hydroxylové skupiny na vedlejší řetězci, která může ovlivňovat aktivitu či stabilitu molekuly. Za nejrozšířenější přírodní CKs bývají považovány *trans*-zeatin (tZ; (*E*)-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9*H*-purin) a *N*⁶-isopentenyladenin (iP; 6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9*H*-purin), avšak jejich koncentrace se může v různých druzích rostlin či vývojových stádiích lišit (Sakakibara, 2006). Snížená biologická stabilita tZ a iP je dána jejich náchylností k degradaci cytokinindehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.2).

Dalším typem isoprenoidních cytokininů je isomerní forma *trans*-zeatinu, *cis*-zeatin (cZ, (*Z*)-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9*H*-purin), který je v dvouděložných rostlinách méně běžný, avšak je dominantním typem zeatinu v obilovinách a trávách. Posledním zástupcem isoprenoidních cytokininů je dihydrozeatin (DHZ; 6-(4-hydroxy-3-methylbut-1-ylamino)-9*H*-purin), který jako jediný obsahuje nasycený postranní řetězec.

Aromatické

Isoprenoidní cytokininy byly zpočátku považovány za jediné endogenní látky z této skupiny fytohormonů. Tato domněnka byla vyvrácena objevem topolinů – hydroxylovaných derivátů *N*⁶-benzylaminopurinu (BAP; 6-benzylamino-9*H*-purin), které byly izolovány např. z listů topolu (*Populus x robusta* Schneid) (Horgan a kol., 1975; Strnad a kol., 1992) a huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Tarkowská a kol., 2003). V rostlinách byly aromatické CKs nalezeny nejen ve formě

volných bází, ale i jako nukleosidy, nukleotidy a glukosidy, což potvrzuje pravděpodobnou shodu části metabolických drah s isoprenoidními cytokininy (Strnad, 1997).

1.2 Metabolismus

Výskyt konkrétních typů cytokininů a jejich distribuce v organismu není v přírodě univerzální - liší se u různých druhů rostlin, tkání a mění se v průběhu vývoje rostliny. Ačkoliv je v současné době známo mnoho zástupců CKs, fyziologická funkce každého z nich nebyla prozatím zcela objasněna. Předchozí výzkumy však ukazují, že se cytokininy mohou v rostlině nacházet ve třech formách: jako aktivní molekuly, transportní nebo zásobní formy a inaktivované fytohormony (Sakakibara, 2004).

Volné báze vykazují vysokou biologickou aktivitu a představují tak aktivní formu fytohormonu. Příslušné ribosidy a ribotidy (1-3 fosfátové jednotky) bývají označovány jako transportní formy cytokininů. Z hlediska aktivace receptoru reagují výrazněji pouze tZ-ribosid a tZ-ribosid 5'-monofosfát s isoformou receptoru AHK3 (Spíchal a kol., 2004).

Hydroxylovaný postranní řetězec tZ, cZ a DZ může být dále modifikovaný O-glykosylací. Změny poměru mezi volnými bázemi a cukernými konjugáty, konkrétně O-glukosidy, v důsledku působení environmentálních faktorů potvrzují, že vazba cukerné složky vede k inaktivaci CK a vzniku zásobní formy (Sakakibara, 2004). Další konjugáty, jako např. N-glukosylové a N-alanylové deriváty, jsou obdobně jako O-glukosidy metabolicky stabilnější než volné báze (McGaw a Horgan, 1983). Biologická aktivita N7-, N9-glukosidů a N9-alanylových CKs je však zanedbatelná a bývají proto označovány jako inaktivní formy cytokininů (Letham a kol., 1983).

Degradace CKs hraje velmi významnou roli v udržování rovnováhy mezi akumulací metabolitů a jejich transportem v rostlinách. Reakce je katalyzována enzymem CKX, který odštěpuje postranní řetězec fytohormonu za vzniku adeninu a příslušného aldehydu. Substrátová specifita jednotlivých isoenzymů CKX z *A. thaliana* se však značně liší – např. enzymy AtCKX2 a 4 degradují isoprenoidní cytokininy (iP, tZ) a jejich ribosidy, zatímco isoenzymy AtCKX1 a 7 preferují glykosidy. O-glukosidy jsou k působení CKX rezistentní (Galuszka a kol., 2007).

1.3 Transport a signalizace

Cytokininy jsou mobilní fytohormony, které mohou působit jak v místě svého vzniku, tak i na delší vzdálenosti. Kromě prosté difuze dochází k aktivnímu toku cytokininů do buňky, avšak specifické transportéry nebyly dosud jednoznačně identifikovány (Cedzich a kol., 2008). Experimenty s proteiny ze skupiny purinových permeas

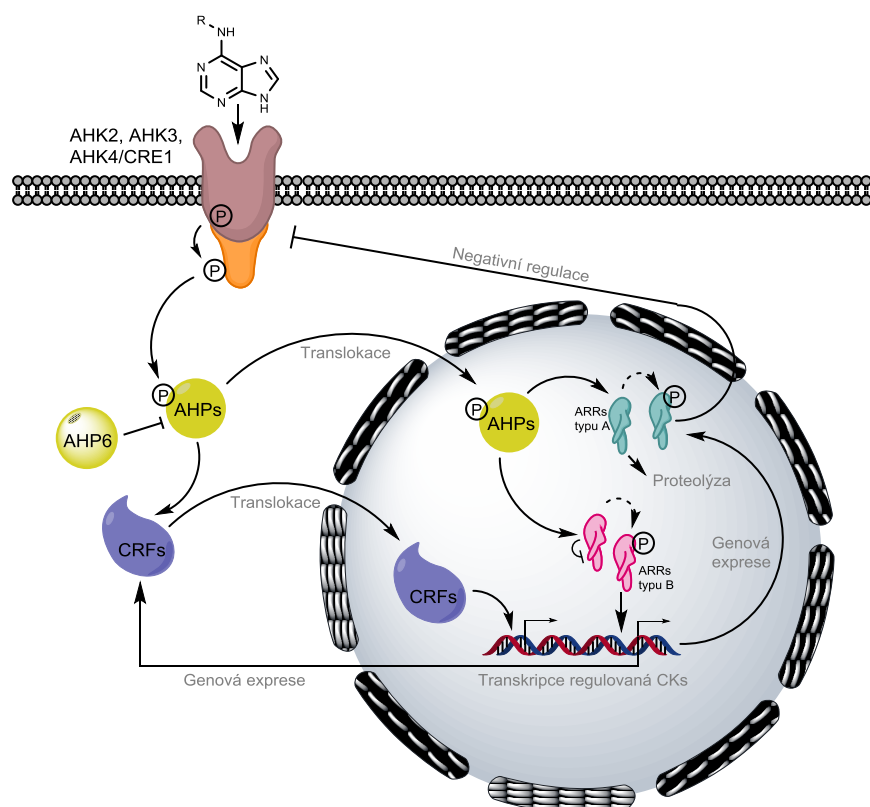
prokázaly jejich schopnost rozpoznávat CKs a přenášet je přes membránu v symportu s protony (Gillissen a kol., 2000). Některé z nich také pravděpodobně hrají roli při vstupu látek do floému (Bürkle a kol., 2003). Jako další potenciální přenašeče CKs byly označeny rovnovážné nukleosidové transportéry objevené v rýži (Hirose a kol., 2005) a *A. thaliana* (Hirose a kol., 2008). Kvůli jejich nízké specifitě a absenci výrazného fenotypového projevu u mutantních rostlin nebývají považovány za příliš významné komponenty regulace vývojových procesů (El-Showk a kol., 2013). V transportu cytokininů na delší vzdálenosti je pravděpodobně také zapojen protein ze skupiny ABC (*Arabidopsis* ATP-binding cassette) transportérů, který je exprimován převážně v kořenech a zprostředkovává přenos CKs xylémem do nadzemních částí rostliny (Ko a kol., 2014; Zhang a kol., 2014).

Velmi nízké koncentrace cytokininů v pletivech a neznalost dalších molekul účastnících se syntézy či přenosu signálu zpočátku znemožňovaly podrobnější studium funkce těchto fytohormonů. Průlom přišel až s objevem genu *CKI1* (CK-independent 1), jehož zvýšená exprese v mutantních rostlinách *A. thaliana* způsobovala odpovědi typické pro přítomnost CKs (Kakimoto, 1996). Navazující experimenty dále potvrdily existenci proteinů zodpovědných za přenos fosfátu (histidinofosfotransferové proteiny z *A. thaliana*, AHPs) (Miyata a kol., 1998; Suzuki a kol., 1998) z receptoru na regulátory odpovědi (*Arabidopsis* response regulators, ARRs) (Imamura a kol., 1998; Sakai a kol., 1998; Urao a kol., 1998), které jakožto transkripční faktory aktivují expresi primárních genů pro cytokininy. První CK receptor, později označený jako CRE1/AHK4/WOL, byl však objeven až o několik let později (Inoue a kol., 2001; Suzuki a kol., 2001). Analýzy genomu *A. thaliana* následně odhalily existenci dalších dvou receptorů, AHK2 a AHK3 (Yamada a kol., 2001). Ačkoliv byla potvrzena lokalizace receptorů na plazmatické membráně (Kim a kol., 2006), nedávné výzkumy odhalily jejich možný výskyt v endoplazmatickém retikulu kukuřice (Lomin a kol., 2011) i *A. thaliana* (Caesar a kol., 2011; Wulfetange a kol., 2011).

Přenos a zpracování CK signálu bývá také označováno jako dvoukomponentní signalizační systém, který zahrnuje několikastupňovou fosforylaci a je velmi podobný signálním kaskádám probíhajícím v prokaryotech (Obrázek 2) (Hwang a Sheen, 2001). Vazbou CK na extracelulární CHASE (cyclases/histidine kinases-associated sensing extracellular) doménu histidinkinasového receptoru (Anantharaman a Aravind, 2001) dochází k jeho dimerizaci a následné autofosforylaci na histidinovém zbytku. Fosfát je poté přenesen na aspartát téhož proteinu a dále na histidin přítomný v molekule AHPs (AHP1-5). Výjimku však představuje AHP6, který neobsahuje konzervovaný histidinový zbytek a působí jako negativní regulátor fosforylační kaskády (Mähönen a kol., 2006). Histidinofosfotransferové proteiny následně putují do jádra,

kde dochází k přenosu fosfátové skupiny na ARR typu B (ARR1, 2, 10-14), které regulují expresi mnoha cílových genů, včetně ARR typu A (ARR4-9, 16) (D'Agostino a kol., 2000). Kromě zapojení v regulaci cirkadiálních rytmů (Ishida a kol., 2008) a fotomorfogenezi (Mira-Rodado a kol., 2007) funguje tato skupina regulátorů odpovědi jako negativní zpětná vazba vedoucí k inhibici přenosu CK signálu (To a kol., 2007).

Další složkou signalizační kaskády jsou geny CRFs (CK response factors) kódující transkripční faktory identifikované původně v *A. thaliana* (Rashotte a kol., 2006). Exprese některých z nich, konkrétně CRF2 a CRF5, je aktivována působením ARRs typu B. Fosforylované AHPs také indukují translokaci CRFs z cytosolu do jádra, kde aktivují transkripci cytokininových genů, přičemž exprese některých z nich může být stimulována i působením ARRs typu B. Transkripce některých typů CRFs (konkrétně CRF1, 3, 4) však není regulována CKs (Rashotte a kol., 2006) a jejich zvýšená exprese může být indukována např. abiotickým stresem (Gupta a Rashotte, 2014; Shi a kol., 2012; Zwack a kol., 2013; Zwack a kol., 2015).

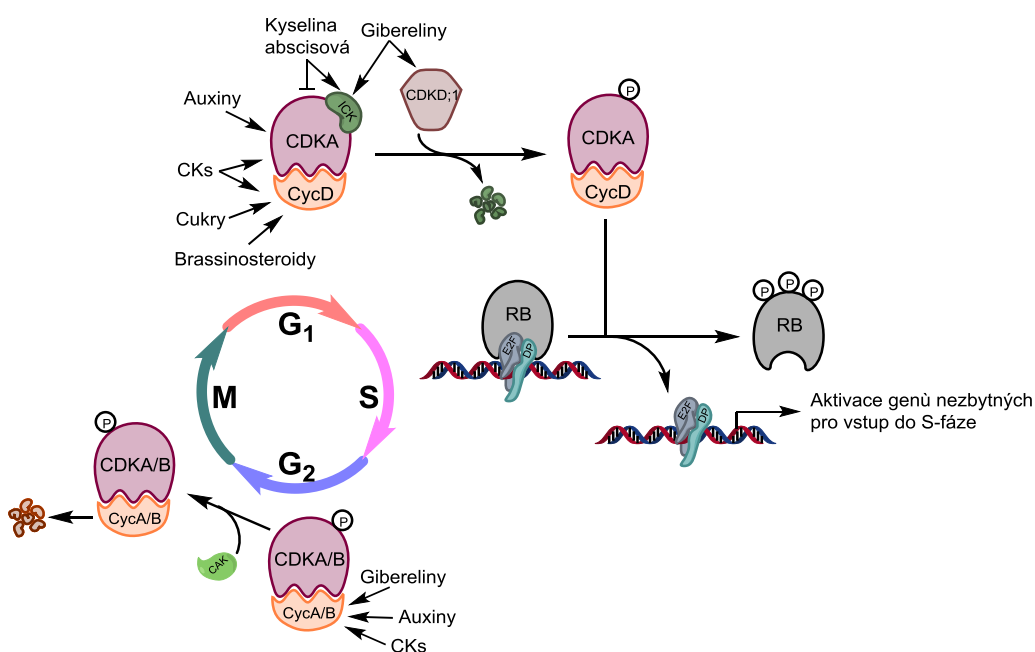


Obrázek 2. Model cytokininové signální kaskády. Cytokinin je přijímán receptorem AHK lokalizovaným v plazmatické membráně. Signál je dále zesílen sérií fosforylačních reakcí, kdy dochází k přenosu fosfátu v rámci receptoru a následně na AHPs, které po translokaci do jádra aktivují ARRs typu A nebo B. Fosforylace však může být inhibována působením pseudo-AHP, AHP6. Regulátory odpovědi typu A fungují mimo jiné jako represory signalizační dráhy, zatímco ARRs typu B pozitivně ovlivňují transkripci CK genů, včetně genů pro ARRs typu A. Působením CKs jsou také aktivovány CRFs, které se po translokaci do jádra podílejí na iniciaci exprese dalších CK genů (podle Rashotte a kol., 2006).

1.4 Biologická aktivita

Cytokiny se podílejí na mnoha významných procesech růstu a vývoje rostlin. Na buněčné úrovni regulují dělení a diferenciaci buněk; v rámci celého organismu ovlivňují apikální dominanci, klíčení semen, listovou senescenci, mobilizaci živin či odpověď rostlin na biotický a abiotický stres. V kooperaci se světlem dále CKs zprostředkovávají deetiologizaci a diferenciaci chloroplastů (Mok, 1994).

Tato skupina fytohormonů byla původně objevena díky své schopnosti v přítomnosti auxinů stimulovat buněčné dělení (Miller a kol., 1955). Navazující výzkumy prokázaly účast CKs na indukcii transkripce cyklinu D3;1, jehož zvýšená exprese je nezbytná pro přechod z G₁ do S-fáze buněčného cyklu (Soni a kol., 1995) (Obrázek 3). Cytokiny jsou dále také zapojeny v procesu defosforylace tyrosinu v molekule CDKA;1, čím dochází k aktivaci tohoto enzymu a následné iniciaci M-fáze (Zhang a kol., 1996).



Obrázek 3. Model regulace buněčného cyklu v rostlinách. Expresce CDKA a cyklinů typu D v G₁ fázi je regulována různými typy růstových faktorů, včetně cukrů a fytohormonů. Aktivace komplexu cyklinD-CDKA vyžaduje disociaci inhibičního proteinu ICK, jehož transkripce je stimulována působením kyseliny abscisové, a dále také fosforylaci treoninového zbytku v CDKA zprostředkovanou aktivační kinasou CDKD;1. Aktivní komplex cyklinD-CDKA během pozdní G₁-fáze iniciuje fosforylaci retinoblastomového proteinu (RB) a uvolňuje komplex E2F-DP, který spouští transkripci genů nezbytných pro postup do S-fáze. Pro přechod mezi G₂ a M-fází je nezbytná fosforylace treoninového zbytku CDK aktivační kinasou CAK a defosforylace tyrosinu indukovaná vlivem CKs. V závěru cyklu dochází k proteolýze cyklinů B a ukončení mitózy (Stals a Inzé, 2001).

1.4.1 Vývoj kořene a prýtu

Postembryonální vývoj rostlinných orgánů je umožněn díky regulaci rovnováhy mezi dělením a diferenciací buněk ve specifické oblasti pletiva, která obsahuje pluripotentní buňky a nazývá se stonkový apikální meristém (SAM). Cytokininy fungují jako důležité regulátory funkce těchto meristémů, což bylo prokázáno pozorováním zmenšeného SAM a sníženého počtu listových primordií u rostlin s nedostatkem CKs (Werner a kol., 2001; Werner a kol., 2003), nefunkčními receptory (Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004; Riefler a kol., 2006) či absencí IPT (Miyawaki a kol., 2006). V meristému je působením KNOTTED1-like homeoboxových (KNOX) transkripčních faktorů stimulována biosyntéza CKs (Yanai a kol., 2005) a zároveň dochází k potlačení genů biosyntézy giberelinů (Hay a kol., 2002; Sakamoto a kol., 2001), což umožňuje zachování funkční identity meristematičtých buněk. Ke zvýšení hladiny cytokininů v horní části SAM také přispívá aktivita enzymu LOG (EC 3.2.2.n1), který převádí biologicky inaktivní nukleotidy na volné báze (Kurakawa a kol., 2007).

Rostliny si v apikálních meristémech udržují skupiny totipotentních buněk, ze kterých následně vzniká kořenový systém a nadzemní část. Osud buněk ve stonkovém apikálním meristému je řízen regulační kaskádou, která zahrnuje skupinu genů CLAVATA (CLV) a WUSCHEL (WUS), které se navzájem ovlivňují. Exprese WUS vede k syntéze peptidu CLV3, který aktivací receptoru CLV1-CLV2 zprostředkovává zpětnou vazbu vedoucí k potlačení transkripce WUS. Tento transkripční faktor dále potlačuje expresi ARRů typu A, čímž je umožněna regulace správné funkce meristémů (Leibfried a kol., 2005).

Zcela odlišná situace se odehrává v kořenovém apikálním meristému. Specifikace a zachování identity meristematičtých buněk je řízeno převážně hladinou auxinů a CKs jsou nezbytné pro regulaci buněčné diferenciace. U transgenních rostlin s nedostatkem cytokininů byly pozorovány změny kořenového systému způsobené zvýšením počtu dělicích se buněk (Werner a kol., 2003). Další výzkumy prokázaly zapojení různých komponent cytokininové signální dráhy, konkrétně receptoru AHK3 a regulátorů odpovědi ARR1 a ARR12, které jsou specificky exprimovány v přechodné zóně kořene (Dello Iorio a kol., 2007). Transkripční faktor ARR1 kontroluje expresi genu *SHY2*, který iniciuje redistribuci auxinů, čímž je stimulována diferenciace buněk (Dello Iorio a kol., 2008). Protein *SHY2* je naopak působením auxinů degradován, což vede k zachování aktivity auxinových transportérů (PIN) a dělicí schopnosti buněk (Tian a kol., 2002). Výsledná rovnováha mezi dělením a diferenciací buněk regulující velikost kořenového meristému a růst kořene je tak dána interakcí mezi CKs a auxiny prostřednictvím *SHY2*.

1.4.2 Listová senescence

Antisenescenční vlastnosti cytokininů byly poprvé pozorovány na oddělených listech řepeň (*Xanthium pennsylvanicum* Wallr.) už v roce 1957 (Richmond a Lang, 1957). Inkubace listů ve vodném roztoku kinetinu vedla ke snížení proteinových ztrát spojených s odtržením listů a současně oddálila degradaci chlorofylu. Podobný efekt byl pozorován i u jiných druhů rostlin a dokonce byla zaznamenána obnova zelenosti listů (Dyer a Osborne, 1971). Externí aplikace CKs však může vykazovat odlišné výsledky v závislosti na daných experimentálních podmínkách, což bylo prokázáno porovnáním experimentů s BAP na listech *A. thaliana*. Ve tmě docházelo k oddálení senescence, avšak na světle byl patrný rychlejší pokles obsahu chlorofylu (Zacarias a Reid, 1990).

Další důkaz účasti CKs v procesech senescence poskytly analýzy hladin těchto fytohormonů v průběhu vývoje rostliny. Existence nepřímé úměry mezi množstvím cytokininů a stadiem senescence byla prokázána v několika druzích rostlin a pletivech (Van Staden a kol., 1988). Navazující výzkumy potvrdily pokles v transkripci genů kódujících biosyntetické enzymy CKs v senescentních listech, zatímco geny pro cytokininové degradační enzymy byly exprimovány ve větší míře (Buchanan-Wollaston a kol., 2005).

Velmi elegantní způsob studia zapojení CKs v procesech senescence představovaly experimenty s transgenní linií tabáku (*Nicotiana tabacum*) obsahující inkorporovaný gen pro isopentenyltransferasu (IPT; EC 2.5.1.27). Exprese *IPT* pod promotorem specificky aktivovaným senescencí (Senescence Associated Gene12, SAG12) vedla k syntéze CKs a následnému oddálení senescenčních procesů. Po dosažení dostatečné hladiny fytohormonů byla aktivita promotoru opět potlačena, čímž bylo zabráněno nežádoucímu nadměrnému hromadění cytokininů. Transgenní rostliny vykazovaly prodlouženou životnost listů se zachováním jejich fotosyntetické aktivity, což přispělo ke zvýšení výnosu semen i biomasy oproti běžným rostlinám (Gan a Amasino, 1995).

Výzkum mutantních rostlin *A. thaliana* dále objasnil zásadní roli cytokininového receptoru AHK3 v regulaci senescence listů. Mutace ve vazebné doméně tohoto receptoru vedla ke konstitutivní expresi CK genů, konkrétně *ARR2*, a v důsledku toho docházelo ke zvýšení životaschopnosti listů (Kim a kol., 2006). Obdobný fenotyp byl pozorován u rostlin se zvýšenou produkcí transkripčního faktoru *CRF6*, jehož exprese je indukována přítomností cytokininů (Zwack a kol., 2013). Tento negativní vliv *CRF6* na senescenci v oddělených listech však byl zpochybněn prostřednictvím experimentů s intaktními rostlinami, v nichž byla senescence působením CRFs stimulována (Raines a kol., 2016).

V průběhu listové senescence dochází kromě mnoha dalších procesů také k přesunu živin z odumírajícího pletiva do míst potřeby. Studium vlastností rostlin s oddálenou senescencí odhalilo účast CKs na stimulaci exprese extracelulární invertasy (β -fruktofuranosidasa, EC 3.2.1.26) a hexosových transportérů, což vedlo ke zvýšení přísunu živin a senescenční projevy tak v daných listech nebyly spuštěny (Balibrea Lara a kol., 2004; Ehness a Roitsch, 1997). Zvýšení intracelulární hladiny glukosy a fruktosy pozorované v rostlinách tabáku však pravděpodobně spouští odlišnou signální dráhu a vede ke stimulaci senescenčních procesů (Swartzberg a kol., 2011).

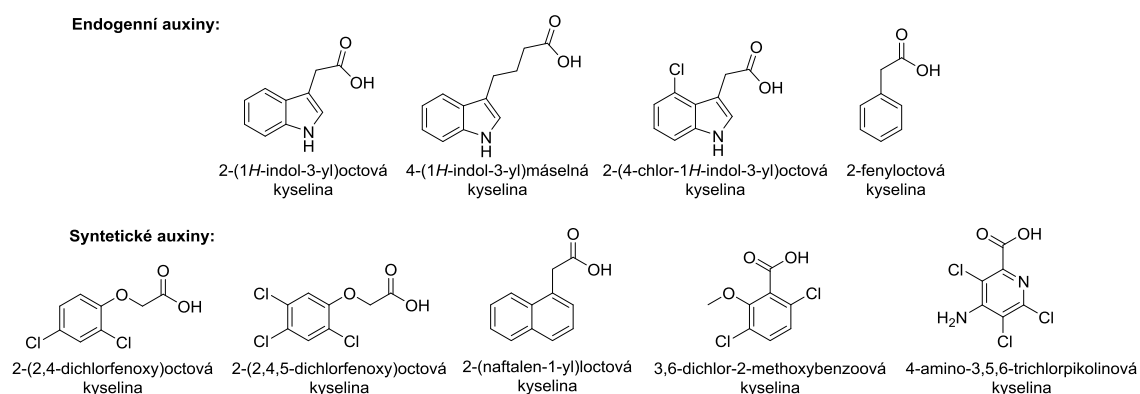
2 Auxiny

Auxiny jsou další významnou skupinou fytohormonů zapojených ve velmi široké škále biologických mechanismů. Existence těchto růstových regulátorů byla předpokládána již v 80. letech 19. století, kdy Charles Darwin pozoroval světlem indukované zakřivení koleoptile trav (Darwin a Darwin, 1880). Látka zodpovědná za tento pohyb byla později izolována z fermentačního média (Salkowski, 1885) a identifikována jako 2-(1*H*-indol-3-yl)octová kyselina (IAA) (Kögl a kol., 1934). Auxinová aktivita byla dále definována jako schopnost daných molekul stimulovat prodlužování koleoptile či dalších stonkových úseků, a zároveň podporovat vznik kořenů. Gradient auxinu v rostlině je však zodpovědný za regulaci mnoha dalších vývojových procesů, včetně kontroly apikálně-bazální polarity, zachování apikální dominance, vzniku listových primordií a plodů, vývoje kořene či reakce na abiotický a biotický stres (Sauer a kol., 2013).

Vysoké koncentrace auxinů jsou však toxické, převážně pro jednoděložné rostliny jako jsou trávy a obilniny. Díky těmto vlastnostem je v současné době mnoho sloučenin s auxinovou aktivitou využíváno jako herbicidy. Syntetické auxiny jsou také součástí komerčně dostupných přípravků stimulujících tvorbu adventivních kořenů či synchronizaci kvetení (Grossmann, 2010).

2.1 Struktura

Z chemického hlediska jsou auxiny definovány jako nízkomolekulární organické kyseliny obsahující ve své molekule aromatický kruh a karboxylovou skupinu. Kromě nejrozšířenějšího endogenního auxinu – IAA – byly v rostlinách objeveny další tři přírodní látky s auxinovou aktivitou, a sice kyselina indol-3-máselná (4-(1*H*-indol-3-yl)butanová kyselina, IBA) (Ludwig-Müller a Epstein, 1991), 2-(4-chlor-1*H*-indol-3-yl)octová (Engvild, 1980) a 2-fenylacetová (Okamoto a kol., 1967) (Obrázek 4).



Obrázek 4. Struktura vybraných přírodních a syntetických auxinů.

Za účelem objasnění role auxinů v biologických systémech bylo připraveno velké množství syntetických derivátů, které jsou často strukturně odlišné, avšak působí obdobně jako endogenní fytohormony. Analýzy vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou daných molekul odhalily, že indolový základ není pro funkci auxinu nezbytný a může být nahrazen jinými aromatickými kruhy s podobnou velikostí. Syntetická analoga bývají stabilnější než IAA (Dunlap a kol., 1986), avšak podléhají stejně jako IAA enzymatické konjugaci s glukózou, čímž dochází k jejich inaktivaci (Barendse a kol., 1987; Klemš a kol., 1998; Smulders a kol., 1990). Mezi nejznámější zástupce patří kyselina 2-(naftalen-1-yl)octová, 2-(2,4-dichlorfenoxy)octová (2,4-D), 2-(2,4,5-trichlorfenoxy)octová (2,4,5-T), 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová (dicamba) a 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová (picloram).

2.2 Metabolismus

Hladiny koncentrace auxinů se mění nejen během vývoje rostliny, ale i v rámci různých pletiv, čímž dochází k ustanovení gradientu zodpovědného za biologickou funkci těchto fytohormonů. Pro zachování auxinového gradientu rostliny využívají složitých regulačních kaskád, které udržují procesy biosyntézy, transportu a inaktivace v požadované rovnováze. Volná IAA je v rostlinách produkována několika způsoby: biosyntézou *de novo* z tryptofanu nebo jeho indolických prekurzorů, hydrolýzou esterových a amidových konjugátů nebo konverzí z IBA (Normanly a kol., 2010).

V rostlinách se nachází několik typů auxinových molekul, které vykazují různou potenciální kapacitu spouštět signální kaskádu. V porovnání s IAA je IBA mnohem méně aktivní sloučeninou a je tak považována za dočasnou zásobní formu IAA. Syntéza IBA z IAA pravděpodobně probíhá obdobným mechanismem prodlužování řetězce jako při biosyntéze mastných kyselin (Ludwig-Müller a Hilgenberg, 1995), analogicky zpětná konverze IBA na volnou IAA vede stejnými drahami jako

peroxisomální β -oxidace mastných kyselin (Epstein a Ludwig-Müller, 1993; Zolman a kol., 2008).

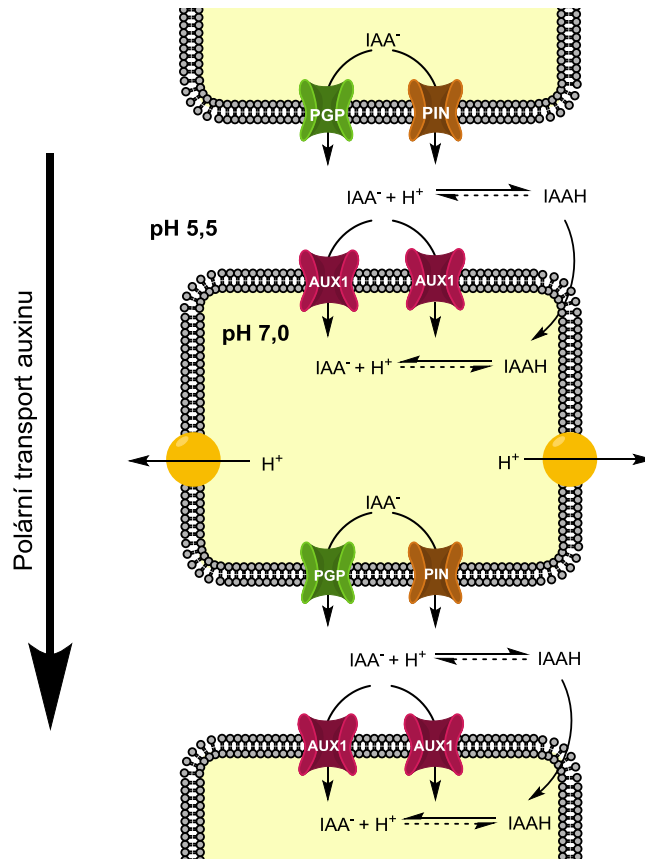
V rostlinných pletivech se většina auxinů nachází v konjugované formě se sacharidy, cukernými alkoholy, aminokyselinami či proteiny. Esterové a amidové konjugáty představují dočasně inaktivovanou formu auxinů. O-glykosidy vznikají připojením cukerné složky na molekulu auxinu prostřednictvím esterové vazby, jako např. IAA-inositol, IAA-glukosa, IAA-glykoproteiny a IAA-glukany (Normanly a kol., 2010). Amidovou vazbou mohou být na IAA navázány různé proteiny nebo aminokyseliny jako alanin, leucin, aspartát či glutamát (Kowalczyk a Sandberg, 2001; Tam a kol., 2000). V menší míře lze v rostlinách detekovat aminokyselinové konjugáty valinu, fenylalaninu či tryptofanu (Kai a kol., 2007; Staswick, 2009).

Kromě dočasné inaktivace auxinů pomocí konjugace dochází k jejich degradaci dekarboxylativními (Ros Barceló a kol., 1990) nebo nedekarboxylativními oxidačními drahami (Östin a kol., 1998). Konjugace s aparátem a glutamátem je však také považována za ireversibilní proces a takto označené auxiny jsou pravděpodobně určeny k degradaci (Kowalczyk a Sandberg, 2001).

2.3 Transport a signalizace

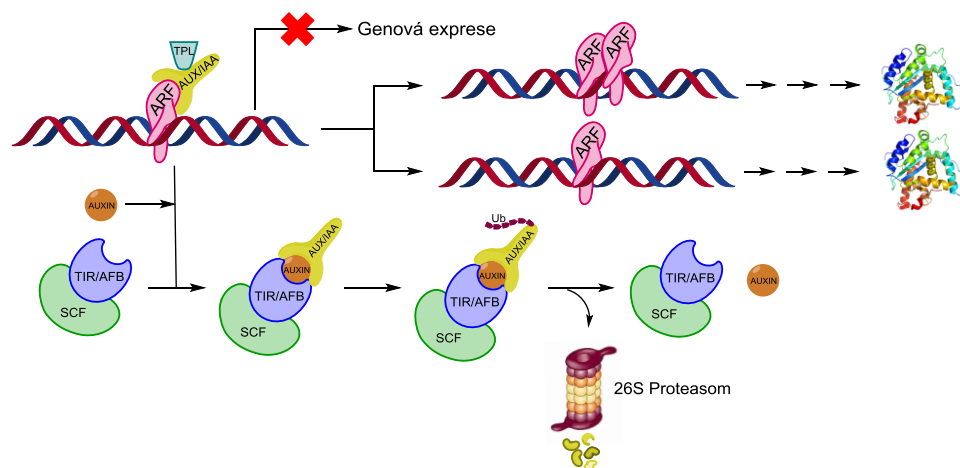
V rostlinách existují dva hlavní způsoby pohybu auxinů: rychlý, nepolární transport na delší vzdálenosti je zprostředkováván floémem, zatímco pomalejší tok auxinů z buňky do buňky je závislý na přítomnosti specifických přenašečů v plazmatické membráně (Obrázek 5). Auxiny jako slabé kyseliny jsou v relativně kyselém pH apoplastu protonovány a mohou snadno difundovat přes membránu. V neutrálním prostředí cytoplazmy dochází k jejich deprotonaci, což má za následek změnu jejich lipofilicity a akumulaci uvnitř buňky (Vanneste a Friml, 2009).

Kromě prosté difuze může být vtok auxinů do buňky usnadněn pomocí skupiny transportérů AUX1/LAX, které fungují jako H^+/IAA^- symportéry (Bennett a kol., 1996; Schnabel a Frugoli, 2004). Export auxinů je dále zprostředkován dvěma typy přenašečů – P-glykoproteiny z rodiny ABCB transportérů (Geisler a kol., 2005) a PIN proteiny (Gälweiler a kol., 1998; Luschnig a kol., 1998). Převážně polární subcelulární lokalizace PIN proteinů je zodpovědná za usměrňování toku auxinů v pletivech a následné ustanovení specifického auxinového gradientu, který reguluje mnoho důležitých aspektů vývoje rostlin (Vanneste a Friml, 2009).



Obrázek 5. Chemiosmotická hypotéza polárního auxinového transportu. Nízké pH apoplastu je udržováno aktivitou H^+ -ATPas, které jsou lokalizované v plazmatické membráně. V kyselém prostředí dochází k protonaci auxinu (IAAH) a zvýšení lipofilicity, což umožňuje snadnější přechod IAAH přes membránu. Kromě pasivní difuze jsou auxiny aktivně přenášeny v symportu s protony, který zprostředkovávají kanály AUX1. Neutrální prostředí cytosolu způsobuje deprotonaci auxinu (IAA^-) a následnou akumulaci v buňce. Odtok auxinu umožňují dva typy přenašečů – PIN proteiny a P-glykoproteiny ze skupiny ABCB transportérů (PGP) (podle Vanneste a Friml, 2009).

Pro spuštění biologické odpovědi rostliny je nezbytný příjem a zpracování auxinového signálu. Jedním z nejprostudovanějších receptorů auxinů je protein TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1 (TIR1), který tvoří podjednotku E3 ubikvitin ligasy (Dharmasiri a kol., 2005; Kepinski a Leyser, 2005). Vazba auxinu na receptor iniciuje interakci TIR1 se skupinou proteinů AUXIN/INDOLE ACETIC ACID (Aux/IAA), které jsou následně označeny ubikvitinem a degradovány v 26S proteasomu. V nepřítomnosti auxinů tvoří Aux/IAA heterodimery s transkripčními faktory AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) a tento komplex inhibuje genovou expresi. Degradace Aux/IAA stimulovaná auxiny tak vede k uvolnění ARF a následné transkripční odpovědi (Sauer a kol., 2013) (Obrázek 6).



Obrázek 6. Schéma signální kaskády auxinů. Při nízké koncentraci auxinů jsou transkripční represory Aux/IAA stabilizovány a vytváří dimery s transkripčními faktory ARFs. Ke vzniklému komplexu se dále váže korepresor TOPLESS (TPL), čímž dochází k výsledné inhibici exprese příslušných genů. Vyšší koncentrace auxinů aktivují receptor TIR1, na který je dále přes auxin připojena molekula Aux/IAA. Po označení Aux/IAA ubiquitinací jsou tyto transkripční represory degradovány v proteasomu 26S. Dosud však nebylo objasněno, zda ARFs fungují jako monomery, dimery nebo obojí (podle Vanneste a Friml, 2009).

Prvním objeveným receptorem auxinů však byl AUXIN-BINDING PROTEIN (ABP1), izolovaný již v roce 1985 z koleoptile kukuřice (Löbner a Klämbt, 1985). Experimenty s ABP1 potvrdily úlohu tohoto proteinu v rychlých reakcích odehrávajících se v blízkosti plazmatické membrány, jako např. proudění iontů vyvolané auxiny (Barbier-Brygoo a kol., 1991) nebo prodlužování buněk (Steffens a kol., 2001). Navazující výzkumy poskytly důkazy o zapojení ABP1 v regulaci buněčného cyklu a expanzi buněk (Braun a kol., 2008; David a kol., 2007), reorganizaci cytoskeletu přes Rho-GTPasa-dependentní dráhu (Xu a kol., 2010) a inhibici endocytózy (Lin a kol., 2012; Robert a kol., 2010). Ačkoliv se ABP1 vyskytuje převážně na membráně endoplazmatického retikula, zmiňované experimenty potvrzují jeho možný transport k plazmatické membráně anebo do extracelulárního prostoru. Zda je endoplazmatické retikulum pouze shromaždištěm pro inaktivní ABP1 čekající na transport k plazmatické membráně nebo mají ABP1 v lumenu a extracelulárním prostoru odlišné funkce zatím nebylo objasněno (Sauer a kol., 2013).

2.4 Biologická aktivita

Jedním z nejvýznamnějších poznatků o funkci auxinů bylo odhalení jejich nerovnoměrného rozmístění v rostlinných pletivech. Auxiny se mohou akumulovat lokálně v jednotlivých buňkách či skupinách buněk a vytvářet tak koncentrační maxima; v jiných případech dochází k ustanovení gradientu v rámci pletiv nebo i celé rostliny. V rané embryogenezi dochází ke specifikaci apikální buňky a následnému ustanovení kořenového i stonkového pólu právě vlivem odlišných koncentrací auxinů v různých

oblastech pletiva (Vanneste a Friml, 2009). Během postembryonálního vývoje auxiny stimulují zakládání listů, květů, květních orgánů a laterálních kořenů (Benková a kol., 2003). Auxin se zprvu hromadí v místě vzniku budoucího orgánu (Heisler a kol., 2005) a poté vytváří gradient podél osy směru růstu vznikajícího primordia (Benková a kol., 2003). Jakmile je utvořen funkční kořenový meristém, dochází k ustálení auxinového gradientu s jeho maximální koncentrací v buňkách klidového centra a kolumely (Friml a kol., 2002). Distribuce auxinů hraje také důležitou roli při vývoji listů, v nichž jejich zvýšená koncentrace stimuluje vznik cévních svazků (Mattsson a kol., 2003).

2.4.1 Tropismy

Vznik auxinového gradientu je také zodpovědný za specifické růstové reakce způsobené světlem a gravitací, tzv. tropismy. Indukovaná redistribuce auxinu vede ke stimulaci či inhibici prodlužování buněk, v závislosti na koncentraci a typu pletiva, a má za výsledek asymetrický růst daného orgánu (Thimann, 1938). V důsledku gravitace dochází k akumulaci auxinu ve spodní části stonku i kořene, avšak reakce obou orgánů je odlišná. Zvýšená koncentrace auxinu v kořeni způsobuje inhibici prodlužování a kořen se ohýbá směrem dolů, zatímco v prýtu je prodlužování stimulováno a stonk se zakřivuje opačným směrem. V případě fototropismu se auxin hromadí v neosvětlené části rostliny a má za následek ohyb prýtu směrem ke zdroji záření (Tanaka a kol., 2006). Kromě tropismů je nerovnoměrná distribuce auxinů také spojována s reakcí rostlin k zastínění. Změna spektrálního složení světla vede k lokální aktivaci biosyntézy auxinů a následnému prodlužování stonku (Tao a kol., 2008).

2.4.2 Expanze buněk

Růst rostlinných buněk je limitován pevností jejich buněčné stěny. Experimenty z první poloviny 20. století prokázaly, že přítomnost auxinů stimuluje rozvolnění buněčné stěny a buňky mohou následně zvětšovat své rozměry (Heyn, 1931). Navazující výzkumy zabývající se biologickými funkcemi těchto fytohormonů potvrdily jejich zapojení v buněčné expanzi a objasnily mechanismus působení. Zvýšená koncentrace auxinů stimuluje činnost H^+ -ATPasy a následný tok protonů z buňky způsobuje okyselení apoplastu. Změnou pH jsou aktivovány enzymy zapojené v rozvolňování buněčné stěny a je tak zahájen růst. Pro zachování turgoru je však nezbytný sekundární aktivní transport draselných iontů do buňky (Hager, 2003).

3 Caging a caged-fytohormony

Metoda ochrání biomolekul neboli tzv. caging představuje velmi přínosný chemický přístup pro dočasné zablokování biologické aktivity požadované látky. Těto reverzibilní inaktivace je dosaženo kovalentním připojením vhodné fotolabilní chránící skupiny (tzv. caging group) na tu část molekuly, která je zodpovědná za její specifickou funkci v biologickém systému. Je-li daná caged-sloučenina vystavena záření o vhodných vlnových délkách, dochází k její fotolýze a uvolnění původní aktivní sloučeniny. Tohoto jevu může být využito pro „zapnutí“ či „vypnutí“ konkrétní biologické odpovědi příslušného organismu. Caged-molekuly představují hned několik výhod: jejich aktivace lze dosáhnout ve velmi krátkém čase ovlivněném pouze délkou pulzu a rychlostí pozorované reakce, díky fokusaci světelného paprsku pomocí čoček a zrcadel je možné provádět fotolýzu i v jednotlivých buňkách, a zároveň nedochází k nežádoucím metabolickým přeměnám aplikovaných látek (Kao, 2006).

Jednou z důležitých vlastností caged-molekul je jejich chemická stabilita a neaktivita v *in vitro* či *in vivo* experimentech. Vedlejší produkty fotolýzy by neměly interferovat se studovanými procesy či samotnou deprotekcí a zároveň nesmí spouštět žádnou odpověď daného systému. Deprotekce caged-molekul nejčastěji probíhá vlivem UV záření, které je však pohlcováno biologickým materiálem a může způsobit jeho poškození. Vhodnější alternativu představuje využití chránících skupin absorbujících ve vyšších vlnových délkách nebo využívajících tzv. dvoufotonovou excitaci (Kao, 2006).

Samotná fotolýza probíhá ve dvou krocích: nejprve dochází k absorpci záření danou caged-látkou za vzniku nestabilního intermediátu, ze kterého je v následujícím kroku uvolněna požadovaná aktivní molekula. Celý proces je řízen třemi veličinami, které charakterizují danou sloučeninu – jedná se o extinkční koeficient, kvantový výtěžek fotolýzy a rychlostní konstantu vzniku produktu. Molární extinkční koeficient (ϵ) udává schopnost látky absorbovat světlo. V případě molekul, které silně pohlcují záření, lze pozorovat hodnoty typicky 10^4 až 10^5 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. U většiny dostupných caged-molekul se však ϵ pohybuje pouze v řádu stovek až několika tisíc $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Každý absorbovaný foton ovšem nemusí vést k odštěpení fotolabilní chránící skupiny. Pravděpodobnost uskutečnění fotolýzy je označována jako kvantový výtěžek (Φ) a u běžně používaných caged-derivátů bývá v rozmezí 0,05 až 0,2, tzn. pouze 5-20 % zachycených fotonů způsobí úspěšné uvolnění bioaktivní molekuly. Kinetiku fotolytických procesů dále popisuje rychlostní a časová konstanta, které určují rychlost přechodu intermediátu na finální produkt deprotekcce (Kao, 2006).

3.1 Fotolabilní chránící skupiny

Chránící skupiny, které lze z molekuly odštěpit aplikací světelného impulzu, našly své primární uplatnění v organické syntéze. Díky rozvoji mnoha nových fotochemických metod je v současné době k dispozici široká škála různých fotolabilních chránících skupin, které se liší nejen svou chemickou strukturou a rozmezím absorbovaných vlnových délek, ale také rozdílnými kvantovými výtěžky fotolýzy, rychlostí deprotektce, využitelností pro konkrétní funkční skupiny či vznikem případných vedlejších produktů s nežádoucími vlastnostmi (Tabulka 1) (Bochet, 2002).

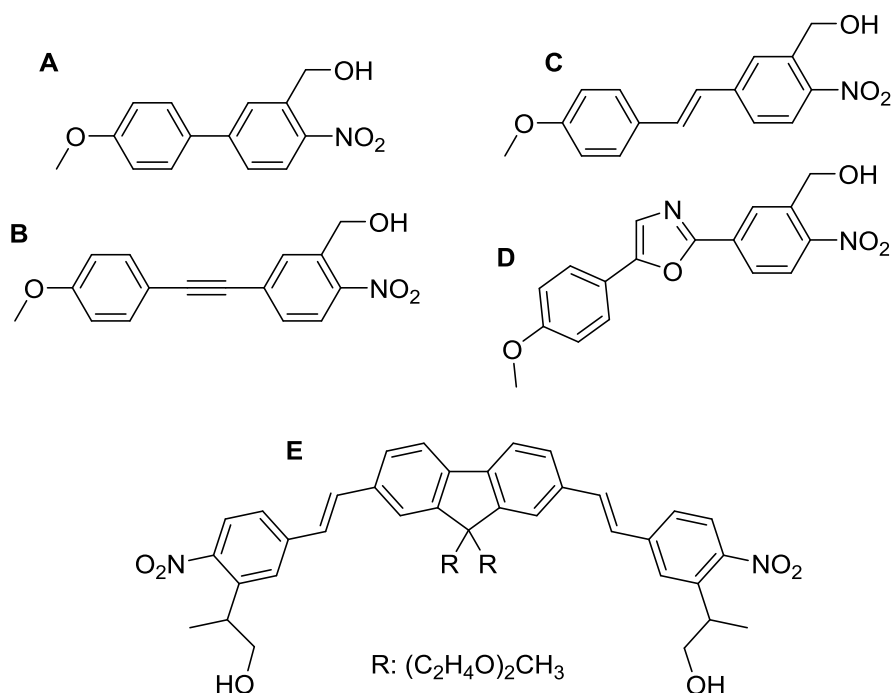
Tabulka 1. Přehled nejčastěji používaných fotolabilních chránících skupin a jejich základních charakteristik. Vysvětlivky: Φ – kvantový výtěžek, λ – optimální vlnová délka pro deprotektci (Bochet, 2002; Givens a kol., 2012; Zabadal a Klán, 2001)

Fotolabilní chránící skupina	Funkční skupiny	Φ	λ (nm)
2-nitrobenzyl	-OH, -COOH, -NH ₂ , -O-P(O)R ₂	0,08-0,63	265-320
2-fenyl-2-oxoethyl	-OH, -COOH, -NH ₂ , -O-P(O)R ₂	0,11-0,41	250-350
fenoxy, benzyloxy	-COOH	0,15	254
1-acyl-7-nitroindolin	-COOH, -NH ₂	0,06-0,085	300-350
benzensulfonyl	-OH, NH ₂	0,02-0,07	254
benzoin	-OH, NH ₂	0,64	300-366
kumarin-4-ylmethyl	-OH, -COOH, -NH ₂	0,03-0,2	360-500

Jednou z nejčastěji používaných fotolabilních chránících skupin stále zůstává 2-nitrobenzyl (NB) skupina a její deriváty. Tyto molekuly vykazují charakteristický absorpční pás v oblasti 275 nm (UV-C), který může přesahovat až do UV-B (Herrmann, 2012). Mezi hlavní výhody využití patří jejich kompatibilita s rozsáhlým spektrem funkčních skupin, relativně snadná syntéza, dostatečná světelná citlivost a objasněný mechanismus fotolýzy (Adams a Tsien, 1993). Největší problém však představuje vedlejší produkt fotolýzy, 2-nitrosobenzaldehyd, který může reagovat s uvolňovanou molekulou nebo dalšími komponentami daného systému. Méně reaktivní produkt vzniká z 1-(2-nitrofenyl)ethylové (NPE) chránící skupiny, avšak obě dvě skupiny vykazují pouze slabou absorpci světla nad 340 nm (Kaplan a kol., 1978). Posun absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám, a tedy k méně energetickému záření, je stimulován přítomností substituentů schopných donovat elektrony, jako například methoxy skupiny (Herrmann, 2012). Zvýšená absorbance v rozmezí 300-400 nm byla prokázána u 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylových (DMNB) derivátů, avšak jejich fotolýza poskytuje nižší kvantové výtěžky (Adams a Tsien, 1993).

Efektivní způsob eliminace negativního vlivu UV světla na studovaný biologický systém představuje tzv. dvoufotonová excitace ve vyšších vlnových délkách viditelného

spektra, které se nacházejí mimo absorpční maximum použité chránící skupiny. Pohlcením dvou fotonů současně je dosaženo snížení rozptylu světla v tkáních či pletivech, dochází k preciznějšímu ohraničení ohniska a záření tak proniká i do hlubších vrstev buněk. Pravděpodobnost dvoufotonové absorpce je však velmi nízká a v praxi lze tohoto jevu dosáhnout pouze při použití laserového paprsku. Dvoufotonové chránící skupiny odvozené od 2-nitrobenzylu obsahují ve své molekule obvykle alespoň dvě aromatická jádra, jejichž napojení ovlivňuje výslednou úspěšnost deprotektce (Obrázek 7). Vyšších kvantových výtěžků fotolýzy je však dosahováno u rozsáhlých konjugovaných systémů (Bort a kol., 2013).



Obrázek 7. Struktura vybraných dvoufotonových chránících skupin. A – přímé napojení dvou aromatických kruhů; B – propojení přes acetylenový můstek; C – propojení přes ethylenový můstek; D – propojení přes oxazolový můstek; E – napojení přes ethylenové můstky na fluorenové jádro.

Ačkoliv zůstává využití dvoufotonových 2-nitrobenzylových chránících skupin primárně v oblasti neurovědy (Gug a kol., 2008; Kantevari a kol., 2006; Matsuzaki a kol., 2010) a medicíny (Bao a kol., 2012; Buhr a kol., 2015; Yang a kol., 2015), klasické jednofotonové deriváty byly použity pro přípravu velmi rozmanitého spektra caged-molekul, včetně ATP (Kaplan a kol., 1978), cyklických nukleotidů (Hagen a kol., 1996), DNA/RNA (Tang a Dmochowski, 2006), Zn^{2+} iontů (Bandara a kol., 2009), inositol fosfátů (Walker a kol., 1989), oxidu dusnatého (Makings a Tsien, 1994) a v neposlední řadě také rostlinných hormonů - cytokininů (Hayashi a kol., 2012) a auxinů (Kusaka a kol., 2009).

3.2 Caged-fytohormony

Přestože bylo v současné době dosaženo mnoha významných pokroků v oblasti výzkumu biologických funkcí rostlinných hormonů, mechanismy percepce a přenosu signálu v buňkách nejsou u některých látek zcela objasněny. Většina fytohormonů má charakter slabých kyselin, což napovídá, že tyto látky mohou volně difundovat a membránové receptory nemusí být jediným místem, kde dochází ke spuštění signální kaskády (Allan a kol., 1998). Nedávné výzkumy prokázaly, že např. část růstových reakcí rostlin k působení auxinů je zprostředkována aktivovaným intracelulárně lokalizovaným receptorem (Sauer a kol., 2013).

Za účelem objasnění funkční lokalizace percepce fytohormonů bylo provedeno několik výzkumů, během kterých byly přirozené rostlinné hormony injekčně vpravovány přímo do rostlinných buněk (Anderson a kol., 1994; Gilroy a Jones, 1994). Tato technika však neumožňuje časově odlišit proces samotného vpichu od následného spuštění signálu, čímž může dojít ke značnému zkreslení získaných výsledků. Caged-fytohormony tedy představují ideální přesného uvolnění požadované látky, aniž by došlo k nežádoucímu ovlivnění buňky (Allan a kol., 1998).

V případě rostlinných hormonů, které obsahují karboxylovou skupinu, je příprava fotolabilních molekul relativně snadná. Karboxylové kyseliny reagují s příslušným derivátem 2-nitrobenzylalkoholu za vzniku požadovaného caged-fytohormonu. Zvýšení efektivity fotolýzy lze dosáhnout substitucí benzylového uhlíku, jako např. u 1-(2-nitrofenyl)ethylesterů. Pro syntézu vybraných caged-fytohormonů (gibereliny, kyselina abscisová, jasmonová, 2-(naftalen-1-yl)octová) se osvědčila aktivace těchto kyselin metodou směsných anhydridů (Ward a Beale, 1995).

3.2.1 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) byla jedním z prvních fytohormonů, na který byla připojena fotolabilní chránící skupina. Reakcí ABA s isobutylchloroformátem byl získán směsný anhydrid, který následně reagoval s příslušným alkoholem za vzniku požadované caged-molekuly s NB nebo NPE chránící skupinou (Schéma 1) (Ward a Beale, 1995). Další typy caged-ABA, 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylový a [7-(diethylamino)kumarin-4-yl]methylový derivát, byly připraveny až o několik let později reakcí kyseliny abscisové s daným bromidem (Wright a kol., 2015).

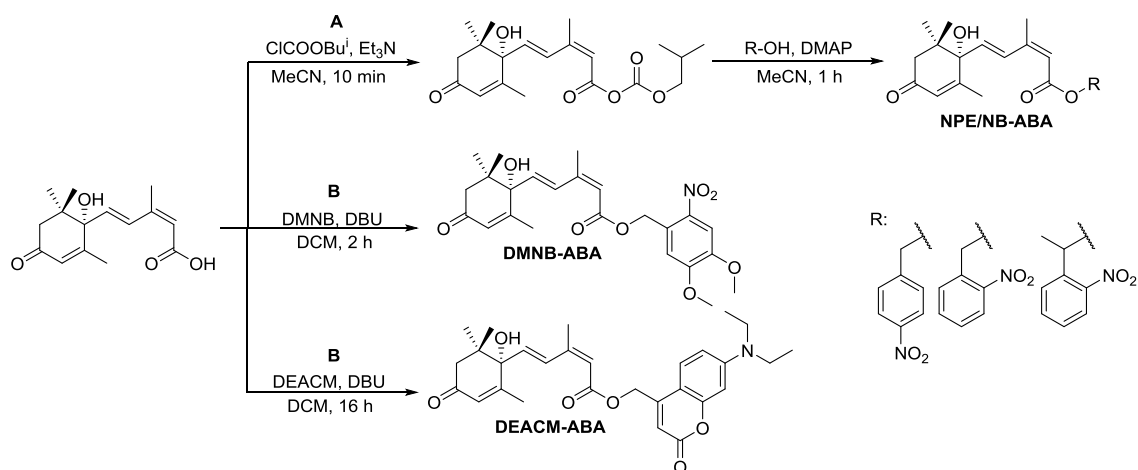


Schéma 1. Syntéza derivátů kyseliny abscisové s fotolabilními chránícími skupinami. A – tvorba směsného anhydridu a následná esterifikace s alkoholem v přítomnosti DMAP (Ward a Beale, 1995); B – reakce s bromidem DMNB/DEACM a DBU jako bází (Wright a kol., 2015).

Průběh fotolýzy NPE-ABA byl monitorován UV spektroskopickými metodami. Roztoky látek byly ozařovány nefokusovaným světlem rtuťové výbojky a následně byl sledován pokles absorpčního maxima caged-molekuly (253 nm) a vznik absorpčního spektra nitrosoacetofenonu (280 nm, s raménkem při 315 nm). Kompletního odštěpení chránící skupiny 1-(2-nitrofenyl)ethylesteru bylo dosaženo po 5 min ozařování, v případě 2-nitrobenzylesterů probíhala fotolýza mnohem pomaleji. Estery s 4-nitrobenzylou skupinou zůstávaly v průběhu ozařování neměnné. Kromě UV analýzy byly produkty fotolýzy extrahovány a po nanesení na TLC desku porovnány s výchozími estery a původními fytohormony. U kyseliny abscisové byl kromě volné aktivní formy detekován další produkt fotolýzy, identifikovaný jako biologicky neaktivní 2-*trans*-isomer, čímž byla potvrzena existence fotoisomerační reakce ABA (Ward a Beale, 1995).

Účinnost fotolýzy DMNB-ABA byla stanovena HPLC analýzou roztoku ozařovaného fluorescenčním mikroskopem s nastavenou vlnovou délkou 365 nm. Kompletního odštěpení chránící skupiny bylo dosaženo po 2 min ozařování. Při použití stejného světelného zdroje pro fotolýzu DEACM-ABA nebyl experiment úspěšný a pro deprotekcí byla použita elektroluminiscenční dioda (LED, 405 nm). Uvolnění aktivní kyseliny abscisové proběhlo po 4 min od zapnutí LED. U obou caged-derivátů byl v průběhu ozařování pozorován vznik *trans*-isomeru ABA (Wright a kol., 2015).

Biologická aktivita caged-ABA byla testována na svěřacích buňkách průduchů křížatky (*Commelina communis* L.). Roztok 1-(2-nitrofenyl)ethylesterového nebo 4-nitrobenzylového derivátu byl injekčně vpraven do buňky a po 30 min inkubace byly buňky 30 s ozařovány UV světlem o vlnové délce 360 nm. Fotolýzou NPE-ABA došlo k poklesu turgoru, který byl detekován jako změna v šířce průduchové štěrbině.

Uzavírání průduchů bylo možné pozorovat již po 2 min od zahájení fotolýzy, zatímco v případě 4-nitrobenzylesteru nedocházelo k žádným změnám (Allan a kol., 1994).

Stabilita DMNB-ABA i DEACM-ABA v biologickém systému byla ověřena pomocí reportérových buněčných linií. V přítomnosti kyseliny abscisové nebo ozářeného vzorku caged-ABA docházelo k aktivaci signální dráhy vedoucí k expresi stanovovaných proteinů, avšak bez aplikace světelného impulzu nebyla tato reakce spuštěna. Toto pozorování také potvrdily experimenty s jinými tkáňovými kulturami, ve kterých volná kyselina abscisová indukovala translokaci fúzních proteinů z jádra ve stejné míře, jako caged-ABA vystavená působení světla (Wright a kol., 2015).

3.2.2 Gibereliny

První caged-gibereliny byly připraveny metodou směsných anhydridů obdobně jako v případě NPE/NB-ABA, avšak výtěžek syntézy byl nízký (Ward a Beale, 1995). Další pozornosti se této skupině fytohormonů dostalo až v roce 2015, kdy byly reakcí s příslušnou chránicí skupinou ve formě alkoholu připraveny caged-deriváty giberelinu GA₃ (Schelkle a kol., 2015) (Schéma 2).

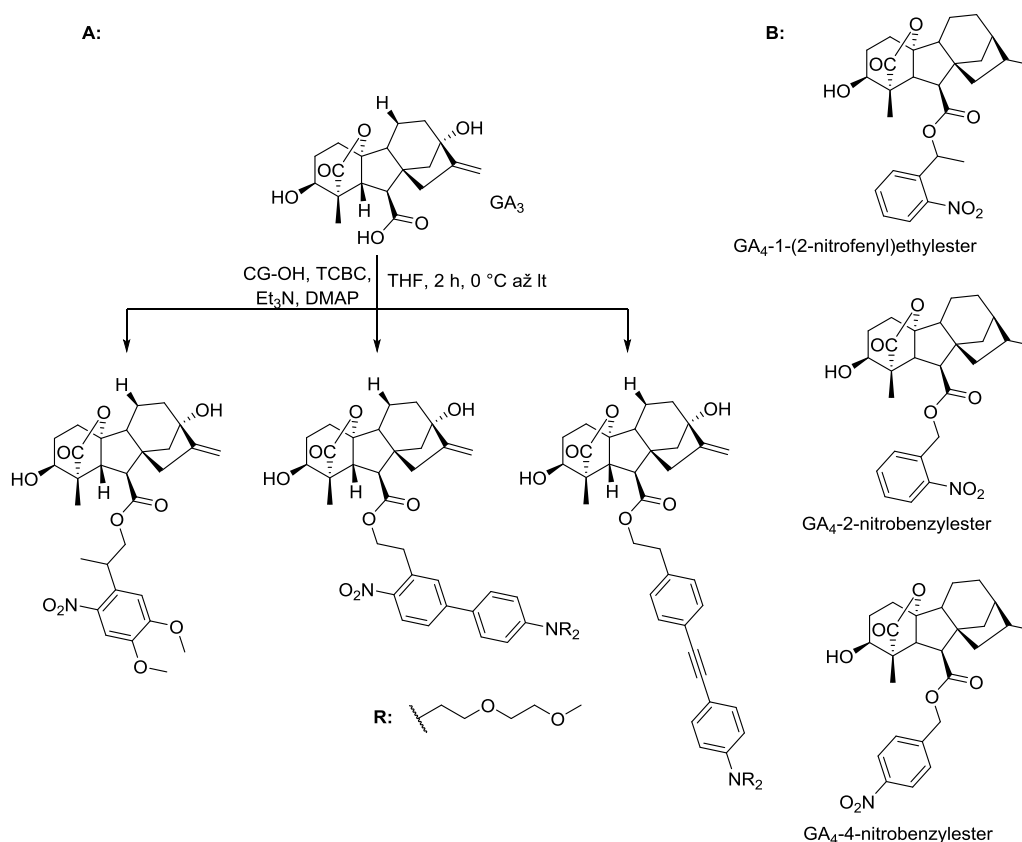


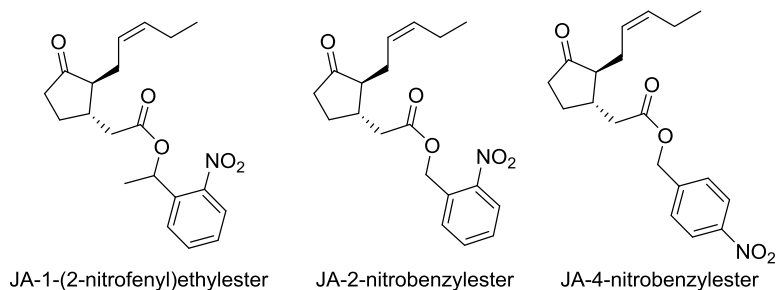
Schéma 2. Syntéza caged-giberelinů. A/ Příprava derivátů GA₃ s jedno- (vlevo) a dvoufotonovou chránicí skupinou (uprostřed, vpravo). GC-OH = chránicí skupina ve formě alkoholu B/ Klasické estery caged-GA₄ syntetizované metodou směsných anhydridů (postup viz kyselina abscisová).

Fotolýza caged-GA₄ byla testována obdobným postupem jako v případě kyseliny abscisové (Ward a Beale, 1995). Jednofotonové fotochemické vlastnosti caged-GA₃ byly zkoumány prostřednictvím UV/VIS spektrofotometrických metod při ozařování vzorku světlem o vlnové délce 350 a 412 nm. Během fotolýzy docházelo k poklesu absorbance při 400 nm a byl pozorován vznik absorpčních pásů při 350, 450 a 550 nm. Úspěšnost dvoufotonové excitace byla stanovena HPLC analýzou, která zaznamenala úbytek výchozí caged-GA₃ po ozáření laserem (800 nm, 10 min) (Schelkle a kol., 2015).

Experimenty s COS-7 buňkami potvrdily, že caged-GA₃ představují stabilní, avšak biologicky inaktivní formu fytohormonu. Schopnost indukovat dimerizaci proteinů byla obnovena až po aplikaci světelného pulzu, jehož vlivem došlo k translokaci sledovaného cytosolického proteinu EGFP-GID1 do mitochondrie (Schelkle a kol., 2015).

3.2.3 Kyselina jasmonová

Syntéza caged-jasmonové kyseliny byla taktéž publikována vědeckým týmem Warda a Bealeho, avšak nebyla zveřejněna žádná další data týkající se fotolýzy těchto látek nebo jejich aplikace v biologických systémech (Ward a Beale, 1995) (Obrázek 8).



Obrázek 8. Struktura syntetizovaných caged-derivátů kyseliny jasmonové.

3.2.4 Kyselina salicylová

Metoda směsných anhydridů představuje výhodný způsob přípravy caged-fytohormonů, které ve své molekule neobsahují více reaktivních skupin. Tento postup však není aplikovatelný pro kyselinu salicylovou, která obsahuje reaktivní hydroxylovou skupinu a pro její aktivaci bylo využito reakce s *N*-hydroxysukcinimidem (NHS). Vzniklý ester následně reagoval s příslušným alkoholem z vzniku caged-kyseliny salicylové s NB a NPE chránící skupinou (Schéma 3). Fotolýza všech připravených látek byla testována obdobně jako v případě caged-ABA (Ward a Beale, 1995). Biologické aplikace caged-salicylové kyseliny zatím nejsou známy.

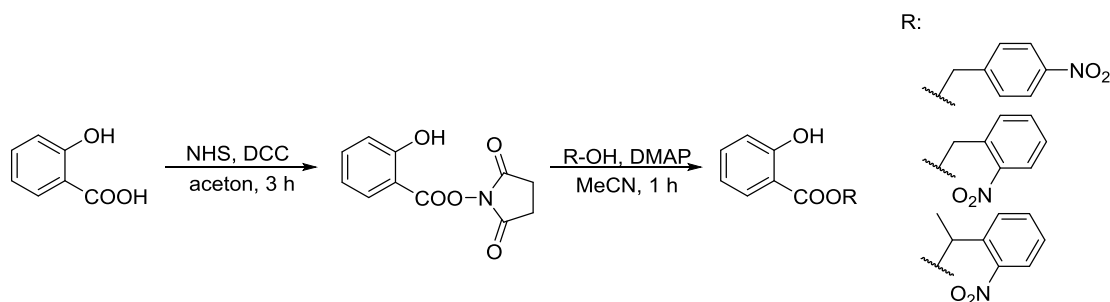


Schéma 3. Syntéza caged-derivátů kyseliny salicylové. Aktivace karboxylové kyseliny pomocí NHS v přítomnosti DCC a následná esterifikace nitrobenzylovými alkoholy katalyzovaná DMAP.

3.2.5 Cytokiny

První, a dosud jediná zmínka o syntéze caged-cytokininů se objevila v roce 2012, kdy tým prof. Hayashiho navrhnul a syntetizoval deriváty BAP a DHZ. Aktivací příslušného alkoholu 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI) a jeho následným připojením na vedlejší řetězec dihydrozeatinu vznikla caged-molekula, která však v podmínkách *in vivo* podléhala hydrolýze. Stablnější deriváty byly připraveny navázáním fotolabilní chránící skupiny na adeninový skelet v poloze N9. V rámci dvoukrokové syntézy byl nejprve syntetizován ochráněný 6-chlor-9H-purin, který byl následně substituován benzylaminem nebo 3-hydroxymethylbutylaminem za vzniku požadovaného caged-cytokininu (Schéma 4).

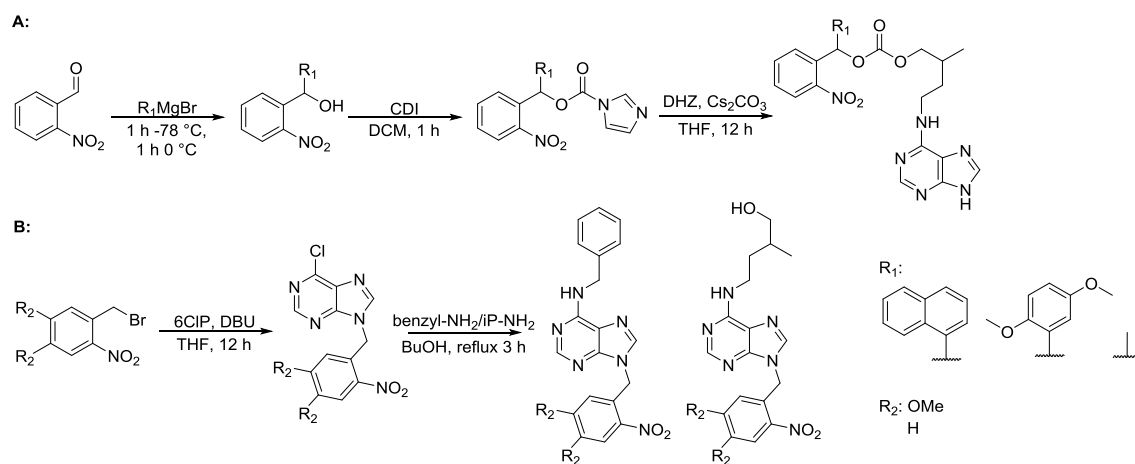


Schéma 4. Syntéza caged-cytokininů. A/ Příprava sekundárního alkoholu reakcí 2-nitrobenzaldehydu s příslušným Grignardovým činidlem, reakce produktu s CDI za vzniku asymetrického karbonátu následovaná reakcí s DHZ v přítomnosti uhličitanu cesného. B/ Alkylace 6CIP 2-nitrobenzylbromidy v přítomnosti DBU následovaná nukleofilní substitucí v poloze C6 příslušným aminem.

Úspěšnost fotolýzy caged-cytokininů byla stanovena pomocí HPLC analýzy roztoků ozařovaných fluorofotometrem při 365 nm. Po 90 min vystavení vzorku UV světlu bylo dosaženo maximálního uvolnění aktivního fytohormonu.

Biologická aktivita připravených derivátů byla testována pomocí kvalitativního i kvantitativního *ARR5::GUS* biotestu, který prokázal zvýšení exprese β -glukuronidas

stimulované fotolytickým uvolněním aktivních cytokininů. Fyziologická reakce rostlin na zvýšenou hladinu exogenních cytokininů byla sledována jako míra inhibice růstu kořene. Délka kořenů rostlin inkubovaných s BAP byla srovnatelná s výsledky naměřenými u rostlin pěstovaných v přítomnosti ozářeného roztoku caged-BAP, čímž byla potvrzena možnost využití světla pro regulaci aktivace biologické odpovědi *in vivo* (Hayashi a kol., 2012).

3.2.6 Auxiny

Syntéza naftyl-1-octové kyseliny s NPE chránící skupinou byla publikována v roce 1985 (Ward a Beale, 1995), avšak bližší charakterizace biologických vlastností caged-auxinů byla provedena až o několik let později (Kusaka a kol., 2009). Vybrané caged-fytohormony byly připraveny esterifikací s různými 2-nitrobenzylalkoholy za vzniku rozsáhlé knihovny látek (Schéma 5). Navazující výzkumy se dále zaměřily na využití kumarinových chránících skupin, které absorbují záření o vyšších vlnových délkách a mohou snáze podléhat fotolýze indukované např. slunečním zářením (Atta a kol., 2010). Připravené kumarinové deriváty IAA a naftoxyoctové kyseliny (NOAA) byly následně použity jako potenciální nástroj pro postupné uvolňování fytohormonů v polních podmínkách (Atta a kol., 2012). V nedávné době byla také nastíněna možnost využití dvoufotonových 4-methoxy-7-nitroindolinových skupin pro syntézu caged-auxinů (Hayashi a kol., 2015).

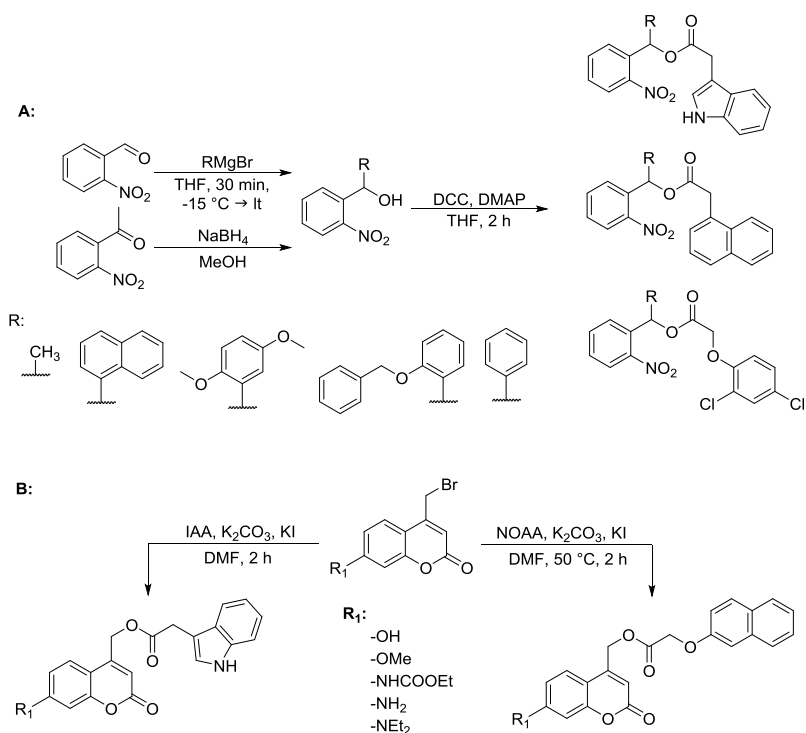


Schéma 5. A/ Syntéza caged-auxinů podle Kusaka a kol., 2009. Příprava sekundárního alkoholu reakcí s Grignardovým činidlem nebo redukcí příslušného ketonu následovaná esterifikací auxinu v přítomnosti DCC a DMAP. **B/ Příprava kumarinových derivátů IAA a NOAA.**

Průběh fotolýzy caged-auxinů *in vitro* byl v průběhu ozařování monitorován pomocí HPLC. Biologická aktivita připravených látek byla testována obdobně jako v případě caged-cytokininů. Výsledky *DR5::GUS* biotestu potvrdily účinnost fotolýzy chránící skupiny po aplikaci světelného impulsu, avšak byla zaznamenána biologická nestabilita některých molekul vlivem působení rostlinných enzymů (Kusaka a kol., 2009). Kromě klasických auxinových biotestů s *A. thaliana* bylo v případě kumarinových derivátů provedeno testování stability látek při vystavení slunečnímu světlu. Rostliny cizrný (*Cicer arietinum* L.) byly pěstovány v přítomnosti caged-auxinů po dobu 10 dní, během nichž byl sledován vývoj kořenů i prýtů. Získané výsledky potvrdily potenciální možnost efektivního využití caged-fytohormonů pro agrochemické aplikace (Atta a kol., 2012).

Experimentální část

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

V experimentální části této práce byly použity následující chemikálie: Murashige-Skoog medium, 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid (X-Gluc) (Duchefa); aceton, dichlormethan (DCM), diethylether, *N,N*-dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol (EtOH), ethyl-acetát (EtOAc), 30% H₂O₂, heptan, hexan, chloroform, isopropanol, methanol (MeOH), NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, petrolether 40-65 °C (PE), sacharosa, tetrahydrofuran (THF), toluen (Lach-Ner, s.r.o.); EDTA, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ (Merck); K₃Fe(CN)₆, K₄Fe(CN)₆ (Neolab); IAA, 2,4-D, kinetin (OChemIm, s. r. o.); CH₃COOH, 98% H₂SO₄, HCl, 60-70% HNO₃, K₂CO₃, Na₂SO₄, triethylamin (Et₃N) (Penta s.r.o.); 2-nitrobenzylbromid, 2-(4-morfolino)ethansulfonová kyselina, 3-brombenzaldehyd, 3,4-dichlorbenzaldehyd, 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP), 4-chlorfenoxisomáselná kyselina, 4-methoxyfenylboronová kyselina, 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromid, Amberlyst[®] 15, benzylamin, deuterovaný aceton (aceton-*d*₆, deuterovaný DMSO (DMSO-*d*₆), deuterovaný chloroform (CDCl₃), deuterovaný methanol (MeOH-*d*₄), diisopropylazodikarboxylát (DIAD), furfurylamin, K₂CO₃, NaBH₄, *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), Phytigel, tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0), trifenylfosfin, Triton-X100 (Sigma-Aldrich) a demi voda. Část výchozích látek pro přípravu caged-cytokininů (3-methoxybenzylamin hydrochlorid, 2-hydroxy-3-methylbenzylamin hydrochlorid) byla získána od Ing. Antonína Šturce, ostatní fytohormony a prekurzory pro jejich syntézu (BAP, iP, INCYDE, 3-methylbut-2-en-1-amin hydrochlorid) byly připraveny v rámci Laboratoře růstových regulátorů.

Suchá rozpouštědla byla připravena destilací nad hydridem vápenatým (dichlormethan) nebo sodíkem (tetrahydrofuran). Příprava ostatních suchých rozpouštědel (DMF, DMSO, EtOH, MeOH, toluen) byla provedena dle Williamse a Lawtona: požadované množství rozpouštědla (20% m/v) bylo přidáno k aktivovanému molekulovému sítu (24 h, 300 °C) a sušeno pod chlorkalciovým uzávěrem po dobu 72 h (Williams a Lawton, 2010).

4.2 Metody

Syntéza za pomoci mikrovln byla provedena v mikrovlnném reaktoru (MR) Discover SP (CEM Corporation) v uzavřeném systému. Reakční směsi byly zahřívány v dynamickém módu s následujícím nastavením – ramp time 2 min, hold time 15 nebo 45 min, pressure 300 PSI, power 120 W, powermax on.

Pro kontrolu průběhu reakcí pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) byly použity hliníkové desky pokryté silikagelem 60 F254 (Merck, US). Složení použité mobilní fáze je uvedeno u jednotlivých látek. Výsledky TLC byly vizualizovány pomocí UV lampy (Camag, Switzerland) při vlnové délce 254 nm nebo použitím vizualizačních činidel (vanilin – 3,2 g vanilinu, 200 ml EtOH, 1 ml konc. kyseliny octové, 2 ml konc. kyseliny sírové; manganistan draselný – 2 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 300 ml H_2O , 5 ml 5% NaOH).

Připravené látky byly separovány za pomoci sloupcové kapalinové chromatografie ve skleněných kolonách naplněných silikagelem Davisil LC60A 40-63 Micron (Grace Davison, UK). Složení použitých elučních směsí je uvedeno u konkrétních látek.

Čistota produktů byla stanovena na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (HPLC Alliance 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA, USA) s kolonou C18 Symmetry (Waters, UK) o rozměrech 2,1 × 150 mm a velikosti částic 5 μm . Vzorky byly rozpuštěny v MeOH, případně v DMSO a naředěny do MeOH na finální koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a nanесeny v objemu 10 μl do počáteční mobilní fáze. 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. Mobilní fázi A tvořil 15 mM HCOONH_4 o pH 4,0, mobilní fázi B MeOH. Detekce analytů byla zprostředkována UV-VIS detektorem s diodovým polem (PDA 2996, Waters, UK) pracujícím v rozmezí vlnových délek 210–400 nm.

Molekulová hmotnost připravených látek byla měřena na hybridním hmotnostním spektrometru s analyzátořem doby letu QqTOF (Waters, UK). Eluent z HPLC byl veden do iontového zdroje (ESI), který byl vyhříván na 120 °C. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 3 kV, na vstupní štěrbině 20 V. K desolvataci docházelo při 250 °C. Jako zmlžovací i desolvatační plyn byl použit dusík. Ionizace probíhala v pozitivním (ESI^+) nebo negativním (ESI^-) módu, následná detekce ve FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-1000.

Získané produkty byly dále analyzovány pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) na spektrometru ECA-500 (Jeol, Japan) při frekvencích 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Měření probíhalo v deuterovaných rozpouštědlech (DMSO, chloroform). Chemické posuny byly kalibrovány na hodnoty příslušných rozpouštědel – ^1H 2,50 ppm residuální pík DMSO, 7,26 ppm residuální pík CHCl_3 a ^{13}C 39,5 ppm signál DMSO- d_6 .

Absorpční spektra všech syntetizovaných produktů v rozmezí vlnových délek 200-500 nm byla změřena na skenovacím spektrofotometru UV-2401 PC (Shimadzu, Japan) nebo Agilent 8453E UV-Vis Spectroscopy System (Agilent Technologies Inc., USA). Látky byly rozpuštěny v DMSO a poté vyředěny do MeOH (20-50 μM , výsledná koncentrace DMSO pod 1 %).

4.3 Syntéza

4.3.1 Příprava prekurzorů pro caged-fytohormony a příprava dvoufotonové chránící skupiny

Syntéza 3,4-dichlorbenzoové kyseliny (1)

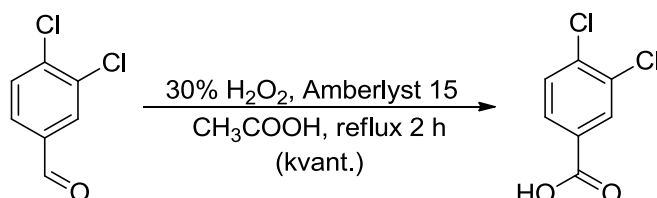


Schéma 6. Příprava 3,4-dichlorbenzoové kyseliny.

3,4-dichlorbenzylaldehyd (3,5 g, 20 mmol) byl rozsuspendován s Amberlystem 15 v H-cyklu (175 mg, 5 hmotnostních %) v kyselině octové (5 ml, 4M). K suspenzi byl přikapán 30% peroxid vodíku (3 ml, 30 mmol) a výsledná směs byla refluxována 2 hodiny. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo pH reakční směsi upraveno pomocí sat. NaHCO₃ na pH 8. Následně byla provedena extrakce nezreagované výchozí látky do EtOAc (3× 20 ml). Vodná frakce byla okyselena 6M HCl na pH 2-3. Vzniklá bílá sraženina byla zfiltrována, promyta vychlazenou vodou a vysušena při 50 °C do konstantní hmotnosti (Yang a kol., 2013).

Syntéza (4,5-dimethoxy-2-nitrofenyl)methanolu (2)

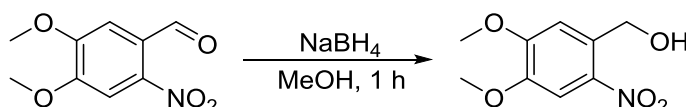


Schéma 7. Redukce 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehydu na (4,5-dimethoxy-2-nitrofenyl)methanol.

K suspenzi 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehydu (5,2 g, 24,62 mmol) v MeOH (150 ml) byl pomalu přisypán NaBH₄ (450 mg, 11,9 mmol) a vzniklý žlutý roztok byl míchán po dobu 1 h za laboratorní teploty. Po odpaření MeOH byla reakční směs rozdělena mezi vodu (75 ml) a EtOAc (3× 50 ml). Spojené organické frakce byly vysušeny Na₂SO₄ a zakoncentrovány za sníženého tlaku na rotační odparce. Surový produkt byl použit přímo do další reakce (Blanc a Bochet, 2002).

Syntéza 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromidu (3)

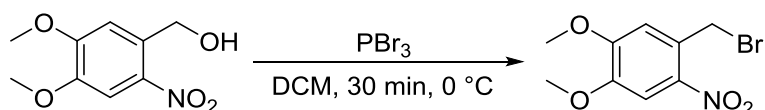


Schéma 8. Bromace (4,5-dimethoxy-2-nitrofenyl)methanolu.

K roztoku látky **2** (1 g, 4,69 mmol) v DCM (46 ml) byl při 0 °C pomalu přikapán PBr₃ (486 μl, 5,16 mmol). Reakce probíhala 30 min při 0 °C a poté byla ke směsi přikapána voda (10 ml). Reakční směs byla extrahována do DCM (1× 10 ml) a po vysušení Na₂SO₄ byla organická frakce odpařena. Získaný produkt byl použit bez další purifikace do následné reakce (Feng a kol., 2012).

Syntéza 5-brom-2-nitrobenzaldehydu (4)

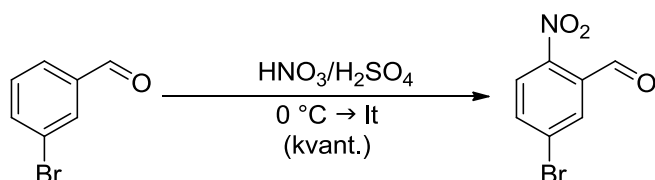


Schéma 9. Nitrace 3-brombenzaldehydu na 5-brom-2-nitrobenzaldehyd.

Ke směsi konc. kyseliny dusičné (5 ml) a konc. kyseliny sírové (10 ml) byl při 0 °C přikapán 3-brombenzaldehyd (3 ml, 22,3 mmol). Reakce probíhala 30 min při 0 °C a poté 45 min při laboratorní teplotě. Reakční směs byla poté nalita do vychlazeného sat. NaHCO₃ za vzniku světle žluté sraženiny, která byla zfiltrována a promyta vodou. Získaný produkt byl použit do následujícího reakčního kroku bez purifikace (Peters a kol., 2013).

Syntéza (5-brom-2-nitrofenyl)methanolu (5)

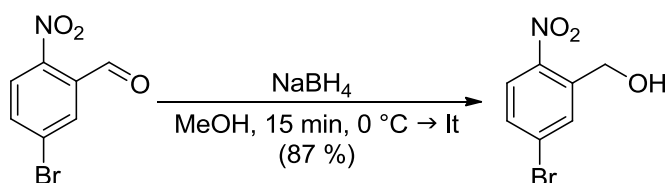


Schéma 10. Redukce 5-brom-2-nitrobenzaldehydu na (5-brom-2-nitrofenyl)methanol.

K roztoku **2** (5,7 g, 22,3 mmol) v MeOH (102 ml) byl při 0 °C v několika dávkách přisypán NaBH₄ (844 mg, 22,3 mmol) a vzniklý oranžový roztok byl míchán 15 min při laboratorní teplotě. Po odpaření MeOH byla reakce zastavena přidáním vychlazené vody (100 ml) a produkt byl extrahován do EtOAc (5× 40 ml). Spojené organické fáze byly promyty sat. NaCl, vysušeny Na₂SO₄ a zakoncentrovány na rotační vakuové

odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze PE/EtOAc 4:1 s EtOAc gradientem) (Boinapally a kol., 2014).

Syntéza 5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzylalkoholu (6)

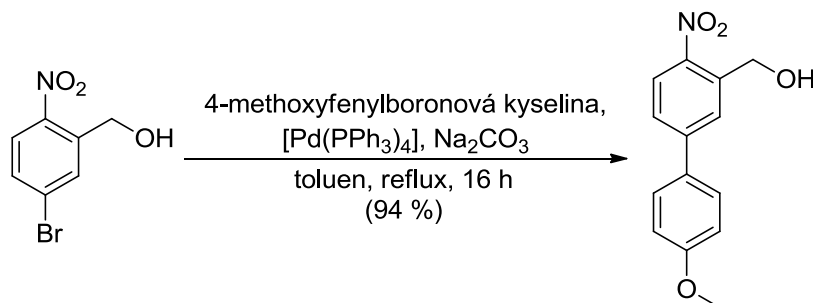


Schéma 11. Syntéza dvoufotonové fotolabilní chránící skupiny.

Suspenze **3** (332 mg, 1,43 mmol) a tetrakis(trifenylfosfin)palladia (330 mg, 20 mol %) v suchém toluenu (24 ml, 0,06M) pod argonem byla míchána 15 min při laboratorní teplotě. Byl přikapán 2M roztok Na_2CO_3 (2,4 ml) a směs byla míchána dalších 30 min. Následně byl do reakce po kapkách přidán roztok 4-methoxyfenylboronové kyseliny (327 mg, 2,15 mmol) v suchém EtOH (2 ml) a výsledná reakční směs byla refluxována 16 h. Po naředění do DCM (150 ml) byla organická fáze promyta vodou (2× 70 ml), sat. $NaHCO_3$ (2× 70 ml) a po vysušení Na_2SO_4 zakonzentrována za sníženého tlaku na vakuové rotační odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze PE/EtOAc 4:1 s EtOAc gradientem) (Aujard a kol., 2006).

4.3.2 Obecný postup pro přípravu caged-cytokininů (látka 7-35)

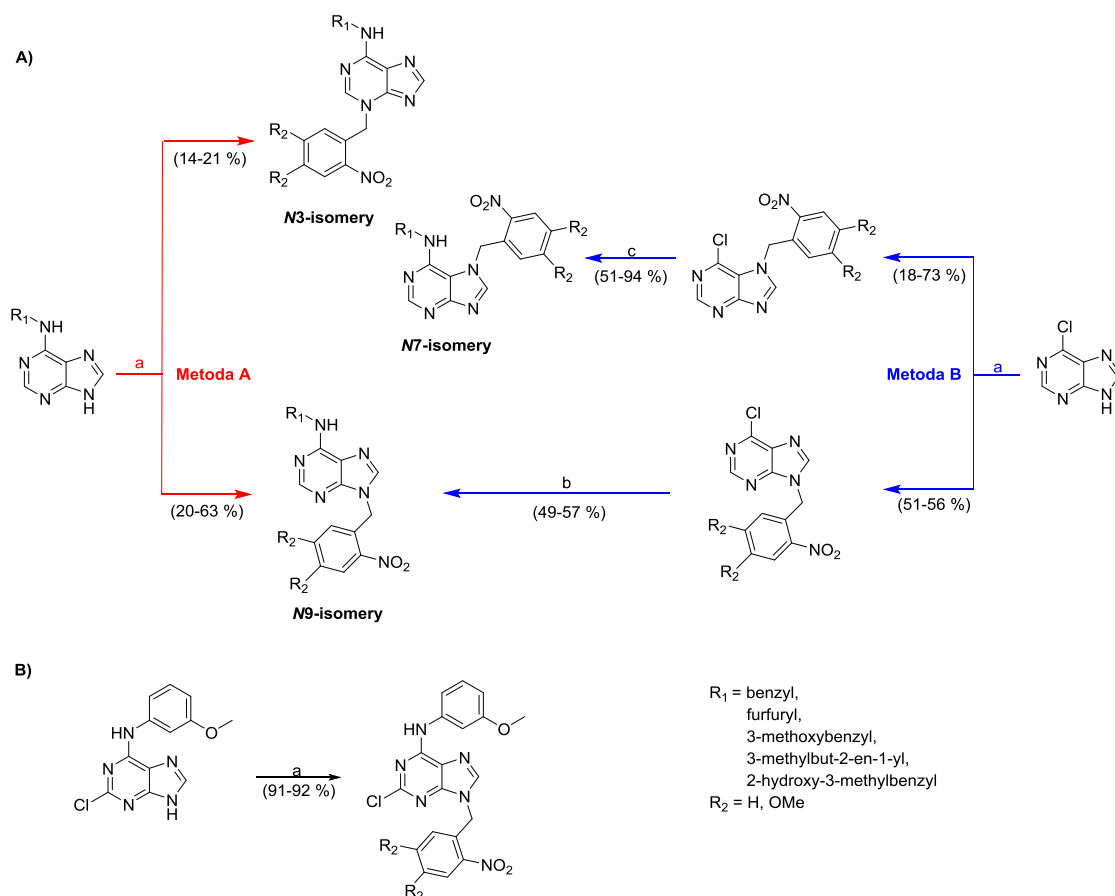


Schéma 12: Obecné schéma syntézy caged-cytokininů. a) 2-nitrobenzylbromid/4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromid, K_2CO_3 , DMSO, 16 h; b) R_1-NH_2 , Et_3N , MeOH, 100 °C, 4 h; c) R_1-NH_2 , Et_3N , MeOH, 120 °C, 45 min, MW.

Metoda A – jedno-kroková syntéza

N9/N3 alkylace (a): K suspenzi cytokininu (1 ekviv., typicky 0,36 mmol) a K_2CO_3 (2 ekviv.) v suchém DMSO (2 ml) pod argonem byl přikapán roztok 2-nitrobenzylbromidu/ 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromidu (1,1 ekviv.) v suchém DMSO (1 ml) a směs byla míchána 16 h při laboratorní teplotě. Po nalití na led byla vzniklá sraženina zfiltrována, promyta vychlazenou vodou a vysušena při 50 °C. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých látek). Touto metodou byly připraveny látky **11**, **13**, **14**, **16**, **18**, **20**, **22**, **24**, **25**, **27**, **28**, **30**, **31** a **32**.

Metoda B – dvou-kroková syntéza

I. *N9/N7 alkylace:* viz výše zmíněný postup a (látky **7-10**)

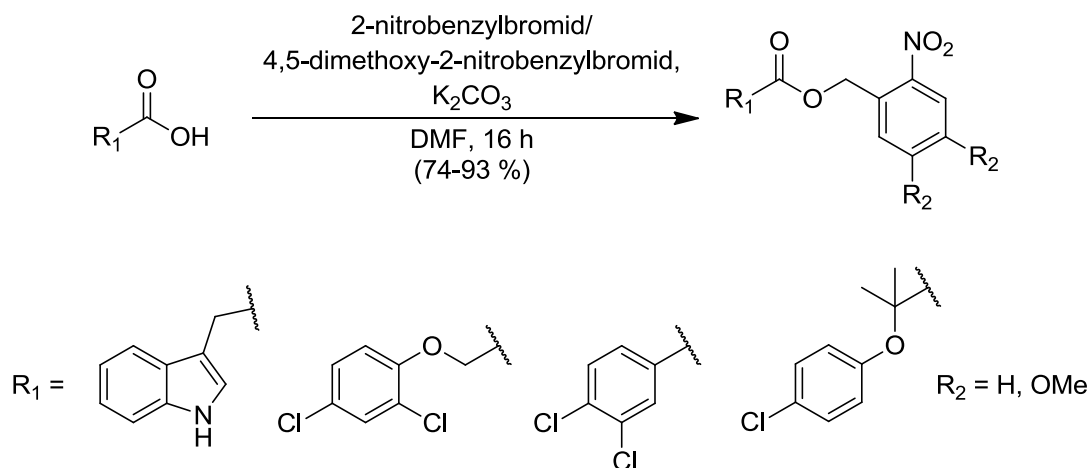
II. *nukleofilní substituce (b):*

Roztok 6-chlor-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purinu/6-chlor-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purinu (1 ekviv., typicky 0,25 mmol), 2-hydroxy-3-methylbenzylamin hydrochloridu

(1,2 ekviv.) a Et₃N (3,5 ekviv.) v MeOH (2,5 ml) byl zahříván v tlakové ampuli na 100 °C po dobu 4 h. Po zakoncentrování na vakuové rotační odparce byl odparek rozsuspendován v ledové vodě (10 ml). Vzniklá sraženina byla zfiltrována, promyta vychlazenou vodou a vysušena při 50 °C. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze uvedeny u jednotlivých látek). Touto metodou byly připraveny látky **34** a **35**.

Postup c: 6-chlor-7-(2-nitrobenzyl)-7*H*-purin/ 6-chlor-7-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-7*H*-purin (1 ekviv, typicky 0,345 mmol), příslušný amin (1,5 ekviv.) a Et₃N (2 ekviv., v případě hydrochloridů 3 ekv.) byl rozsuspendován v MeOH (2,3 ml). Reakční směs byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru na 120 °C po dobu 45 min. Po odpaření MeOH za sníženého tlaku byl odparek rozdělen mezi vodu (5 ml) a EtOAc (4× 10 ml). Spojené organické fáze byly promyty sat. NaCl (1× 10 ml), vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze CHCl₃/MeOH s gradientem MeOH). Touto metodou byly připraveny látky **12**, **15**, **18**, **20**, **23**, **25**, **28**, **31** a **35**.

4.3.3 Obecný postup pro přípravu caged-auxinů (látky 36-41)



Obrázek 9. Obecné schéma syntézy caged-auxinů.

Suspenze auxinu (1 ekviv., typicky 0,571 mmol) a K₂CO₃ (1,05 ekviv.) v suchém DMF (4 ml) pod argonem byla míchána 1 h při laboratorní teplotě. Poté byl přikapán roztok 2-nitrobenzylbromidu/ 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromidu (1 ekviv.) v suchém DMF (2 ml) a výsledná směs byla míchána dalších 16 h. Po naředění vodou (10 ml) byl produkt extrahován do diethyletheru nebo EtOAc (4× 10 ml). Spojené organická frakce byly promyty sat. NaCl (3× 10 ml), vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Část produktů byla

získána v dostatečné čistotě, ostatní byly přečištěny pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze uvedena u konkrétních látek).

4.3.4 Příprava caged-fytohormonů s dvoufotonovou fotolabilní chránicí skupinou

Syntéza 5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzyl-2-(1*H*-indol-3-yl)acetátu (42)

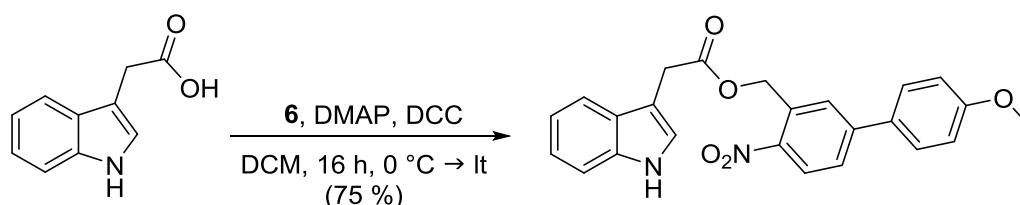


Schéma 13. Syntéza caged-IAA s dvoufotonovou chránicí skupinou.

Ke směsi IAA (34 mg, 0,193 mmol), **6** (50 mg, 0,193 mmol) a DMAP (24 mg, 0,193 mmol) v suchém DCM (5 ml) pod argonem byl při 0 °C přikapán roztok DCC (40 mg, 0,193 mmol) v DCM (0,5 ml). Reakční směs byla míchána 10 min při 0 °C a poté 16 h za laboratorní teploty. Po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií s DCM jako mobilní fází.

Syntéza 6-chlor-9-[5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzyl]-9*H*-purinu (43)

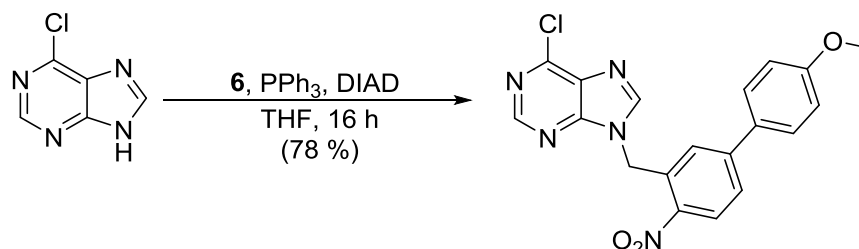


Schéma 14. *N*9 alkylace 6-chlor-9*H*-purinu dvoufotonovou chránicí skupinou.

K suspenzi 6-chlor-9*H*-purinu (50 mg, 0,324 mmol), **6** (101 mg, 0,389 mmol) a trifenyfosfinu (102 mg, 0,389 mmol) v suchém THF (2 ml) pod argonem byl přikapán DIAD (79 μ l, 0,389 mmol). Výsledná reakční směs byla míchána 16 h za laboratorní teploty a poté zakoncentrována za sníženého tlaku na vakuové rotační odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (mobilní fáze PE/EtOAc 4:1 s EtOAc gradientem, poté PE/EtOAc/MeOH 1:1:0,1).

Syntéza 6-benzylamino-9-[5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzyl]-9H-purinu (44)

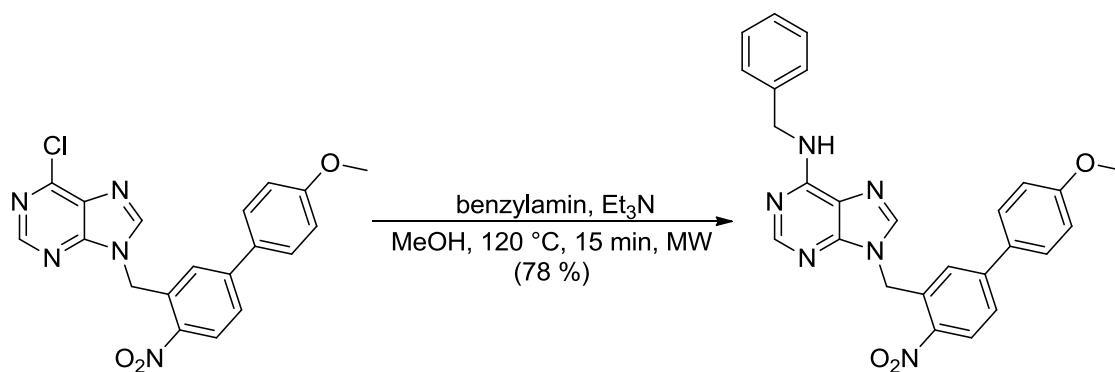


Schéma 15. Nukleofilní substituce 6-chlor-9H-purinu s dvoufotonovou chránící skupinou.

Směs **43** (50 mg, 0,126 mmol), benzylaminu (20 μ l, 0,189 mmol) a Et₃N (44 μ l, 0,315 mmol) v suchém MeOH (1,89 ml) byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru na 120 °C po dobu 15 min. Po zakoncentrování na rotační vakuové odparce, byl odparek rozsuspendován ve vychlazené vodě (5 ml). Pevný podíl byl zfiltrován, promyt vychlazenou vodou a vysušen při 50 °C do konstantní hmotnosti.

4.4 Studium fotolýzy připravených caged-fytohormonů

V návaznosti na bakalářskou práci byly testovány další zdroje záření, které by mohly představovat efektivní nástroj pro odštěpování fotolabilních chránících skupin. Z dostupných přístrojů byla vybrána UV lampa Lightningcure Lc8 (Hamamatsu Corp., USA) a UV crosslinker CL-1000 (UVP, UK).

Úspěšnost fotolýzy caged-fytohormonů byla kvalitativně stanovena pomocí TLC analýzy. Připravené látky byly rozpuštěny v MeOH (1mM, pod 2 % DMSO) a za chlazení ledem byly ozařovány v kádinkách umístěných ve vzdálenosti 5 cm od světelného zdroje. Frakce odebírané ve stanovených intervalech (30 s, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 min) byly nanášeny na TLC desku (mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1) a porovnány s výchozí caged-molekulou a volným fytohormonem.

Průběh fotolýzy byl následně zhodnocen semi-kvantitativně pomocí HPLC-UV/VIS. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny do MeOH (finální koncentrace 1mM, pod 2 % DMSO). Připravené roztoky byly ozařovány (viz výše) a v daných intervalech (20 s, 40 s, 60 s, 90 s, 2, 3, 4, 6, 8, 10 min) byly odebírány alikvoty, které byly přeneseny do vialek a naředěny MeOH do objemu 1 ml s výslednou koncentrací testované látky 10 μ g/ml. Připravené vzorky byly podrobeny standardní HPLC analýze (viz Metody) a získaná spektra byla vyhodnocena v programu MassLynx V4.1. Úspěšnost fotolýzy byla stanovena porovnáním ploch píků výchozí caged-molekuly

a uvolněného fytohormonu. Eventuální vedlejší produkty fotolýzy byly do vyhodnocení započítávány.

4.5 Biologická aktivita

4.5.1 *ARR5::GUS* biotest

Pro ověření biologické aktivity caged-cytokininů byla použita transgenní reportérová linie *Arabidopsis thaliana* *ARR5::GUS*. Kvalitativní stanovení exprese β -glukuronidasy bylo provedeno podle postupu publikovaného Hayashim a kol., 2012. Semena byla sterilizována 70% EtOH s přidavkem 0,01 % Tritonu-X a poté umístěna na pevné MS médium (0,5 \times MS médium, 1 % sacharosa, 0,5 g/l 2-(4-morfolino)ethansulfonová kyselina, 11 g/l phytigel, pH 5,6-5,7). Rostliny byly pěstovány 2 dny při 4 °C ve tmě pro navození synchronizace klíčení a následně kultivovány 4 dny ve fytotronu s režimem 16 h světlo/8 h tma a teplotou 22 °C.

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a poté ve sterilním tekutém MS médiu (finální koncentrace 20 μ M, 0,1 % DMSO). Z připravených roztoků byly odpipetovány 2 ml, které byly přeneseny do kádinek a za chlazení ozařovány po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od světelného zdroje (Lightningcure Lc8). V rámci optimalizace metodologie byly semenáčky *ARR5::GUS* inkubovány ve tmě v médiu s přidavkem ozářených nebo neozářených roztoků při teplotě 24 °C po dobu 1, 2,5, 5 a 7 h. Po opláchnutí barvicím GUS roztokem (0,1 M fosfátový pufr pH 7,2, 10 mM ethylendiamintetraoctová kyselina, 0,5 mM hexakynoželezitan draselný, 0,5 M hexakynoželeznan draselný, 0,1% Triton X-100) byly rostlinky inkubovány v roztoku obsahujícím X-Gluc (1 mM 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid) za laboratorní teploty po dobu 30 min nebo 1 h. Po osušení byly semenáčky pozorovány pod mikroskopem SMZ 168 TL (Intraco micro, ČR) při 20násobném zvětšení.

Kvantitativní stanovení aktivity β -glukuronidasy bylo provedeno podle protokolu dostupného na serveru Aesculab (Aesculab 1). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO (finální koncentrace 10mM) a odebrané frakce byly ozařovány v plastových zkumavkách po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla. K třídním rostlinám byly přidány ozářené nebo neozářené roztoky (výsledná koncentrace testované látky 10 μ M, 0,1 % DMSO) a po inkubaci 17 h byla v polovině vzorků stanovena aktivita GUS měřením fluorescence při excitační/emisní vlnové délce 365/460 nm. V druhé polovině vzorků bylo po extrakci proteinů do fosfátového pufru stanoveno jejich celkové množství metodou Bradfordové s měřením absorbance při 595 nm. Výsledná aktivita β -glukuronidasy byla vztahována na celkový obsah proteinů.

4.5.2 Kompetiční receptorový test

Schopnost připravených látek interagovat s cytokininovým receptorem CRE1/AHK4 byla testována pomocí transgenního kmene *E. coli* KMI001-pINIII/AHK4 konstitutivně exprimujícího cytokininový receptor CRE1/AHK4 podle protokolu dostupného na serveru Aesculab (Aesculab 2). Neozářený zásobní roztok látky **13** (10mM v DMSO) byl po naředění v 96-jamkové desce ve finálních koncentracích (0,01nM, 0,1; 1, 10 a 50μM) testován v kompetici s 10μM 2-[³H]-*trans*-zeatinem. Po ustanovení rovnováhy (30 min, 4 °C) byly vzorky centrifugovány, odstraněn supernatant a po rozpuštění peletu ve scintilačním pufru byla změřena residuální aktivita.

4.5.3 DR5::*GUS* biotest

Pro ověření biologické aktivity caged-auxinů byla použita transgenní reportérová linie *Arabidopsis thaliana* DR5::*GUS*. Kvantitativní stanovení aktivity β-glukuronidasy bylo provedeno analogicky k biotestu ARR5::*GUS*.

4.5.4 Interakce s CKX

Inhibice cytokinindehydrogenasy byla testována na rekombinantním enzymu AtCKX2 (Frébort a kol., 2002). Pro testování byla vybrána látka **31**. Po rozpuštění v DMSO (finální koncentrace 10mM) byla polovina roztoku ozařována UV lampou po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od světelného zdroje. Mikrotitrační deska s reakční směsí obsahující AtCKX2 byla po přidání ozářených a neozářených vzorků inkubována ve tmě po dobu 30 min při 37 °C. Po zastavení enzymatické reakce přidáním 35% kyseliny octové byla změřena absorbance vzorků při 578 nm.

5 Výsledky a diskuze

Primárním cílem této diplomové práce bylo kromě zpracování literární rešerše také rozšíření knihovny již připravených caged-fytohormonů o další deriváty, jejichž biologická aktivita bude dočasně blokována přítomností fotolabilní chránící skupiny. V rámci stanovení fyzikálně-chemických vlastností daných látek (NMR, HPLC-MS) byla pozornost zaměřena i na jejich absorpční vlastnosti, které byly studovány spektrofotometricky. Hlavním záměrem bylo prokázat úspěšnou deprotekcí caged-molekul pomocí optimálního zdroje světla a následně využít získané informace pro studium chování těchto látek v *in vitro* a *in vivo* systémech.

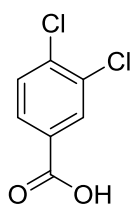
V návaznosti na bakalářskou práci byl znovu syntetizován soubor vybraných caged-cytokininů (BAP, iP, kinetin, 3MBAP, INCYDE) s 2-nitrobenzylou skupinou (NB), který byl později rozšířen o druhou sadu těchto látek substituovaných v poloze N9 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylem (DMNB). Stejně fotolabilní chránící skupiny byly také použity pro přípravu vybraných caged-auxinů a jejich antagonistů.

5.1 Syntéza

5.1.1 Příprava prekurzorů pro caged-fytohormony a příprava dvoufotonové chránící skupiny

V průběhu diplomové práce byly pro syntézu caged-fytohormonů použity jak komerčně zakoupené sloučeniny, tak i výchozí látky připravené z dostupných chemikálií. Jedna z molekul označovaných jako anti-auxiny, kyselina 3,4-dichlorbenzoová (**1**), byla připravena oxidací 3,4-dichlorbenzaldehydu podle Yanga a kol., 2013. V souladu s publikovanými výsledky bylo dosaženo kvantitativního výtěžku reakce.

3,4-dichlorbenzoová kyselina (**1**)



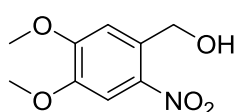
- bílá pevná látka, výtěžek 99 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,39$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 24,92; 99
- ESI-MS m/z : 190,1 $[\text{M-H}]^-$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 7,76 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 7,82 (dd, $J = 8,2, 1,8$ Hz, 1H); 8,04 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 13,50 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 129,33; 130,98; 131,06; 131,39; 131,53; 135,80; 165,45.

Pro syntézu caged-molekul byly primárně používány komerčně dostupné chránící skupiny v podobě 2-nitrobenzylbromidu a 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromidu, avšak druhý zmíněný bromid byl v rámci rozšíření diplomové práce připraven dvoukrokovou syntézou z 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehydu. V prvním kroku byla výchozí látka redukována na příslušný alkohol podle postupu Blanc a Bochet, 2012, přičemž bylo dosaženo vyššího, kvantitativního výtěžku. Vyššího výtěžku oproti publikovaným datům z článku Feng a kol., 2012 bylo také dosaženo při bromaci (4,5-dimethoxy-2-nitrofenyl)methanolu.

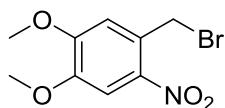
(4,5-dimethoxy-2-nitrofenyl)methanol (2)



- žlutá pevná látka, výtěžek 99 %
- mobilní fáze PE/EtOAc 7:3, R_f = 0,13
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 16,83; 96
- ESI⁺-MS m/z: 236,3 [M+Na]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,53 (s, 1H); 3,95 (s, 3H); 4,00 (s, 3H); 4,95 (s, 2H); 7,17 (s, 1H); 7,70 (s, 1H).

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylbromid (3)



- žlutá pevná látka, výtěžek 99 %
- mobilní fáze PE/EtOAc 7:3, R_f = 0,30
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,63; 43
- ESI⁺-MS m/z: 277,2 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,00 (s, 3H); 4,01 (s, 3H); 4,87 (s, 2H); 6,94 (s, 1H); 7,67 (s, 1H).

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na přípravu caged-molekul s fotolabilními chránícími skupinami odvozenými od 2-nitrobenzylu. Jednu z jejich hlavních nevýhod však představuje absorpce UV záření, jehož vlivem může docházet k negativnímu ovlivnění studovaného biologického systému. Méně poškozující přístup založený na dvoufotonové excitaci v infračervené oblasti představuje zajímavou alternativu aplikovatelnou v rámci syntézy dalších caged-fytohormonů, které by mohly být využity pro výzkumy v podmínkách *in vivo*.

V současné době je známo několik 2-nitrobenzylových derivátů, u nichž byla prokázána schopnost dvoufotonové absorpce (Aujard a kol., 2006). Za účelem vývoje metodologie pro syntézu caged-cytokininů a caged-auxinů s chránící skupinou tohoto typu byla vybrána snadno syntetizovatelná struktura publikovaná v rámci výše

zmíněného článku (Schéma 16, A). Z důvodu nedostupnosti prekurzorů však byl zvolen jiný syntetický postup vedoucí k přípravě (5-jód-2-nitrofenyl)methanolu jako výchozí látky (Bao a kol., 2012) (Schéma 16, B). Tato čtyřkroková syntéza ovšem poskytovala velmi nízké výtěžky a její použití bylo zamítnuto.

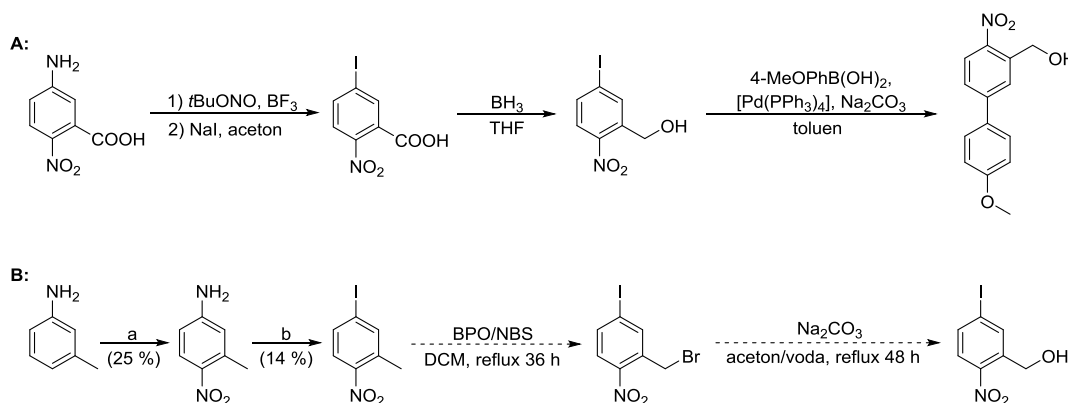
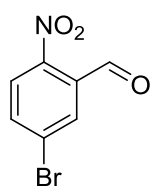


Schéma 16. A/ Syntéza dvoufotonové chránící skupiny podle Aujard a kol., 2006. $t\text{BuONO}$ – *tert*-butyl nitrit, 4-MeOPhB(OH)_2 – 4-methoxyfenylboronová kyselina; **B/ Příprava prekurzoru pro dvoufotonovou chránící skupinu.** a) *m*-toluidin (225 μl , 2,099 mmol), dusičnan guanidinu (256 mg, 2,099 mmol), konc. H_2SO_4 (3 ml), 0 °C, 1 h. b) 7-methyl-4-nitroanilin (250 mg, 1,644 mmol), NaNO_2 (119 mg, 1,726 mmol), KI (382 mg, 2,302 mmol), H_2SO_4 , 0 °C, 2h.

Výsledné reakční schéma vedoucí k syntéze 2-nitrobenzylové dvoufotonové chránící skupiny (viz Syntéza) bylo získáno kombinací dat z několika publikací. Nitrací 3-brombenzaldehydu podle Peters a kol., 2013 bylo dosaženo kvantitativního výtěžku reakce, avšak NMR analýza potvrdila přítomnost minoritního podílu dalšího isomeru, 3-brom-2-nitrobenzaldehydu. Směs produktů byla separována až po redukci, která byla provedena podle postupu Boinapally a kol., 2014. Ve srovnání s publikovanými výsledky bylo dosaženo nižšího výtěžku reakce, který byl způsoben přítomností zmíněných isomerů. Pro následný Suzukiho coupling podle Aujard a kol., 2006 byl použit pouze 5-brom-2-nitrofenylmethanol. Oproti popsanému postupu však nedošlo po 2,5 h ke kompletnímu odreagování výchozí látky a reakční směs byla po zdvojnásobení množství tetrakis(trifenylfosfin)paladia refluxována po dobu 17 h. Modifikací metody bylo na rozdíl od uvedeného článku dosaženo vyššího výtěžku (94 %).

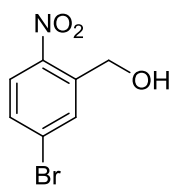
5-brom-2-nitrobenzaldehyd (4)



- světle žlutá pevná látka, výtěžek 99 %
- mobilní fáze PE/EtOAc 9:1, $R_f = 0,32$ (vanilin)
- surový produkt byl použit přímo do následné reakce

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,87 (dd, $J = 8,5; 2,2$ Hz, 1H); 8,02 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 8,06 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 10,41 (s, 1H).

5-brom-2-nitrofenylmethanol (5)

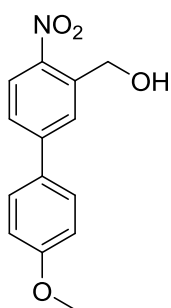


- bílá pevná látka, výtěžek 87 %
- mobilní fáze PE/EtOAc 2:1, Rf = 0,47 (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,90; 97
- ESI⁺-MS m/z: 230,3 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,33 (bs, 1H); 5,02 (s, 2H); 7,60 (dd, *J* = 8,9; 2,1 Hz, 1H); 7,98 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 8,00 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 59,56; 126,58; 127,96; 130,72; 130,81; 141,00; 145,66.

5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzylalkohol (6)



- žlutá pevná látka, výtěžek 94 %
- mobilní fáze PE/EtOAc 2:1, Rf = 0,40 (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 26,42; 98
- ESI⁺-MS m/z: 260,2 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,82 (s, 3H); 4,90 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 5,62 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 7,09 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,72 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,76 (dd, *J* = 8,6; 1,8 Hz, 1H); 8,06 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H); 8,12 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 55,30; 60,18; 114,70; 125,03; 125,40; 125,45; 128,42; 130,31; 139,35; 144,92; 144,99; 160,05.

5.1.2 Příprava caged-cytokininů

V rámci diplomové práce byly podle článku Hayashi a kol., 2012 syntetizovány vybrané caged-cytokininy. Kromě látek s cytokininovou aktivitou (BAP, iP, MBAP, Kin) byly také připraveny deriváty molekul interagujících s metabolickými (Zatloukal a kol., 2008) a signálními drahami CKs (Nisler a kol., 2010). Oproti publikovaným výsledkům byla použita jedнокroková syntéza probíhající přímou alkyací daného cytokininu, což představovalo rychlejší metodu pro získání *N9*-substituovaných derivátů. Tímto postupem byly připraveny primárně *N9*-substituované caged-cytokininy, avšak byl zaznamenán vznik dalšího produktu v minoritním zastoupení. Tyto látky se podařilo v několika případech vyizolovat, purifikovat (**11**, **14**, **25**, **28**) a následně ověřit jejich strukturu pomocí 2D NMR experimentů (viz Přílohy A).

V případě některých látek (**34**, **35**) byla zvolena dvoukroková syntéza sestávající z alkylace 6-chlor-9*H*-purinu a následné substituce 2-hydroxy-3-methylbenzylaminem v pozici C6. Alkyací purinu byl majoritně získán *N9*-substituovaný derivát (**8,10**),

nicméně byl současně pozorován vznik menšího množství *N7* isomeru (**7**, **9**), jehož struktura byla potvrzena také pomocí 2D NMR. Změnou reakčních podmínek (přídavek báze o 25 %) bylo možné zvýšit podíl vzniklého produktu ve prospěch *N7*-substituovaného 6CIP, který byl dále využit jako výchozí látka pro syntézu *N7*-caged cytokininů v mikrovlnném reaktoru (**12**, **15**, **17**, **19**, **21**, **23**, **26**, **29**, **33**).

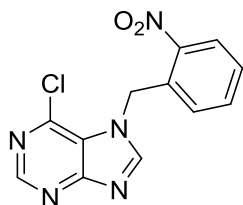
Cílená syntéza *N7* isomerů z látky **7** a **9** umožnila identifikaci minoritního produktu vznikajícího přímou alkylací cytokininů (**11**, **14**, **25**, **28**). Při měření ^1H NMR spekter látek **11**, **14**, **25** a **28** v $\text{DMSO-}d_6$ byly ve spektrech zaznamenány dvě sady signálů v poměru 2:1 s chemickými posuny a štěpením korelující se strukturou připravených derivátů (viz Příloha A1-A4). Porovnáním ^1H spekter *N9* a *N7* isomerů s minoritními produkty alkylatione se zjistilo, že ani jedna ze sad signálů neodpovídá chemickým posunům *N9* a *N7* isomerů, a že se tudíž jedná o jiné isomery (viz Příloha A5). Při měření látky **11** v jiných rozpouštědlech (CDCl_3 , $\text{MeOH-}d_4$, $\text{aceton-}d_6$) docházelo k změně poměrů odpovídajících signálů, což naznačilo, že se jedná pouze o jednu látku ve dvou tautomerních formách.

Obdobná pozorování byla zaznamenána v NMR spektrech látek připravených v rámci studie zaměřené na rozlišení purinových derivátů substituovaných v poloze *N9*, *N7* a *N3* (dosud nepublikovaná data). U zmíněných látek izolovaných v rámci diplomové práce byl pozorován shodný trend jako u *N3* derivátů, jejichž struktura byla ověřena pomocí 2D NMR experimentů. Ze získaných výsledků vyplývá, že při těchto konkrétních reakčních podmínkách dochází během přímé alkylatione cytokininů ke vzniku směsi *N9* a *N3* derivátů s majoritním zastoupením prvního z nich.

Tabulka 2. Shrnutí fyzikálně-chemických vlastností připravených caged-cytokininů a jejich derivátů. Vysvětlivky: a – 2-nitrobenzylová chránící skupina; b – 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylová chránící skupina; Abs λ_{\max} – absorpční maximum odpovídající použité chránící skupině.

Látka	Substituent					Výtěžek (%)	HPLC retenční čas; čistota (min, %)	MS [M+H] ⁺	Abs λ_{\max} (nm)
	C2	C6	N3	N7	N9				
7	H-	Cl-	-	a	-	73	19,18; 97	290,4	-
8	H-		-	-	a	51	20,22; 99	289,8	-
9	H-		-	b	-	18	20,15; 91	350,5	-
10	H-		-	-	b	56	21,16; 99	349,8	-
11	H-	Benzylamino-	a	-	-	20 mg	20,51; 99	361,6	-
12	H-		-	a	-	83	22,41; 99	361,4	274
13	H-		-	-	a	43	24,92; 99	360,2	268
14	H-		b	-	-	34 mg	22,04; 99	421,9	-
15	H-		-	b	-	83	21,78; 99	421,8	278, 339
16	H-		-	-	b	170 mg	25,34; 99	421,9	272, 340
17	H-	3-Methylbut-2-enylamino-	-	a	-	94	23,05; 99	339,4	273
18	H-		-	-	a	20	25,36; 99	339,0	268
19	H-		-	b	-	59	22,61; 99	400,7	-
20	H-	-	-	b	168 mg	25,75; 98	398,9	272, 340	
21	H-	3-MeObenzylamino-	-	a	-	90	22,33; 99	391,5	273
22	H-		-	-	a	21	24,89; 98	390,9	268
23	H-		-	b	-	57	21,84; 99	451,8	-
24	H-		-	-	b	149 mg	25,21; 98	450,8	275, 339
25	H-	Furfurylamino-	a	-	-	16	17,87; 99	351,6	-
26	H-		-	a	-	83	20,11; 99	351,6	271
27	H-		-	-	a	63	22,86; 99	350,6	269
28	H-		b	-	-	40 mg	19,74; 99	411,9	-
29	H-		-	b	-	51	19,81; 99	411,7	277, 340
30	H-		-	-	b	153 mg	23,37; 99	411,2	269, 337
31	Cl-	3-MeOfenylamino-	-	-	a	91	28,60; 99	411,0	307
32	Cl-		-	-	b	92	24,50; 99	470,6	306
33	H-	2-OH-3-Methylbenzylamino-	-	a	-	85	23,72; 99	391,5	273
34	H-		-	-	a	57	26,55; 99	390,9	267
35	H-		-	-	b	49	26,80; 98	450,7	269, 340

6-chlor-7-(2-nitrobenzyl)-7H-purin (7)

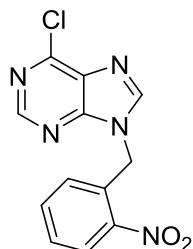


- kolona CHCl₃
- žlutá pevná látka, výtěžek 73 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,50
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 19,18; 97
- ESI⁺-MS m/z: 290,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6,12 (s, 2H); 6,77 (dd, *J* = 7,6; 1,2 Hz, 1H); 7,60-7,67 (m, 2H); 8,23 (dd, *J* = 7,9; 1,5 Hz, 1H); 8,85 (s, 1H); 8,91 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 47,30; 122,42; 125,27; 127,63; 129,19; 132,46; 134,86; 142,35; 146,64; 151,53; 152,00; 161,78.

6-chlor-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (8)

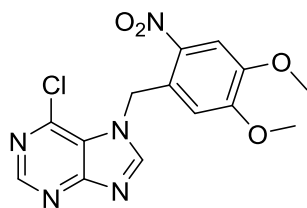


- kolona $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 4:1
- bílá pevná látka, výtěžek 51 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,68$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 20,22; 99
- ESI^+ -MS m/z : 289,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 5,85 (s, 2H); 7,00 (s, 1H); 7,58 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 8,12 (s, 1H); 8,70 (s, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 44,51; 125,25; 129,36; 129,42; 130,88; 134,51; 147,44; 147,79; 149,29; 151,88; 152,22.

6-chlor-7-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-7H-purin (9)

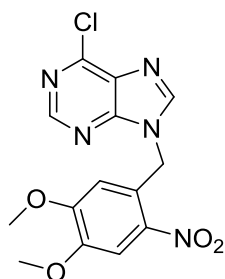


- kolona $\text{PE}/\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ 4:1 až 1:1:0,2
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 18 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,63$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 20,15; 91
- ESI^+ -MS m/z : 350,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 3,62 (s, 3H); 3,89 (s, 3H); 6,03 (s, 2H); 6,47 (s, 1H); 7,79 (s, 1H); 8,78 (s, 1H); 8,84 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 47,57; 56,12; 56,17; 108,56; 110,95; 122,37; 125,87; 139,65; 142,38; 148,17; 151,18; 151,93; 153,51; 161,66.

6-chlor-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purin (10)

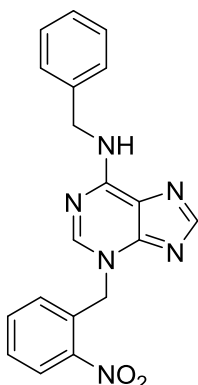


- kolona $\text{PE}/\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ 4:1 až 1:1:0,2
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 56 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,72$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 21,16; 99
- ESI^+ -MS m/z : 349,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 3,73 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 5,74 (s, 2H); 6,98 (s, 1H); 7,66 (s, 1H); 8,61 (s, 1H); 8,73 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 44,91; 56,14; 56,25; 108,41; 113,45; 124,30; 130,78; 140,36; 147,45; 148,33; 149,10; 151,69; 152,08; 153,08.

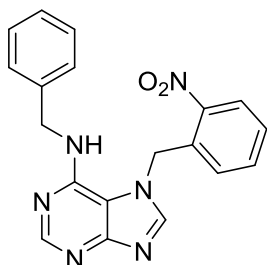
6-benzylamino-3-(2-nitrobenzyl)-3H-purin (11)



- světle žlutá pevná látka, výtěžek 20 mg
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,33
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 20,51; 99
- ESI⁺-MS m/z: 361,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): viz Příloha A1

6-benzylamino-7-(2-nitrobenzyl)-7H-purin (12)

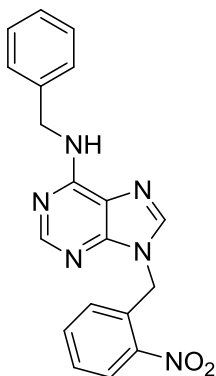


- kolona CHCl₃ s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 83 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,44
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,41; 99
- ESI⁺-MS m/z: 361,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,55 (d, *J* = 5,8 Hz; 2H); 6,20 (s, 2H); 6,26 (dd, *J* = 7,6; 1,2 Hz, 1H); 6,81-6,83 (m, 2H); 7,12 (dd, *J* = 4,9; 1,8 Hz, 3H); 7,26 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 7,59-7,66 (m, 2H); 8,24 (dd, *J* = 8,4; 2,3 Hz, 2H); 8,46 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,75; 47,90; 111,37; 125,34; 126,25; 126,31; 127,25; 128,01; 128,87; 133,77; 134,92; 139,54; 146,40; 146,73; 150,17; 152,46; 159,74.

6-benzylamino-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (13)

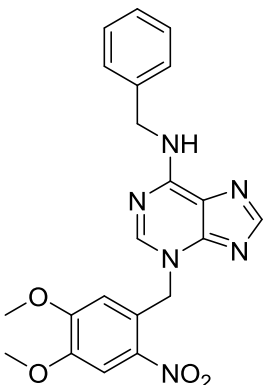


- kolona CHCl₃/MeOH 19:1 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 43 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,70
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 24,92; 99
- ESI⁺-MS m/z: 360,2 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,71 (bs, 2H); 5,75 (s, 2H); 6,91 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,18-7,37 (m, 5H); 7,58 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H); 7,66 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H); 8,14 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H); 8,21 (s, 1H); 8,45 (bs, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 43,44; 44,04; 119,51; 125,60; 127,16; 127,78; 128,74; 129,39; 129,60; 132,54; 134,93; 140,61; 141,58; 147,91; 149,66; 153,31; 154,92.

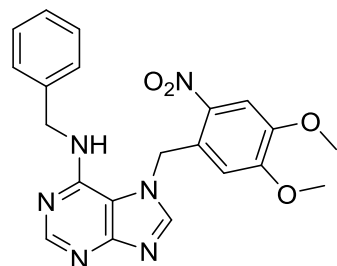
6-benzylamino-3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3*H*-purin (14)



- světle žlutá pevná látka, výtěžek 34 mg
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,66$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,04, 99
- ESI⁺-MS m/z: 421,9 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): viz Příloha A2

6-benzylamino-7-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-7*H*-purin (15)

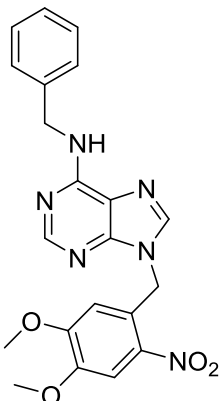


- kolona CHCl_3 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 83 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,40$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 21,78; 99
- ESI⁺-MS m/z: 421,8 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,27 (s, 3H); 3,89 (s, 3H); 4,58 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H); 5,77 (s, 1H); 6,12 (s, 2H); 6,90-6,92 (m, 2H); 7,13-7,15 (m, 3H); 7,30 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H); 7,79 (s, 1H); 8,27 (s, 1H); 8,38 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 42,81; 48,15; 55,48; 56,16; 108,55; 108,63; 111,35; 2x 126,38; 126,44; 2x 127,70; 127,90; 139,14; 139,64; 146,52; 147,83; 150,13; 152,52; 153,47; 159,58.

6-benzylamino-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9*H*-purin (16)

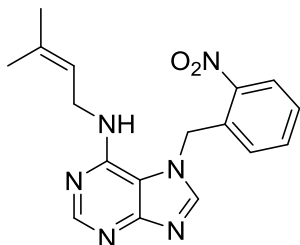


- světle žlutá pevná látka, výtěžek 170 mg
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,53$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 25,34; 99
- ESI⁺-MS m/z: 421,9 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,71 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 4,70 (s, 2H); 5,66 (s, 2H); 6,89 (s, 1H); 7,20 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,33 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,70 (s, 1H); 8,14 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,40 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 42,86; 43,92; 56,06; 56,13; 108,33; 112,76; 118,92; 125,60; 126,58; 127,13; 128,18; 140,07; 140,23; 140,72; 148,08; 149,09; 152,61; 153,01; 154,37.

6-(3-metylbut-2-en-1-ylamino)-7-(2-nitrobenzyl)-7H-purin (17)

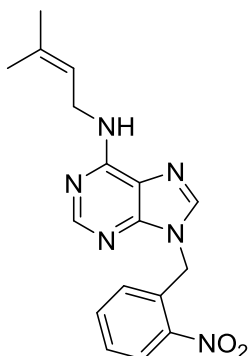


- kolona CHCl_3 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 94 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,35$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 23,05; 99
- ESI⁺-MS m/z: 339,5 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,52 (s, 3H); 1,57 (s, 3H); 3,86 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H); 4,90-4,93 (m, 1H); 6,12 (s, 2H); 6,27 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 6,73 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 7,55-7,62 (m, 2H); 8,21 (dd, $J = 7,8; 1,7$ Hz, 1H); 8,30 (s, 1H); 8,39 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 17,72; 25,34; 38,04; 47,64; 111,47; 122,04; 125,19; 126,51; 128,83; 133,01; 133,53; 134,72; 146,39; 146,49; 150,16; 152,48; 159,51.

6-(3-metylbut-2-en-1-ylamino)-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (18)

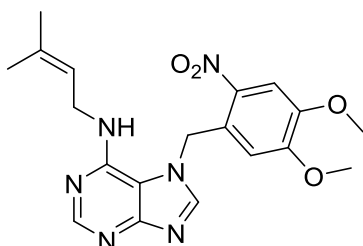


- kolona $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 20 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,64$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 25,36; 99
- ESI⁺-MS m/z: 339,0 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,64 (s, 3H); 1,67 (s, 3H); 4,03 (bs, 2H); 5,28 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,70 (s, 2H); 6,84 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H); 7,55 (td, $J = 6,7; 1,5$ Hz, 1H); 7,62 (td, $J = 6,1; 1,2$ Hz, 1H); 7,91 (bs, 1H); 8,11 (dd, $J = 8,3; 1,5$ Hz, 1H); 8,14 (bs, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 18,32; 25,87; 38,14; 43,91; 122,63; 125,50; 129,24; 129,50; 132,51; 133,61; 134,81; 141,21; 147,82; 153,23; 154,73.

6-(3-metylbut-2-en-1-ylamino)-7-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-7H-purin (19)



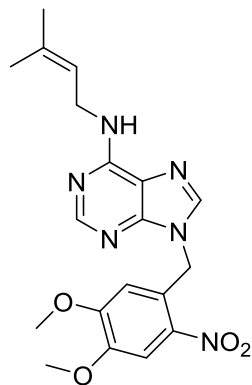
- žlutá pevná látka, výtěžek 59 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,34$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,61; 99
- ESI⁺-MS m/z: 400,7 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,55 (s, 3H);

1,58 (s, 3H); 3,42 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 3,91 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 4,99 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H); 6,00 (s, 1H); 6,03 (s, 2H); 6,75 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 7,77 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,30 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 17,64; 25,27; 37,94; 47,99; 55,58; 56,12; 108,45; 109,43; 111,50; 121,85; 127,16; 133,32; 139,35; 146,03; 147,83; 150,14; 152,50; 153,32; 159,35.

6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purin (20)

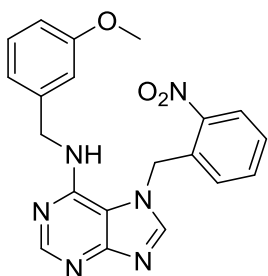


- světle žlutá pevná látka, výtěžek 168 mg
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,63$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 25,75; 98
- ESI⁺-MS m/z : 398,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1,67 (d, $J = 15,9$ Hz, 6H); 3,71 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 4,05 (s, 2H); 5,30 (s, 1H); 5,65 (s, 2H); 6,87 (s, 1H); 7,69 (s, 1H); 7,86 (s, 1H); 8,10 (s, 1H); 8,20 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 17,85; 25,40; 37,68; 43,87; 56,07; 56,13; 108,33; 112,63; 118,93; 122,18; 125,71; 133,12; 140,21; 140,45; 148,07; 148,90; 152,65; 153,02; 154,19.

6-(3-methoxybenzylamino)-7-(2-nitrobenzyl)-7H-purin (21)

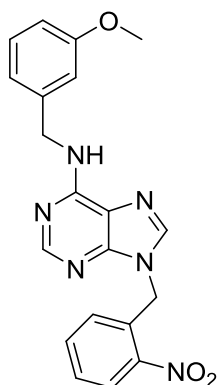


- kolona CHCl_3 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 90 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, $R_f = 0,30$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,33; 99
- ESI⁺-MS m/z : 391,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,65 (s, 3H); 4,53 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H); 6,20 (s, 2H); 6,27 (dd, $J = 7,6; 0,9$ Hz, 1H); 6,36 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H); 6,58 (s, 1H); 6,70 (dd, $J = 7,9; 2,1$ Hz, 1H); 7,03 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,25 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H); 7,57-7,64 (m, 2H); 8,23 (dd, $J = 7,9; 1,5$ Hz, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,45 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 42,85; 47,89; 54,90; 111,37; 111,65; 112,24; 118,36; 125,33; 126,25; 128,87; 129,06; 133,75; 134,91; 141,23; 146,34; 146,71; 150,17; 152,44; 159,12; 159,70.

6-(3-methoxybenzylamino)-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (22)

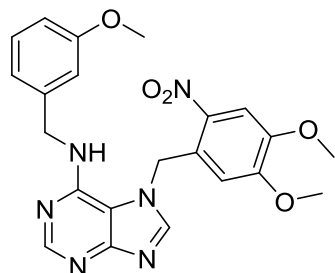


- kolona EtOAc/PE 1:1, 2:1
- bílá pevná látka, výtěžek 21 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,63
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 24,89; 98
- ESI⁺-MS m/z: 390,9 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,67 (s, 3H); 4,64 (bs, 2H); 5,71 (s, 2H); 6,75 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,17 (td, *J* = 8,0 Hz; 1,2 Hz, 1H); 7,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,62 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 8,42 (bs, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,86; 43,51; 54,91; 111,83; 113,08; 118,97; 119,42; 125,06; 128,85; 129,06; 129,27; 131,99; 134,39; 141,05; 141,68; 147,38; 149,14; 152,75; 154,37; 159,21.

6-(3-methoxybenzylamino)-7-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-7H-purin (23)



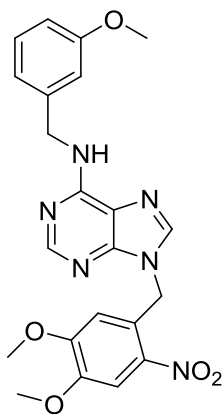
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 57 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,39
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 21,84; 99
- ESI⁺-MS m/z: 451,8 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,30 (s, 3H); 3,66 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 4,57 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 5,82 (s, 1H);

6,11 (s, 2H); 6,45 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 6,65 (s, 1H); 6,71 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,03 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,29 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 7,77 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,36 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,91; 48,12; 54,83; 55,49; 56,10; 108,51; 108,74; 111,38; 111,71; 112,48; 118,46; 127,58; 128,92; 139,09; 141,30; 146,45; 147,85; 150,15; 152,48; 153,47; 159,15; 159,52.

6-(3-methoxybenzylamino)-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purin (24)



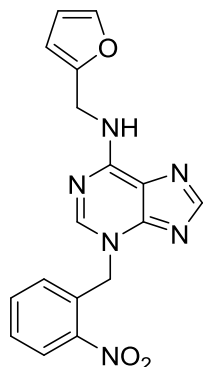
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 149 mg
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,57
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 25,21; 98
- ESI⁺-MS m/z: 450,8 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,69 (s, 3H); 3,71 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 4,67 (s, 2H); 5,66 (s, 2H); 6,77 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,88-6,91 (m, 3H); 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,69 (s, 1H); 8,14 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,37 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42,83; 43,94; 54,89; 56,04;

56,13; 108,34; 111,81; 112,71; 112,96; 118,92; 119,32; 125,63; 129,25; 140,22;
140,76; 141,70; 148,08; 149,10; 152,61; 153,02; 154,36; 159,21.

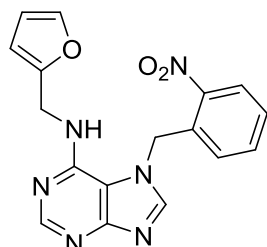
6-furfurylamino-3-(2-nitrobenzyl)-3*H*-purin (25)



- kolona CHCl₃ s MeOH gradientem
- bílá pevná látka, výtěžek 121 mg
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,45
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 17,87; 99
- ESI⁺-MS m/z: 351,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): viz Příloha A3

6-furfurylamino-7-(2-nitrobenzyl)-7*H*-purin (26)

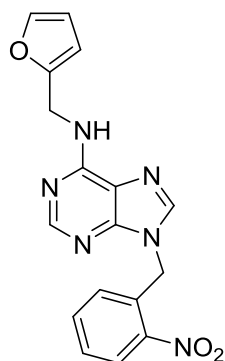


- kolona CHCl₃ s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 83 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,23
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 20,11; 99
- ESI⁺-MS m/z: 351,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,52 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 5,79 (dd, *J* = 3,1; 0,9 Hz, 1H); 6,16 (s, 2H); 6,25-6,26 (m, 1H); 6,28 (dd, *J* = 7,6; 0,9 Hz, 1H); 7,20 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 7,44-7,44 (m, 1H); 7,59 (dtd, *J* = 20,9; 7,6; 1,5 Hz, 2H); 8,22 (dd, *J* = 7,9; 1,2 Hz, 1H); 8,32 (s, 1H); 8,44 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 36,93; 47,81; 105,84; 110,25; 111,51; 125,28; 126,35; 128,84; 133,65; 134,83; 141,57; 146,38; 146,80; 149,92; 152,33; 152,64; 159,77.

6-furfurylamino-9-(2-nitrobenzyl)-9*H*-purin (27)



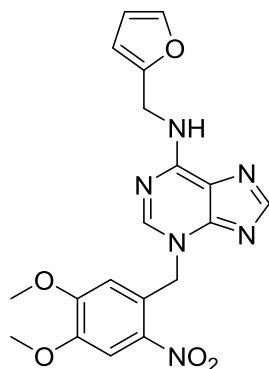
- kolona CHCl₃ s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 63 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,63
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 22,86; 99
- ESI⁺-MS m/z: 350,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,66 (bs, 1H), 5,72 (s, 2H), 6,22 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,33 (dd, *J* = 3,1 Hz, 1,8 Hz, 1H), 6,86

(d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H), 7,54 (td, $J = 8,0$ Hz; 0,9 Hz, 1H), 7,62 (td, $J = 7,3$ Hz; 0,9 Hz, 1H), 8,11 (dd, $J = 8,3$ Hz; 1,2 Hz, 1H), 8,18 (bs, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,32 (bs, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 36,97, 44,05, 107,28, 110,98, 119,57, 125,61, 129,36, 129,61, 132,53, 134,93, 141,70, 142,36, 147,91, 149,76, 153,20, 153,44, 154,69.

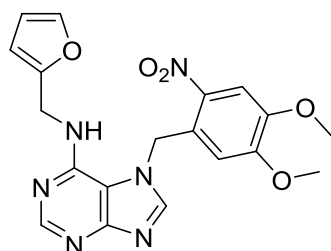
6-furfurylamino-3-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-3H-purin (28)



- světle žlutá pevná látka, výtěžek 40 mg
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,50$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 19,74; 99
- ESI⁺-MS m/z : 411,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): viz Příloha A4

6-furfurylamino-7-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-7H-purin (29)

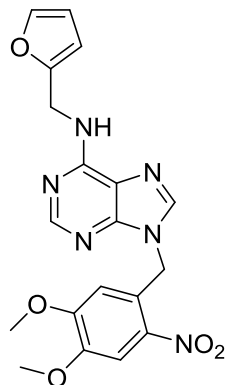


- kolona CHCl_3 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 51 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,37$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 19,81; 99
- ESI⁺-MS m/z : 411,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,36 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 4,57 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H); 5,92 (s, 1H); 5,93 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,06 (s, 2H); 6,28-6,29 (m, 1H); 7,21 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H); 7,41-7,42 (m, 1H); 7,77 (s, 1H); 8,33 (s, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 36,81; 48,06; 55,54; 56,13; 106,10; 108,53; 109,14; 110,22; 111,53; 127,32; 139,20; 141,59; 146,44; 147,82; 149,93; 152,36; 152,64; 153,40; 159,60.

6-furfurylamino-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purin (30)



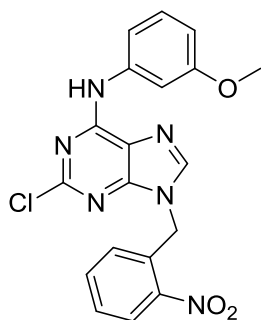
- bílá pevná látka, výtěžek 153 mg
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,72$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 23,37; 99
- ESI⁺-MS m/z : 411,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,71 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 4,68 (s, 2H); 5,66 (s, 2H); 6,23 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,35

(d, $J = 2.8$ Hz, 1H); 6,88 (s, 1H); 7,53 (d, $J = 0,6$ Hz, 1H); 7,70 (s, 1H); 8,14 (s, 1H); 8,24 (s, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 36,42; 43,93; 56,07; 56,13; 106,65; 108,34; 110,43; 112,69; 118,98; 125,60; 140,22; 140,85; 141,81; 148,08; 152,51; 152,93; 153,02; 154,13.

2-chlor-6-[(3-methoxyfenyl)amino]-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (31)

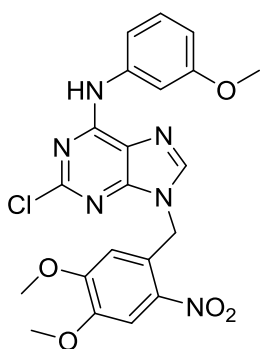


- kolona $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 4:1
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 91 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 4:1, $R_f = 0,52$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 28,60; 99
- ESI⁺-MS m/z: 411,0 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,76 (s, 3H); 5,78 (s, 2H); 6,69 (dd, $J = 8,3; 2,1$ Hz, 1H); 6,96 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,27 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H); 7,47 (dd, $J = 8,3; 1,2$ Hz, 1H); 7,60-7,63 (m, 2H); 7,69 (td, $J = 7,6; 1,3$ Hz, 1H); 8,19 (dd, $J = 8,1; 1,4$ Hz, 1H); 8,35 (s, 1H); 10,40 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43,98; 54,97; 107,13; 108,74; 113,40; 118,85; 125,25; 128,88; 129,28; 129,32; 141,48; 134,59; 139,95; 142,58; 147,32; 151,09; 152,42; 152,55; 159,35.

2-chlor-6-[(3-methoxyfenyl)amino]-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purin (32)

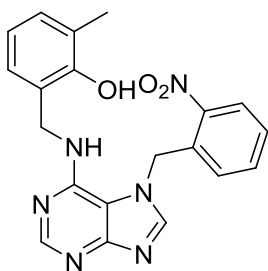


- světle žlutá pevná látka, výtěžek 92 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 9:1, $R_f = 0,41$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 24,50; 99
- ESI⁺-MS m/z: 470,6 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,75 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 5,66 (s, 2H); 6,67 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H); 7,05 (s, 1H); 7,25 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,46 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,59 (s, 1H); 7,72 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 10,32 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 44,54; 54,94; 56,17; 106,99; 108,41; 108,66; 113,27; 113,56; 118,75; 124,71; 129,27; 140,00; 140,28; 142,23; 148,28; 150,97; 152,28; 152,32; 153,04; 159,33.

6-[(2-hydroxy-3-methylbenzyl)amino]-7-(2-nitrobenzyl)-7H-purin (33)

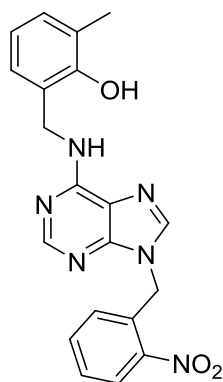


- kolona CHCl₃/MeOH s gradientem MeOH
- bílá pevná látka, výtěžek 85 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,38
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 23,72; 99
- ESI⁺-MS m/z: 391,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,12 (s, 3H); 4,43 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 6,18 (s, 2H); 6,31 (dd, *J* = 7,5; 1,4 Hz, 1H); 6,41 (dd, *J* = 7,3; 1,2 Hz, 1H); 6,50 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 6,91 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 7,31 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H); 7,57-7,63 (m, 2H); 8,24 (dd, *J* = 7,8; 1,7 Hz, 1H); 8,31 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 9,56 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 16,43; 39,76; 47,94; 111,39; 118,94; 124,78; 125,35; 125,45; 126,01; 126,47; 128,93; 129,20; 133,56; 134,91; 146,42; 146,91; 149,97; 151,94; 152,77; 159,55.

6-[(2-hydroxy-3-methylbenzyl)amino]-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (34)

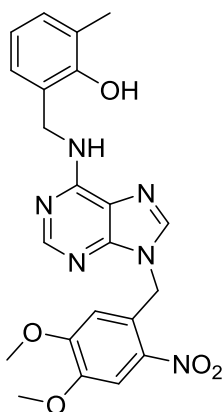


- kolona CHCl₃/aceton 9:1
- bílá pevná látka, výtěžek 57 %
- mobilní fáze CHCl₃/aceton 9:1, R_f = 0,35
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 26,55; 99
- ESI⁺-MS m/z: 390,9 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,15 (s, 3H); 4,52 (d, *J* = 3,6 Hz, 2H); 5,76 (s, 2H); 6,70 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 6,85 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,00 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,08 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,57 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,63 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 8,14 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 8,27 (s, 1H); 8,72 (s, 1H); 10,52 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 16,49; 43,67; 118,96; 119,13; 125,09; 125,49; 128,13; 128,72; 129,07; 129,81; 131,89; 134,44; 141,57; 147,28; 148,89; 152,05; 153,39; 153,64 – 1 signál pod DMSO, 1 signál není vidět.

**6-[(2-hydroxy-3-methylbenzyl)amino]-9-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-9H-purin
(35)**



- světle žlutá pevná látka, výtěžek 49 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,71
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 26,80; 98
- ESI⁺-MS m/z: 450,7 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,14 (s, 3H); 3,72 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 4,51 (s, 2H); 5,66 (s, 2H); 6,68 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 6,89 (s, 1H); 6,99 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,05 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,69 (s, 1H); 8,16 (s, 1H); 8,30 (s, 1H); 8,63 (s, 1H); 10,51 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 16,49; 44,06; 2x 56,13; 108,36; 112,79; 118,86; 119,10; 2x 125,40; 125,50; 128,03; 129,79; 140,21; 141,23; 148,13; 148,85; 151,90; 153,04; 153,39; 153,62 – 1 signál pod DMSO.

5.1.3 Příprava caged-auxinů

Jedním z dalších cílů této diplomové práce bylo doplnit připravený soubor caged-fytohormonů o fotolabilní deriváty auxinů, jakožto významných fytohormonů, které ve spolupráci s cytokininy regulují významné procesy růstu a vývoje rostlin. První caged-auxiny byly připraveny metodou směsných anhydridů, které následně reagovaly s primárním nebo sekundárním alkoholem za vzniku požadovaného derivátu (Ward a Beale, 1995). V rámci diplomové práce byl zvolen jednodušší postup pro syntézu auxinových esterů, který byl založený na přípravě draselné soli daného auxinu a následné substituci příslušným bromidem. Reakční podmínky byly v porovnání se syntézou caged-cytokininů obdobné, pouze byl snížen nadbytek báze a alkylačního činidla a jako rozpouštědlo byl použit DMF. Uvedeným způsobem byla připravena skupina 6 caged-derivátů, mezi nimiž byly kromě přirozených auxinů (**36**, **37**) i látky s herbicidními (**38**, **39**) a antiauxinovými účinky (**40**, **41**). Podobné reakční schéma bylo publikováno v rámci patentu, který se zabýval syntézou fotolabilních agrochemikálií (Morgenstern, 2013). V popsaném postupu bylo pro tvorbu soli 2,4-D využito organické báze Et₃N a reakce probíhala v THF při 75 °C po dobu 15 h. Získaný kvantitativní výtěžek byl oproti výsledkům dosaženým v této diplomové práci vyšší (výtěžky 74-90 %).

Tabulka 3. Shrnutí fyzikálně-chemických vlastností připravených caged-auxinů. Vysvětlivky: a – 2-nitrobenzylóvá chránicí skupina; b – 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylóvá chránicí skupina; Abs λ_{\max} – absorpční maximum odpovídající použité chránicí skupině.

Látka	Auxin	Substituent	Výtěžek (%)	HPLC retenční čas; čistota (min, %)	MS [M+H] ⁺	Abs λ_{\max} (nm)
36	IAA	a	88	27,12; 99	311,3	267
37		b	74	27,65; 97	371,4	281, 340
38	2,4-D	a	93	29,05; 99	372,7	260
39		b	80	28,91; 97	432,6	289, 339
40	CPIBA	a	74	29,45; 99	367,3	260
41	DCBA	a	82	31,24; 99	343,2	250

Kromě auxinových esterů z primárních alkoholů je možné připravit caged-deriváty se stéricky bráněným esterem, čehož lze dosáhnout reakcí se sekundárním alkoholem. V rámci publikovaných experimentů bylo prokázáno, že struktura vedlejšího řetězce daného alkoholu ovlivňuje biologickou stabilitu caged-molekuly a introdukcí např. aromatického kruhu lze zabránit nežádoucímu enzymatickému rozštěpení esterové vazby (Kusaka a kol., 2009). V návaznosti na tento článek byl proveden pokus o reprodukci publikované syntézy, avšak ani při použití různých výchozích látek a optimalizaci reakčních podmínek nebylo dosaženo přijatelných výtěžků (Schéma 17). Pro účely diplomové práce byla uvedená syntéza zavrhnuta, nicméně pro navazující výzkumy představuje příprava dalšího derivátu 2-nitrobenzylóvé chránicí skupiny zajímavou alternativou.

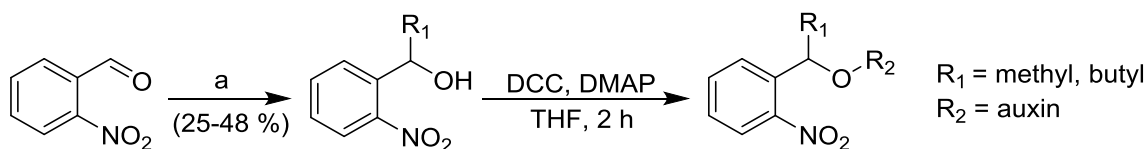
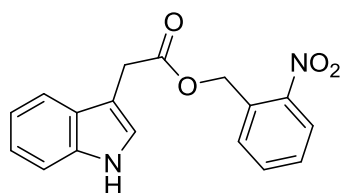


Schéma 17. Syntéza caged-auxinů esterifikací ze sekundárního alkoholu. a) MeMgCl (3 ekviv.)/R₁Li (1,1 ekviv.), THF/Et₂O, -78/-15/0 °C.

2-nitrobenzyl 2-(1H-indol-4-yl)acetát (36)

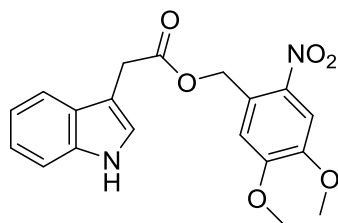


- žlutá kapalina, výtěžek 88 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,44 (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 27,12; 99
- ESI⁺-MS m/z: 311,3 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,86 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 6,96-6,99 (m, 1H); 7,07-7,10 (m, 1H); 7,28 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,36 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,49 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,60 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,68-7,71 (m, 1H); 8,11 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 10,98 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 30,53; 62,44; 106,62; 111,44; 118,45; 118,52; 121,12; 124,25; 124,82; 127,02; 129,20; 129,22; 131,57; 134,00; 136,09; 147,32; 171,21.

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl 2-(1*H*-indol-4-yl)acetát (37)

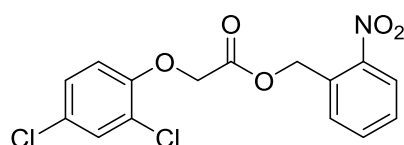


- světle žlutá pevná látka, výtěžek 74 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,68$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 27,65; 97
- ESI⁺-MS m/z : 371,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 3,49 (s, 3H); 3,84 (s, 3H); 3,87 (s, 2H); 5,43 (s, 2H); 6,86 (s, 1H); 6,98 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H); 7,08 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 7,32 (s, 1H); 7,36 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 7,53 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,67 (s, 1H); 11,01 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 30,32; 55,68; 56,04; 62,57; 106,64; 108,12; 110,16; 111,44; 118,44; 118,63; 121,17; 124,35; 126,66; 127,02; 136,15; 139,31; 147,71; 153,17; 171,11.

2-nitrobenzyl 2-(2,4-dichlorfenoxy)acetát (38)

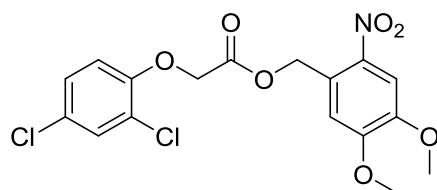


- kolona CHCl_3
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 93 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,87$ (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 29,05; 99
- ESI⁺-MS m/z : 372,73 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 5,10 (s, 2H); 5,55 (s, 2H); 7,16 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,35 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,60 (s, 1H); 7,64 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 7,71 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H); 7,79 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 8,15 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 62,99; 65,28; 115,10; 122,36; 124,94; 125,21; 127,94; 129,31; 129,43; 129,47; 131,06; 134,18; 147,15; 152,09; 167,84.

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl 2-(2,4-dichlorfenoxy)acetát (39)



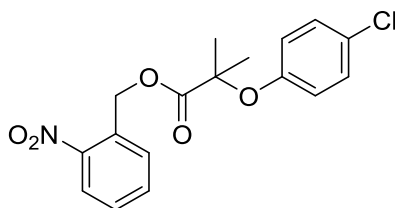
- kolona $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 40:1 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 80 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,70$ (vanilin)

- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 28,91; 97
- ESI⁺-MS m/z: 432,69 [M+NH₄]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,87 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 5,08 (s, 2H); 5,50 (s, 2H); 7,14 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7,19 (s, 1H); 7,34 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7,59 (s, 1H); 7,70 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 56,10; 56,27; 63,30; 65,36; 108,21; 111,57; 115,07; 122,35; 125,21; 125,50; 127,93; 129,45; 139,71; 148,10; 152,11; 153,19; 167,85.

2-nitrobenzyl 2-(4-chlorfenoxy)-2-methylpropanoát (40)

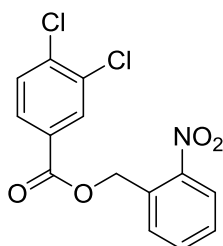


- žlutá kapalina, výtěžek 74 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,77 (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 29,45; 99
- ESI⁺-MS m/z: 367,3 [M+NH₄]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,54 (s, 6H); 5,52 (s, 2H); 6,82 (dd, *J* = 6,7; 2,1 Hz, 2H); 7,27 (dd, *J* = 6,7; 2,1 Hz, 2H); 7,60-7,66 (m, 2H); 7,76 (td, *J* = 7,5; 1,1 Hz, 1H); 8,10 (dd, *J* = 8,3; 1,2 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,89; 63,60; 79,23; 120,71; 124,90; 126,03; 129,15; 129,64; 129,86; 130,52; 134,05; 147,59; 153,71; 172,42.

2-nitrobenzyl 3,4-dichlorobenzoát (41)



- kolona PE/EtOAc 10:1 s EtOAc gradientem
- bílá pevná látka, výtěžek 82 %
- mobilní fáze CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,83
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 31,24; 99
- ESI⁺-MS m/z: 343,2 [M+NH₄]⁺

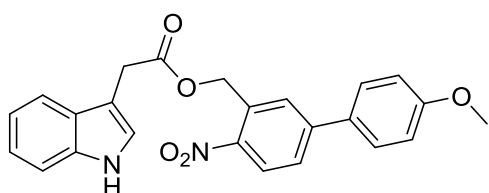
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5,69 (s, 2H); 7,64-7,67 (m, 1H); 7,83 (d, *J* = 8,5 Hz, 3H); 7,94 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 8,12 (s, 1H); 8,14 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 63,76; 124,91; 129,34; 129,56; 129,58; 129,70; 130,83; 130,92; 131,36; 131,88; 134,24; 136,71; 147,51; 163,52.

5.1.4 Příprava caged-fytohormonů s dvoufotonovou chránicí skupinou

Ačkoliv v současné neexistují publikace zabývající se připojením 2-nitrobenzylové dvoufotonové chránicí skupiny na molekulu jakéhokoliv rostlinného hormonu, jedná se o postup dobře prozkoumaný v buněčné biologii a neurovědách (Warther a kol., 2010). Jedním z dalších cílů této práce bylo vyvinout metodologii použitelnou pro syntézu dvoufotonových derivátů cytokininů a auxinů. Esterifikací IAA pomocí DCC a DMAP byl přímo získán požadovaný ochráněný produkt (**42**), zatímco pro přípravu caged-cytokininu byla zvolena dvoukroková syntéza. V první reakci byla provedena Mitsunobu alkylace na 6CIP vedoucí regioselektivně ke vzniku *N*9 derivátu (**43**), který byl následně podroben nukleofilní substituci benzylaminem v poloze C6 (**44**). Pro navazující výzkumy představuje zajímavou alternativu konverze 5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzylalkoholu na příslušný bromid, např. reakcí s PBr₃, a následná alkylace 6CIP v pozicích *N*7 a *N*3. Ověření toho postupu bude pravděpodobně součástí disertační práce.

[5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)acetát (**42**)

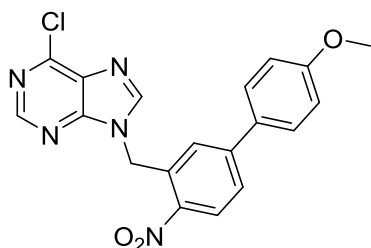


- žlutá pevná látka, výtěžek 75 %
- mobilní fáze DCM, R_f = 0,50 (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 30,01; 99
- ESI⁺-MS m/z: 417,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,84 (s, 3H); 3,89 (s, 2H); 5,53 (s, 2H); 6,91-6,95 (m, 1H); 7,03-7,09 (m, 3H); 7,32 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,38 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,45 (dt, *J* = 9,7; 2,6 Hz, 2H); 7,53 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,63 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 7,81 (dd, *J* = 8,6; 2,1 Hz, 1H); 8,14-8,18 (m, 1H); 11,03 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 30,79; 55,33; 62,66; 106,59; 111,51; 114,66; 118,44; 118,60; 121,15; 124,30; 125,57; 125,88; 126,02; 127,01; 128,28; 129,49; 132,74; 136,14; 145,04; 145,19; 160,12; 171,21.

6-chlor-9-[5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzyl]-9*H*-purin (**43**)

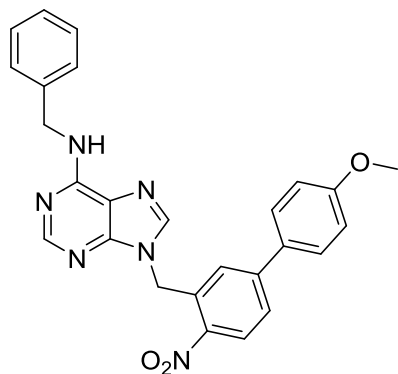


- žlutá pevná látka, výtěžek 78 %
- mobilní fáze PE/EtOAc/MeOH 1:1:0,1, R_f = 0,55 (vanilin)
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 27,37; 95
- ESI⁺-MS m/z: 396,3 [M+H]⁺

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,79 (s, 3H); 5,93 (s, 2H); 7,04 (dt, $J = 9,5; 2,6$ Hz, 2H); 7,56 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,60 (dt, $J = 9,5; 2,6$ Hz, 2H); 7,88 (dd, $J = 8,7; 2,0$ Hz, 1H); 8,22 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 8,76 (s, 1H); 8,77 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 44,93; 55,30; 114,68; 126,25; 126,84; 127,98; 128,54; 129,53; 130,82; 131,13; 145,36; 145,92; 147,77; 149,18; 151,79; 152,19; 160,21.

***N*-benzyl-9-[5-(4-methoxyfenyl)-2-nitrobenzyl]-9*H*-purin-6-amin (44)**



- žlutá pevná látka, výtěžek 93 %
- mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f = 0,71$
- HPLC retenční čas; čistota (min, %): 29,21; 98
- ESI⁺-MS m/z : 467,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

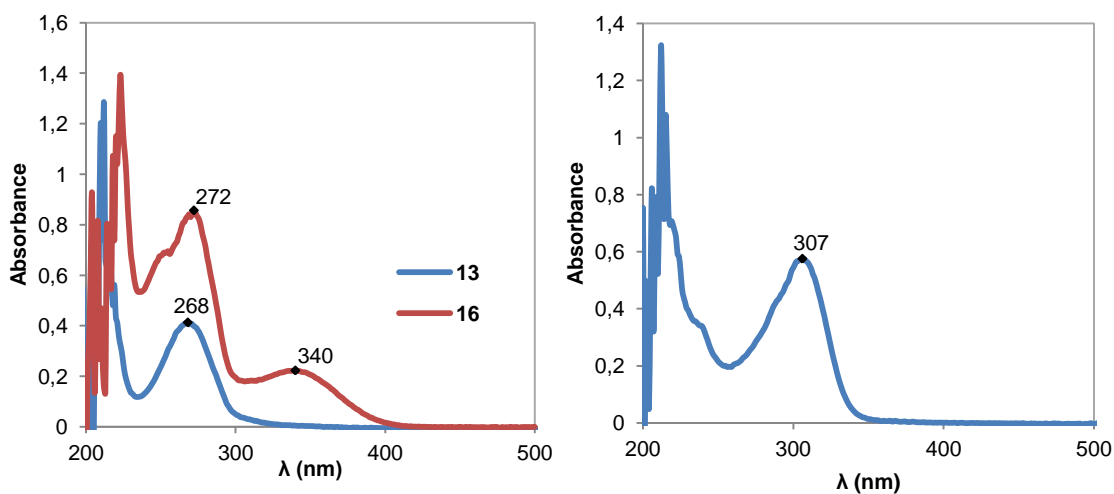
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3,79 (s, 3H); 4,70 (s, 2H); 5,79 (s, 2H); 7,03 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 7,20 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,33-7,34 (m, 3H); 7,51 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 7,84

(dd, $J = 8,6; 2,1$ Hz, 1H); 8,19 (s, 1H); 8,20 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,43 (s, 1H).

5.2 Studium fotolýzy připravených caged-fytohormonů

V rámci fyzikálně-chemické charakterizace připravených caged-fytohormonů byla změřena absorpční spektra 20-50 μM roztoků v MeOH (pod 2 % DMSO) v rozmezí 200-500 nm. V případě všech testovaných caged-molekul byla zaznamenána výrazná absorpce záření pod 240 nm způsobená aromatickým charakterem látek. U *N*9-substituovaných 2-nitrobenzylových derivátů byla pozorována výrazná absorpce záření v oblasti 267-269 nm (Graf 1, vlevo), přičemž *N*7 isomery vykazovaly posun absorpčních maxim o 2-6 nm k vyšším vlnovým délkám. Získané hodnoty byly v souladu s daty uváděnými pro tento typ fotolabilní chránící skupiny (Herrmann, 2012). Výjimku představuje látka **31**, u níž došlo k výraznému posunu absorpčního maxima k 307 nm, jelikož se jedná o anilinopurin substituovaný chlorem v pozici C2 (Graf 1, vpravo). Dalšího posunu absorpce k vyšším vlnovým délkám může být dosaženo přítomností skupin donujících elektrony, jako např. OCH_3 v případě DMNB, což následně umožňuje použití jiných světelných zdrojů poskytujících záření v oblasti 365 nm (Young a Deiters, 2007). V případě DMNB-fytohormonů byl zaznamenán vznik dvou absorpčních pásů – hlavní absorpční maximum v oblasti

269-278 nm a minoritní široký absorpční pás s maximem v rozmezí vlnových délek 337-340 nm (Graf 1, vlevo).

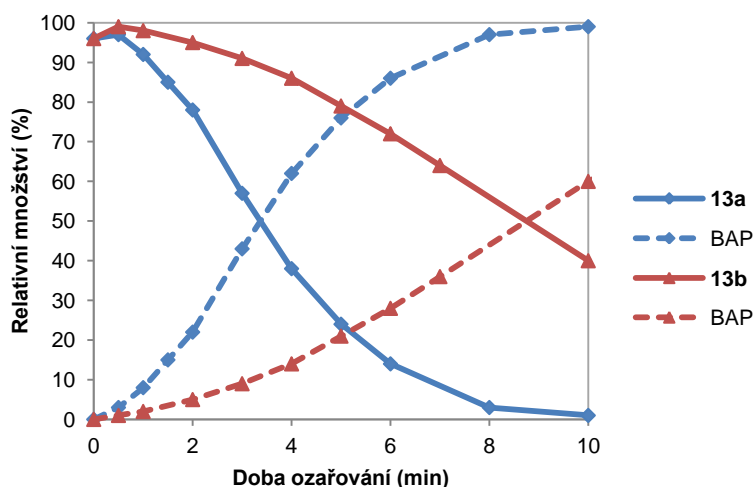


Graf 1. Vlevo/ Absorpční spektrum látek 13 a 16. Absorbance roztoků připravených látek v MeOH (50-20 μ M, pod 2 %DMSO) byla měřena v křemenných kyvetách v rozmezí vlnových délek 200-500 nm. V případě látky 13 bylo zaznamenáno absorpční maximum použité chránící skupiny při 268 nm, zatímco u látky 16 byly pozorovány dva absorpční pásy v oblasti 272 a 340 nm. **Vpravo/ Absorpční spektrum látky 31.** Absorbance roztoku v MeOH (20 μ M, pod 2 % DMSO) byla měřena v rozmezí 200-500 nm. Chránící skupina vykazovala nejvyšší absorpenci při 307 nm.

Stanovení absorpčních vlastností připravených látek umožnilo přesnější specifikaci požadavků pro hledání ideálního zdroje světla, který by umožňoval fotolýzu použitých chránících skupin. Jako jeden z potenciálně využitelných přístrojů byl testován UV crosslinker CL-1000 (254 nm). Roztok vzorku (1mM 13 v MeOH) byl ozařován ve vzdálenosti 5 cm od lampy po dobu 10 a 20 min, avšak konverze caged-látky na aktivní fytohormon bylo dosaženo pouze z 50 % (TLC analýza). Výhodnější zdroj UV záření představovala lampa Lightningcure Lc8 s vysokotlakou rtuťovou výbojkou charakterizovanou vysokými intenzitami světla v oblastech pod 400 nm. Vznik fotolytických produktů byl detekovatelný již v rámci několika sekund od zapnutí přístroje, a proto byla tato UV lampa použita pro veškeré následné experimenty s caged-molekulami.

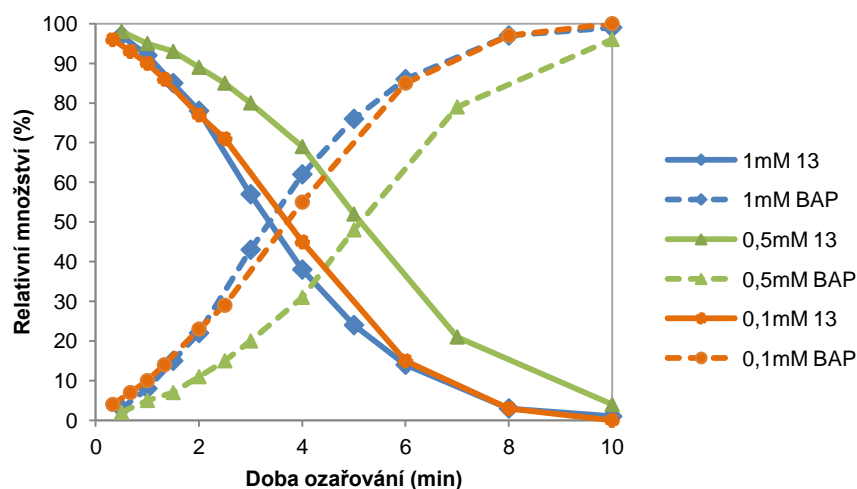
Průběh fotolýzy byl kvalitativně monitorován pomocí TLC analýzy ozařovaných vzorků (1mM roztok v MeOH, pod 2 % DMSO). Podle rychlosti vzniku volného fytohormonu byl následně zvolen časový interval pro maximální dobu ozařování vzorků (10 min) a odebírání alikvotů pro semi-kvantitativní stanovení úspěšnosti deprotektce pomocí HPLC-UV/VIS. Z naměřených hodnot byly sestaveny grafy vyjadřující závislost relativního množství uvolněné aktivní molekuly na době působení UV světla, jeho intenzitě a na koncentraci daného caged-fytohormonu. V případě látky 13 byla pozorována 50% konverze na volný cytokinin po již po třech minutách ozařování (100% intenzita světla) (Graf 2, 13a). Snížením intenzity světla na poloviční hodnotu

bylo dosaženo očekávaného zpomalení průběhu fotolýzy a k uvolnění aktivní molekuly z 50 % došlo až mezi 7 a 10 min od zahájení experimentu (Graf 2, 13b).



Graf 2. Závislost relativního množství uvolněného fytohormonu (BAP) na době ozařování vzorku a intenzitě použitého UV světla. Roztok **13** (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla, jehož intenzita byla nastavena na 100 % (modrá) a 50 % (červená). Frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plná čára značí úbytek testované caged-látky, přerušovaná čarou je znázorněn vznik aktivní formy fytohormonu.

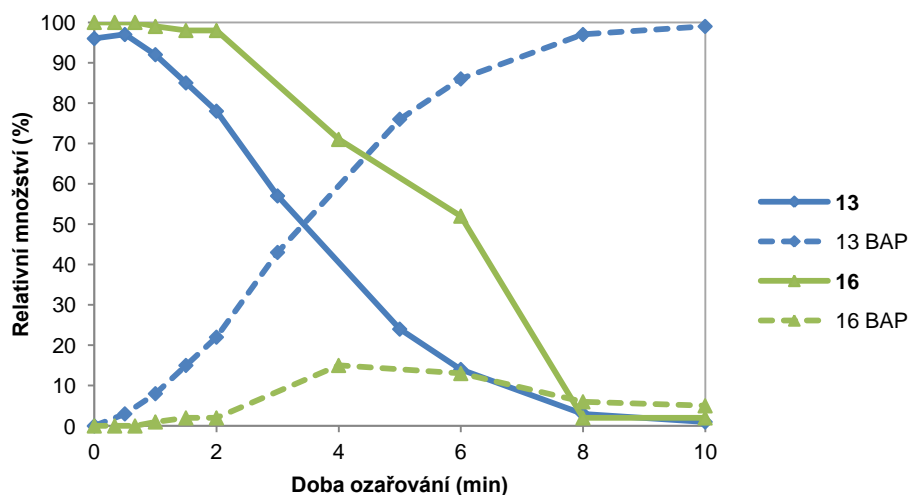
V dalším kroku studia deprotektce caged-fytohormonů byla sledována koncentrační závislost rychlosti fotolýzy. Roztoky látky **13** o různých koncentracích (1; 0,5; 0,1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byly ozařovány a analyzovány podle standardního postupu (viz Materiál a metody). Získaná data potvrdila vliv koncentrace studované látky na rychlost odštěpení fotolabilní chránící skupiny (Graf 3). Nejpomalejšího průběhu fotolýzy bylo překvapivě dosaženo ozařováním 0,5mM roztoku vzorku **13**, avšak pro ověření tohoto výsledku bude nezbytné daný experiment zopakovat.



Graf 3. Závislost rychlosti fotolýzy na koncentraci testované látky. Roztok **13** (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla, jehož intenzita byla nastavena na 100 % (13a) a 50 % (13b). Frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS.

Fotolýza všech připravených látek byla dále studována na 1mM roztocích v MeOH (pod 2% DMSO) při 100% intenzitě světla. V případě NB-derivátů cytokininů byl zaznamenán rychlý průběh deprotektce bez výraznějšího vzniku vedlejších produktů fotolýzy. U většiny caged-molekul (**13**, **18**, **22**, **31**) bylo dosaženo 50% konverze na aktivní molekulu již po 4. minutě ozařování, avšak v případě látky **27** byla tato rovnováha mezi caged a volným fytohormonem pozorována až při maximální délce vystavení vzorku UV světlu (viz Příloha B3). Fotolýza NB-auxinů poskytovala méně jednoznačné výsledky. V případě látky **38** byl během ozařování zaznamenán postupný nárůst koncentrace aktivního fytohormonu (Příloha B8), avšak u dalších testovaných caged-auxinů docházelo s postupem času k degradaci uvolněných molekul a vzniku velkého množství vedlejších produktů fotolýzy (Příloha B7, B9, B10). Toto pozorování je pravděpodobně výsledkem fotooxidačních procesů, kterým mohou některé auxiny podléhat (Fukuyama a Moyed, 1964; Galston, 1950; Chaudhary a kol., 2001), avšak vliv UV záření na molekuly s anti-auxinovou aktivitou nebyl studován.

V případě fotolýzy DMNB-derivátů byl pomocí TLC analýzy pozorován vznik aktivních fytohormonů pouze u látek **16**, **24** a **32**. V porovnání se skupinou NB caged-molekul byl zaznamenán pomalejší průběh fotolýzy a u látky **16** docházelo v průběhu ozařování k výraznému úbytku vzniklé aktivní formy (Graf 4). Tento negativní efekt může být způsoben nevhodností použité UV lampy jako nemonochromatického zdroje, který emitoval záření o příliš vysoké intenzitě i mimo oblasti absorpčních maxim chránících skupin.



Graf 4. Porovnání průběhu fotolýzy 2-nitrobenzylového (13) a 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylového (16) derivátu BAP. Roztoky látek (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byly za chlazení ozařovány ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS.

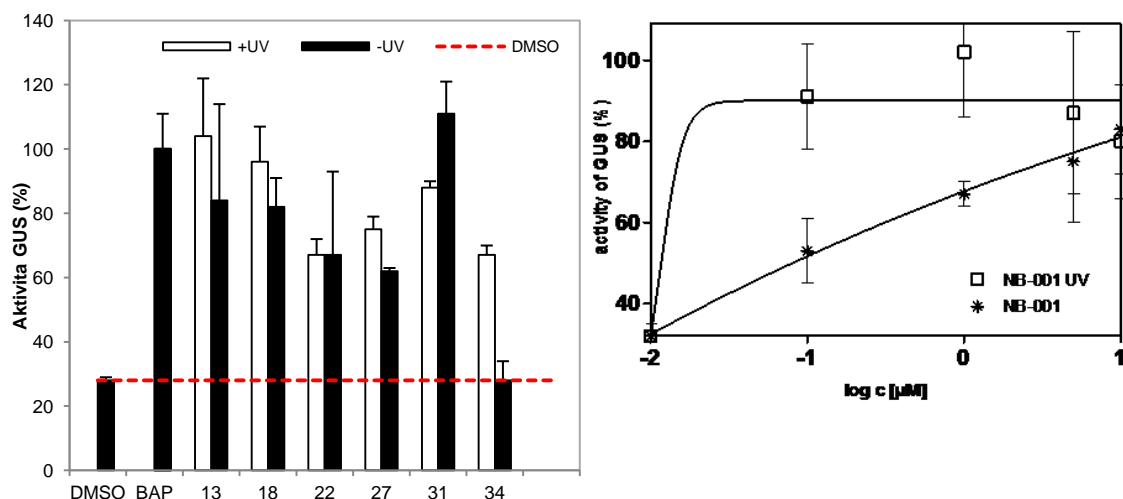
5.3 Biologická aktivita

5.3.1 *ARR5::GUS* biotest

Biologická aktivita připravených caged-cytokininů byla v návaznosti na práci Hayashi a kol., 2012 testována pomocí kvalitativního a kvantitativního *ARR5::GUS* biotestu. V rámci diplomové práce byly optimalizovány inkubační doby nezbytné pro aktivaci exprese a následnou histochemickou lokalizaci β -glukuronidasy. Dostatečné indukce exprese enzymu bylo dosaženo při inkubaci rostlin s testovanou látkou (**13**) po dobu 7 h s následným barvením pomocí chromogenního substrátu po dobu 1 h. Tento postup byl následně využit pro testování biologické aktivity látek **19** a **33** (Příloha C1). V případě negativní kontroly (médiu s DMSO) byla pozorována aktivita β -glukuronidasy v blízkosti kořenové čepičky v místě aktivního dělení buněk, kde dochází k biosyntéze cytokininů. U rostlin kultivovaných v médiu s obsahem neozářených caged-cytokininů, konkrétně látky **13**, byla s narůstajícím časem indukce GUS detekována znatelná aktivita β -glukuronidasy, zejména v diferenciální zóně kořene a v cévních svazcích. V případě ozářených roztoků došlo k uvolnění aktivní formy cytokininů a k dramatickému nárůstu exprese GUS, což se projevilo modrým zbarvením po celé délce kořene. U látek **19** a **33** byl zaznamenán očekávaný výsledek, tzn. aktivita β -glukuronidasy byla pozorována pouze u ozářených vzorků.

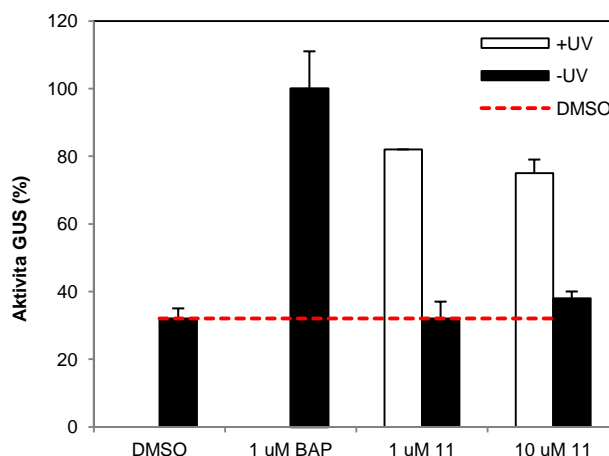
Biologická aktivita vybrané skupiny caged-cytokininů (**13**, **18**, **22**, **27**, **31** a **34**) byla dále stanovena prostřednictvím *ARR5::GUS* biotestu kvantitativně. Rostliny *A. thaliana* byly inkubovány v médiu s přídavkem ozářeného nebo neozářeného vzorku (finální koncentrace 10 μ M) po dobu 17 h a po přidání fluorogenního substrátu byla měřením fluorescence stanovena aktivita β -glukuronidasy. Výsledky biotestu prokázaly přítomnost aktivních cytokininů v médiích s obsahem roztoků látek vystavených UV světlu, avšak podobná míra aktivace GUS byla zaznamenána i u vzorků bez ozáření (Graf 5, vlevo). Ze získaných dat vyplývá, že při použitých koncentracích byly testované caged-cytokiny schopné interagovat s cytokininovými receptory a spouštět signální dráhu nezávisle na aplikaci UV záření. Tyto překvapivé výsledky nejsou zcela v souladu s daty publikovanými v práci Hayashi a kol., 2012, kde v případě neozářeného caged-BAP a caged-DHZ byla pozorována pouze nízká aktivita β -glukuronidasy srovnatelná s hodnotami dosaženými u negativní kontroly. Schopnost testovaných látek aktivovat cytokininovou signální kaskádu je pravděpodobně dána malými rozměry a způsobem napojení použité chránící skupiny, která se může přizpůsobit prostorovému uspořádání aktivního místa receptoru, aniž by došlo k narušení interakcí nezbytných pro příjem cytokininového signálu. Minimální rozdíl mezi aktivitou GUS v rostlinách inkubovaných v přítomnosti ozářeného a neozářeného

roztoku testovaných látek může být také způsoben příliš vysokými koncentracemi aplikovaných caged-cytokininů. Pro ověření této hypotézy byla testována závislost exprese *ARR5::GUS* na koncentraci testované látky (13). Výsledky biotestu potvrdily, že v nízkých koncentracích caged-cytokininů lze pozorovat pouze minimální indukci exprese β -glukuronidasy (Graf 5, vpravo).



Graf 5. Vlevo/ Stanovení aktivity β -glukuronidasy v transgenních rostlinách *A. thaliana*. Ze zásobních roztoků testovaných látek (finální koncentrace 20 μ M) byly odebrány alikvoty, které byly za chlazení ozařovány po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla. Semenačky *ARR5::GUS* byly inkubovány v tekutém MS médiu s přidavkem neozářeného (-UV) a ozářeného (+UV) vzorku po dobu 17 h při 24 °C. Po přidání fluorogenního substrátu byla měřením fluorescence stanovena aktivita GUS. **Vpravo/ Závislost aktivity β -glukuronidasy na koncentraci testované látky.** NB-001 UV – látka 13 vystavená UV světlu; NB-001 – látka 13 bez ozáření.

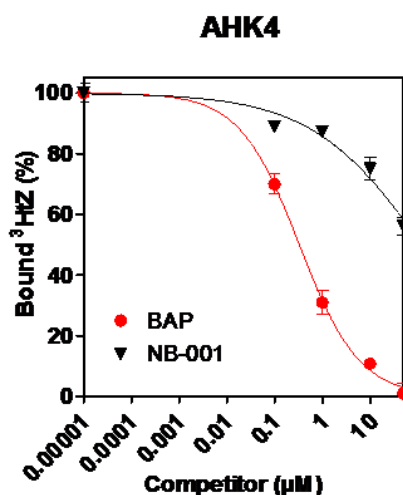
V návaznosti na tyto výsledky prokazující parciální biologickou aktivitu *N9*-substituovaných caged-cytokininů byl stejnému testování podroben i *N3* isomer (11). Získané výsledky potvrdily indukci exprese GUS pouze vlivem UV záření (Graf 6). U neozářeného vzorku o koncentraci 1 μ M byla aktivita β -glukuronidasy srovnatelná s negativní kontrolou (DMSO), zatímco po ozáření byl pozorován výrazný nárůst exprese GUS. V případě vyšší koncentrace testované látky bez aplikace UV došlo k nepatrnému zvýšení bazální aktivity daného enzymu, avšak rozdíl mezi ozářeným a neozářeným vzorkem byl markantní. Míra aktivity β -glukuronidasy u obou ozářených vzorků dosahovala v porovnání s pozitivní kontrolou (BAP) nižších hodnot, což lze vysvětlit nekvantitativním průběhem fotolýzy.



Graf 6. Stanovení aktivity β -glukuronidasy v transgenních rostlinách *A. thaliana*. Ze zásobního roztoku látky **11** (finální koncentrace 20 μ M) byly odebrány alikvoty, které byly za chlazení ozařovány po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla. Semenáčky *ARR5::GUS* byly inkubovány v tekutém MS médiu s přidavkem neozářeného (-UV) a ozařeného (+UV) vzorku (koncentrace 1 μ M, 10 μ M) po dobu 17 h při 24 °C. Po přidání fluorogenního substrátu byla měření fluorescence stanovena aktivita GUS.

5.3.2 Kompetiční receptorový test

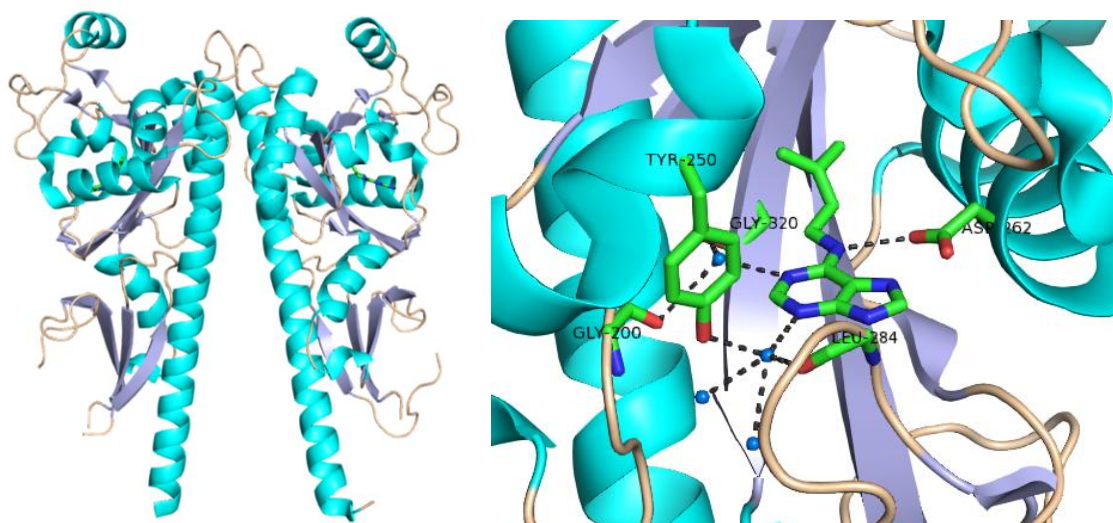
Jelikož látka **13** indukovala expresi reportérového genu β -glukuronidasy v *ARR5::GUS* testu i bez aktivace UV světlem, zajímala nás míra interakce neozářeného vzorku s cytokininovým receptorem AHK4. V kompetičním testu se ukázalo, že daná látka je od koncentrace 0,1 μ M schopna vytlačovat 2-[3 H]tZ z aktivního místa a v maximální testované 50 μ M koncentraci klesla zbytková radioaktivita na 56 % (Graf 7). Hodnota K_d byla stanovena na 123 μ M.



Graf 7. Výsledek kompetičního receptorového testu. NB-001 – látka **13** bez ozáření.

Výsledky testování biologické aktivity caged-cytokininů v receptorových testech ukázaly, že připojení NB chránící skupiny do polohy *N9* na purinovém skeletu nevedlo zcela ke ztrátě biologické aktivity, a ve vyšších koncentracích (10 μ M) byly schopny interagovat s receptorem a spouštět signální dráhu. V roce 2011 byly publikovány

krystalové struktury vazebné domény AHK4 v komplexu s různými cytokininy (Hothorn a kol., 2011). Cytokininy se vážou do nepolární vazebné kapsy receptoru postranním řetězcem a s proteinem vytváří jedinou přímou vodíkovou interakci s Asp262, prostřednictvím atomů dusíku v pozici N6 a N7. Zbylé vodíkové interakce jsou zprostředkovány přes molekuly vody (Obrázek 10). Vstup do vazebného místa v přítomnosti ligandu je blokován smyčkou receptoru a jediné spojení vnitřní kavity s vnějším okolím představují dva kanály vedoucí k C2 a N9 atomům cytokininu. Částečná aktivace receptoru N9-substituovanými caged-cytokininy může být způsobena tím, že ligand zapadne celý do vazebného místa nebo připojený NB-substituent směřuje ven do vodného prostředí.



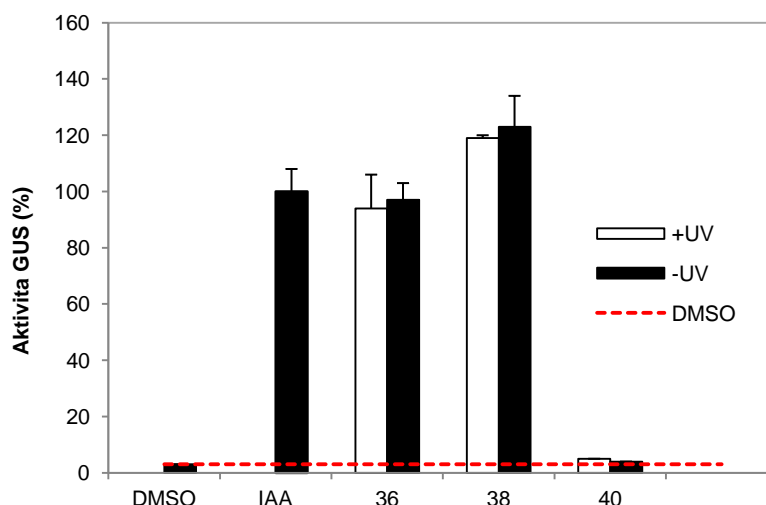
Obrázek 10. Krystalová struktura receptoru AHK4 v komplexu s iP. Vlevo/ Celkový pohled na vazebnou doménu. Vpravo/ Detail vazebného místa – molekuly vody (modré kuličky), vodíkové interakce (černá přerušovaná čára).

Z výsledků biologické aktivity N3-substituovaných caged-cytokininů vyplývá, že tyto deriváty představují zajímavější alternativu oproti N9 isomerům, jelikož jejich biologická aktivita je zcela blokována připojenou chránící skupinou i při vysokých koncentracích (10 μ M). Nejzajímavější variantou pro následné biologické aplikace jsou však dosud netestované N7 deriváty, u nichž se vlivem připojení substituentu předpokládá, že takto vzniklé ligandu budou nekompatibilní s vazebným místem receptoru.

5.3.3 DR5::*GUS* biotest

Připravené caged-auxiny byly testovány *in vivo* v DR5::*GUS* biotestu. Výsledky testu ukázaly, že indukce exprese β -glukuronidasy probíhala stejnou mírou jak bez, tak i po aplikaci UV záření (Graf 8). Získaná data korelují s dříve publikovanými poznatky o nestabilitě esterů auxinů s primárními alkoholy vůči enzymatické aktivitě esterasy v rostlinných buňkách, jejichž působením dochází k uvolnění aktivní látky i bez fotolýzy.

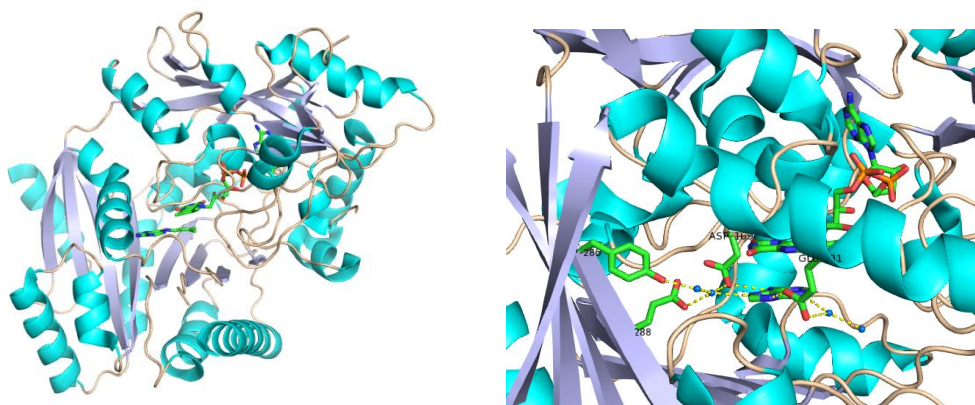
Možné řešení představuje příprava stéricky bráněných esterů auxinů se sekundárními alkoholy, které vykazují zvýšenou biologickou stabilitu (Kusaka a kol., 2009).



Graf 8. Stanovení aktivity β -glukuronidasy v transgenních rostlinách *A. thaliana*. Ze zásobních roztoků látek **36**, **38** a **40** (finální koncentrace 20 μ M) byly odebrány alikvoty, které byly za chlazení ozařovány po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla. Semenáčky *DR5::GUS* byly inkubovány v tekutém MS médiu s přidavkem neozářeného (-UV) a ozářeného (+UV) vzorku po dobu 17 h při 24 °C. Po přidání fluorogenního substrátu byla měření fluorescence stanovena aktivita GUS.

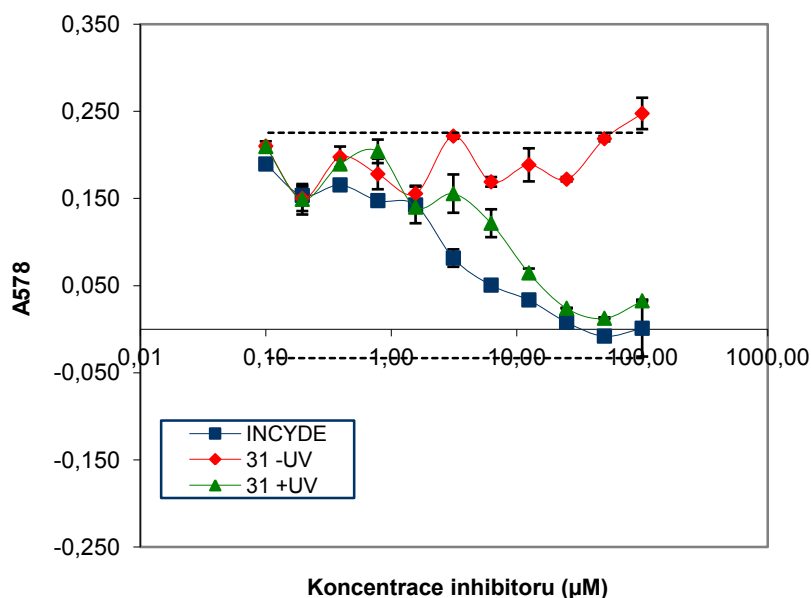
5.3.4 Interakce s CKX

Schopnost látky **31** inhibovat cytokinindehydrogenasu byla testována na rekombinantním enzymu AtCKX2. Fylogenetická analýza aminokyselinových sekvencí známých cytokinindehydrogenas prokázala vysokou podobnost této isoformy s AtCKX4 a ZmCKX1 z kukuřice (*Zea mays*). Z hlediska substrátové specifity tyto enzymy preferují v neutrálním až slabě alkalickém pH pouze volné báze cytokininů. Tato preference pro aktivní formy cytokininů je daná přítomností glutamátu (Glu348) u vstupu do aktivního místa, který uzavírá substrát ve vazebném místě enzymu a vytváří vodíkové vazby s dusíkem v pozici N9 a N3 (Galuszka a kol., 2007) (Obrázek 11).



Obrázek 11. Krystalová struktura ZmCKX1 v komplexu s iP. Vlevo/ Celkový pohled na strukturu. Vpravo/ Detail vazebného místa – molekuly vody (modré kuličky), vodíkové interakce (žlutá přerušovaná čára).

V rámci diplomové práce byla provedena modifikace inhibitoru cytokinindehydrogenasy označovaného jako INCYDE (Zatloukal a kol., 2008). V důsledku připojení fotolabilní chránící skupiny v poloze N9 byla znemožněna interakce této látky s enzymem. Po ozáření došlo k uvolnění aktivní formy inhibitoru, který byl schopný interagovat s CKX. V průběhu fotolýzy nedocházelo ke kvantitativní konverzi a získaná inhibiční křivka nebyla totožná s daty odpovídajícími INCYDE, avšak byl zaznamenán shodný trend.



Graf 9. Interakce látky 31 s cytokinindehydrogenasou z *A. thaliana*. Ze zásobního roztoku látky 31 (finální koncentrace 10μM) byla odebrána frakce, která byla za chlazení ozařována po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a následně testována míra inhibice AtCKX2.

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala syntézou derivátů fytohormonů s fotolabilními chránícími skupinami, jejich fotolýzou a biologickou aktivitou v *in vitro* a *in vivo* biotestech. V teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na struktury a biologické funkce dvou hlavních skupin fytohormonů - cytokininů a auxinů. V rámci této práce byl dále vytvořen souhrn nejčastěji používaných chránících skupin a dosud připravených caged-fytohormonů. V experimentální části bylo syntetizováno celkem 25 caged-cytokininů a 6 caged-auxinů, jejichž struktura byla v různých pozicích modifikována připojením 2-nitrobenzylové nebo 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylové fotolabilní chránící skupiny. Kromě fyzikálně-chemické charakterizace připravených látek byla testována jejich stabilita při ozáření UV světlem. Biologická aktivita vybraných caged-fytohormonů byla dále zkoumána v různých biotestech.

Z výsledků biologických testů vyplývá, že N9-substituované cytokininy s 2-nitrobenzylovou chránící skupinou nejsou příliš vhodné pro další biologické aplikace, jelikož interagují s AHK4 a spouští cytokininovou signální dráhu. Jako výhodnější varianta se jeví N3, případně N7 deriváty, jejichž aktivita je závislá na ozáření UV světlem. U většiny caged-cytokininů s 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylovou skupinou nebyla pozorována úspěšná deprotektace a bude nezbytné najít vhodnější zdroj světla nebo zoptimalizovat podmínky fotolýzy. V případě caged-auxinů testovaných v *DR5::GUS* biotestu nebyl zaznamenán rozdíl mezi ozářenými a neozářenými látkami, což bylo zapříčiněno pravděpodobně enzymatickou aktivitou rostlinných esterás.

7 Seznam použité literatury

Aesculab 1 – ARR5::GUS cytokininový test.

<http://www.aesculab.upol.cz/MobileModuleView.aspx?Id=634334875539003885W>
(staženo 10. 5. 2016)

Aesculab 2 – Vazebný test ligand-receptor s živými buňkami – vsádková metoda.

<http://www.aesculab.upol.cz/MobileModuleView.aspx?Id=634326849994459119P>
(staženo 10. 5. 2016)

Adams S.R. a Tsien R.Y. (1993) Controlling cell chemistry with caged compounds. In *Annu. Rev. Physiol.*, 55 (Hoffman J.F., ed.), 755-784,

Allan A.C., Fricker M.D., Ward J.L., Beale M.H. a Trewavas A.J. (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 6, 1319-1328.

Allan A.C., Ward J.L., Beale M.H. a Trewavas A.J. (1998) Caged plant growth regulators. In 291 (Marriott G., ed.), 474-483, Academic Press, London.

Anantharaman V. a Aravind L. (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem. Sci.* 26, 579-582.

Anderson B.E., Ward J.M. a Schroeder J.I. (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol.* 104, 1177-1183.

Atta S., Jana A., Ananthakirshnan R. a Dhuleep P.S.N. (2010) Fluorescent caged compounds of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): photorelease technology for controlled release of 2,4-D. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11844-11851.

Atta S., Ikbal M., Kumar A. a Singh N.D.P. (2012) Application of photoremovable protecting group for controlled release of plant growth regulators by sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 111, 39-49.

Aujard I., Benbrahim C., Gouget M., Ruel O., Baudin J.-B., Neveu P. a Jullien L. (2006) o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: Syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chemistry-a European Journal* 12, 6865-6879.

Balibrea Lara M.E., Gonzalez Garcia M.-C., Fatima T., Ehness R., Lee T.K., Proels R., Tanner W. a Roitsch T. (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant cell* 16, 1276-87.

Bandara H.M.D., Kennedy D.P., Akin E., Incarvito C.D. a Burdette S.C. (2009) Photoinduced release of Zn²⁺ with ZinCleave-1: a nitrobenzyl-based caged complex. *Inorg. Chem.* 48, 8445-8455.

Bao C., Jin M., Li B., Xu Y., Jin J. a Zhu L. (2012) Long conjugated 2-nitrobenzyl derivative caged anticancer prodrugs with visible light regulated release: preparation and functionalizations. *Organic & Biomolecular Chemistry* 10, 5238-5244.

Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G., Klämbt D., Maurel C., Palme K., Schell J. a Guern J. (1991) Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant J.* 1, 83-93.

Barendse G.W.M., Croes A.F., Bosveld M., Vanderkrieken W.M. a Wullems G.J. (1987) Uptake and metabolism of NAA and BAP in explants of tobacco in relation to *in-vitro* flower bud formation. *J. Plant Growth Regul.* 6, 193-200.

Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. a Friml J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.

Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B. a Feldmann K.A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950.

Blanc A. a Bochet C.G. (2002) Wavelength-controlled orthogonal photolysis of protecting groups. *J. Org. Chem.* **67**, 5567-5577.

Bochet C.G. (2002) Photolabile protecting groups and linkers. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 125-142.

Boinapally S., Huang B., Abe M., Katan C., Noguchi J., Watanabe S., Kasai H., Xue B. a Kobayashi T. (2014) Caged glutamates with π -extended 1,2-dihydronaphthalene chromophore: design, synthesis, two-photon absorption property, and photochemical reactivity. *J. Org. Chem.* **79**, 7822-7830.

Bort G., Gallavardin T., Ogden D. a Dalko P.I. (2013) From one-photon to two-photon probes: "caged" compounds, actuators, and photoswitches. *Angewandte Chemie-International Edition* **52**, 4526-4537.

Braun N., Wyrzykowska J., Muller P., David K., Couch D., Perrot-Rechenmann C. a Fleming A.J. (2008) Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* **20**, 2746-2762.

Buhr F., Kohl-Landgraf J., Dieck S.T., Hanus C., Chatterjee D., Hegelein A., Schuman E.M., Wachtveitl J. a Schwalbe H. (2015) Design of photocaged puromycin for nascent polypeptide release and spatiotemporal monitoring of translation. *Angewandte Chemie-International Edition* **54**, 3717-3721.

Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K. a Leaver C.J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**, 567-585.

Bürkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C. a Frommer W.B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 13-26.

Caesar K., Thamm A.M.K., Witthoef J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J. a 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.

Cedzich A., Stransky H., Schulz B. a Frommer W.B. (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol.* **148**, 1857-1867.

D'Agostino I.B., Deruere J. a Kieber J.J. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology (Rockville)* **124**, 1706-1717.

David K.M., Couch D., Braun N., Brown S., Grosclaude J. a Perrot-Rechenmann C. (2007) The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *Plant J.* **50**, 197-206.

Davies P.J. (2010) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, (Davies P.J., ed.), 1-15, Springer, New York, USA.

Dello Ioio R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P. a Sabatini S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* **17**, 678-682.

Dello Ioio R., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S., Taniguchi M., Morita M.T., Aoyama T., Costantino P. a Sabatini S. (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380-1384.

Dharmasiri N., Dharmasiri S. a Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.

Dunlap J.R., Kresovich S. a McGee R.E. (1986) The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiol.* **81**, 934-936.

Dyer T.A. a Osborne D.J. (1971) Leaf nucleic acids. 2. Metabolism during senescence and effect of kinetin. *J. Exp. Bot.* **22**, 552-&.

Ehness R. a Roitsch T. (1997) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant J.* **11**, 539-548.

El-Showk S., Ruonala R. a Helariutta Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**, 1373-1383.

Engvild K.C. (1980) Simple identification of the neutral chlorinated auxin in pea by thin-layer chromatography. *Physiol. Plant.* **48**, 435-437.

Epstein E. a Ludwig-Müller J. (1993) Indole-3-butyric acid in plants - occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiol. Plant.* **88**, 382-389.

Feng L., Lv K., Liu M., Wang S., Zhao J., You X., Li S., Cao J. a Guo H. (2012) Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of gemifloxacin derivatives containing a substituted benzyloxime moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* **55**, 125-136.

Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T., Schmülling T. a Peč P. (2002) Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: Optimized procedures and applications. *Anal. Biochem.* **306**, 1-7.

Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jürgens G. a Palme K. (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 661-673.

Fukuyama T.T. a Moyed H.S. (1964) Inhibition of cell growth by photooxidation products of indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* **239**, 2392-&.

Galston A.W. (1950) Riboflavin, light, and the growth of plants. *Science* **111**, 619-624.

Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Koellmer I., Schmuelling T. a Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255-267.

Gälweiler L., Guan C.H., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. a Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.

Gan S.S. a Amasino R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

Geisler M., Blakeslee J.J., Bouchard R., Lee O.R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bailly A., Richards E.L., Ejenda K.F.K., Smith A.P., Baroux C., Grossniklaus U., Müller A., Hrycyna C.A., Dudler R., Murphy A.S. a Martinoia E. (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* **44**, 179-194.

Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B. a Frommer W.B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291-300.

Gilroy S. a Jones R.L. (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* **104**, 1185-1192.

Givens R.S., Rubina M. a Wirz J. (2012) Applications of p-hydroxyphenacyl (pHP) and coumarin-4-ylmethyl photoremovable protecting groups. *Photochemical & Photobiological Sciences* **11**, 472-488.

Grossmann K. (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manage. Sci.* **66**, 113-120.

Gug S., Charon S., Specht A., Alarcon K., Ogden D., Zietz B., Léonard J., Haacke S., Bolze F., Nicoud J.-F. a Goeldner M. (2008) Photolabile glutamate protecting group with high one- and two-photon uncaging efficiencies. *ChemBioChem* **9**, 1303-1307.

Gupta S. a Rashotte A.M. (2014) Expression patterns and regulation of SICRF3 and SICRF5 in response to cytokinin and abiotic stresses in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Plant Physiol.* **171**, 349-358.

Hagen V., Dzeja C., Frings S., Bendig J., Krause E. a Kaupp U.B. (1996) Caged compounds of hydrolysis-resistant analogues of cAMP and cGMP: Synthesis and application to cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 7762-7771.

Hager A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.* **116**, 483-505.

Hay A., Kaur H., Phillips A., Hedden P., Hake S. a Tsiantis M. (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* **12**, 1557-1565.

Hayashi K.-i., Kusaka N., Ando K., Mitsui T., Aoyama T. a Nozaki H. (2012) Design and synthesis of photolabile caged cytokinin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5663-5667.

Hayashi K.-i., Kusaka N., Yamasaki S., Zhao Y. a Nozaki H. (2015) Development of 4-methoxy-7-nitroindolyl (MNI)-caged auxins which are extremely stable in planta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 4464-4471.

Heisler M.G., Ohno C., Das P., Sieber P., Reddy G.V., Long J.A. a Meyerowitz E.M. (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* **15**, 1899-1911.

Herrmann A. (2012) Using photolabile protecting groups for the controlled release of bioactive volatiles. *Photochemical & Photobiological Sciences* **11**, 446-459.

Heyn A.N.J. (1931) Der Mechanismus der Zellstreckung. *Rec. Trav. Bot. Neerl.* **28**, 113-244.

Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R. a Kakimoto T. (2004) *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8821-8826.

Hirose N., Makita N., Yamaya T. a Sakakibara H. (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* **138**, 196-206.

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

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

Hothorn M., Dabi T. a Chory J. (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 766-768.

Hwang I. a Sheen J. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.

Chaudhary A.J., Grimes S.M. a Mukhtar-ul-Hassan M. (2001) Simultaneous recovery of copper and degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous systems by a combination of electrolytic and photolytic processes. *Chemosphere* **44**, 1223-1230.

Imamura A., Hanaki N., Umeda H., Nakamura A., Suzuki T., Ueguchi C. a Mizuno T. (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2691-2696.

Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. a Kakimoto T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.

Ishida K., Yamashino T. a 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.

Kai K., Horita J., Wakasa K. a Miyagawa H. (2007) Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**, 1651-1663.

Kakimoto T. (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.

Kantevari S., Hoang C.J., Ogrodnik J., Egger M., Niggli E. a Ellis-Davies G.C.R. (2006) Synthesis and two-photon photolysis of 6-(ortho-nitroveratryl)-caged IP3 in living cells. *ChemBioChem* **7**, 174-180.

Kao J.P.Y. (2006) Caged molecules: Principles and practical considerations. In *Current protocols in neuroscience*, (Crawley J.N., ed.), 6.20.1-6.20.21, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

Kaplan J.H., Forbush B. a Hoffman J.F. (1978) Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog - utilization by Na-K pump of human red blood-cell ghosts. *Biochemistry (Mosc.)* **17**, 1929-1935.

Kepinski S. a Leyser O. (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.

Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G. a 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.

Klemš M., Truksa M., Macháčková I., Eder J. a Procházka S. (1998) Uptake, transport and metabolism of ¹⁴C-2,4-dichlorophenoxyacetic acid (¹⁴C-2,4-D) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. *Plant Growth Regulation* **26**, 195-202.

Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K.Y., Kwon M., Endler A., Song W.-Y., Martinoia E., Sakakibara H. a Lee Y. (2014) *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7150-7155.

Kögl F., Erxleben H. a Haagen-Smit A.J. (1934) Über die Isolierung der Auxine a und b aus pflanzlichen Materialien. IX. Mitteilung. *Z. Physiol. Chem.* **243**, 209-226.

Kowalczyk M. a Sandberg G. (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 1845-1853.

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

Kusaka N., Maisch J., Nick P., Hayashi K.-i. a Nozaki H. (2009) Manipulation of intracellular auxin in a single cell by light with esterase-resistant caged auxins. *ChemBioChem* **10**, 2195-2202.

Leibfried A., To J.P.C., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J.J. a Lohmann J.U. (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.

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

Letham D.S., Palni L.M.S., Tao G.-Q., Gollnow B.I. a 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.

Lin D., Nagawa S., Chen J., Cao L., Chen X., Xu T., Li H., Dhonukshe P., Yamamuro C., Friml J., Scheres B., Fu Y. a Yang Z. (2012) A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in *Arabidopsis* roots. *Curr. Biol.* **22**, 1319-1325.

Löbner M. a Klämbt D. (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.).1. Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 9848-9853.

Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A. a Sakakibara H. (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J. Exp. Bot.* **62**, 5149-5159.

Ludwig-Müller J. a Epstein E. (1991) Occurrence and *in-vivo* biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* **97**, 765-770.

Ludwig-Müller J. a Hilgenberg W. (1995) Characterization and partial-purification of indole-3-butyric acid synthetase from maize (*Zea mays*). *Physiol. Plant.* **94**, 651-660.

Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P. a Fink G.R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **12**, 2175-2187.

Mähönen A.P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K.M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T. a Helariutta Y. (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98.

Makings L.R. a Tsien R.Y. (1994) Caged nitric oxide - stable organic molecules from which nitric oxide can be photoreleased. *J. Biol. Chem.* **269**, 6282-6285.

Matsuzaki M., Hayama T., Kasai H. a Ellis-Davies G.C.R. (2010) Two-photon uncaging of gamma-aminobutyric acid in intact brain tissue. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 255-257.

Mattsson J., Ckurshumova W. a Berleth T. (2003) Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.* **131**, 1327-1339.

McGaw B.A. a Horgan R. (1983) Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown-gall tissue. *Planta* **159**, 30-37.

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

Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Vonsaltza M.H. a Strong F.M. (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375-1380.

Mira-Rodado V., Sweere U., Grefen C., Kunkel T., Fejes E., Nagy F., Schaefer E. a Harter K. (2007) Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **58**, 2595-2607.

Miyata S., Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K. a Shinozaki K. (1998) Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **437**, 11-14.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G. a 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 M.C., Mok D.W.S., Armstrong D.J., Shudo K., Isogai Y. a Okamoto T. (1982) Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N*-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511.

Mok M.C. (1994) Cytokinins and plant development—an overview. In *Cytokinins—Chemistry, activity, and function*, (Mok D.W.S. a Mok M.C., ed.), 155–166, CRC Press, Boca Raton, USA.

Morgenstern D.A. (2013) New ester of carboxylic acid agrochemical comprising a labile protecting group useful for controlling unwanted plants and weed in crops e.g. corn, peanuts, potatoes, soybeans, canola, alfalfa, sugarcane, sugarbeets, field beans and rice. WO2013055944-A2; WO2013055944-A3; US2014256549-A1.

Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S. a Ueguchi C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365-1377.

Nisler J., Zatloukal M., Popa I., Doležal K., Strnad M. a Spichal L. (2010) Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry* **71**, 823-830.

Normanly J., Slovin J.P. a Cohen J.D. (2010) Auxin biosynthesis and metabolism. In *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, (Davies P.J., ed.), 36-62, Springer, New York, USA.

Okamoto T., Isogai Y. a Koizumi T. (1967) Studies on plant growth regulators 2. Isolation of indole-3-acetic acid, phenylacetic acid and several plant growth inhibitors from etiolated seedlings of *Phaseolus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **15**, 159-+.

Östin A., Kowalczyk M., Bhalerao R.P. a Sandberg G. (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**, 285-296.

Peters M., Trobe M., Tan H., Kleineweischede R. a Breinbauer R. (2013) A modular synthesis of teraryl-based -helix mimetics, Part1 : synthesis of core fragments with two electronically differentiated leaving groups. *Chemistry-a European Journal* **19**, 2442-2449.

Raines T., Shanks C., Cheng C.-Y., McPherson D., Argueso C.T., Kim H.J., Franco-Zorrilla J.M., López-Vidriero I., Solano R., Vaňková R., Schaller G.E. a Kieber J.J.

(2016) The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **85**, 134-147.

Rashotte A.M., Mason M.G., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E. a Kieber J.J. (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11081-11085.

Riefler M., Novák O., Strnad M. a Schmülling T. (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40-54.

Richmond A.E. a Lang A. (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**, 650-651.

Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baster P., Vanneste S., Zhang J., Simon S., Čovanová M., Hayashi K., Dhonukshe P., Yang Z., Bednarek S.Y., Jones A.M., Luschnig C., Aniento F., Zažímalová E. a Friml J. (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 111-121.

Ros Barceló A., Pedreno M.A., Ferrer M.A., Sabater F. a Munoz R. (1990) Indole-3-methanol is the main product of the oxidation of indole-3-acetic acid catalyzed by two cytosolic basic isoperoxidases from *Lupinus*. *Planta* **181**, 448-50.

Sakai H., Aoyama T., Bono H. a Oka A. (1998) Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1232-1239.

Sakakibara H. (2004) Cytokinin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, (Davies P.J., ed.), 95-114, Springer, Netherlands.

Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. In *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57 ed.), 431-449,

Sakamoto T., Kamiya N., Ueguchi-Tanaka M., Iwahori S. a Matsuoka M. (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* **15**, 581-590.

Salkowski E. (1885) Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. *Z. Physiol. Chem.* **1885**, 23-33.

Sauer M., Robert S. a Kleine-Vehn J. (2013) Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* **64**, 2565-2577.

Shi X., Gupta S. a Rashotte A.M. (2012) *Solanum lycopersicum* cytokinin response factor (SICRF) genes: characterization of CRF domain-containing ERF genes in tomato. *J. Exp. Bot.* **63**, 973-982.

Schelkle K.M., Griesbaum T., Ollech D., Becht S., Buckup T., Hamburger M. a Wombacher R. (2015) Light-induced protein dimerization by one- and two-photon activation of gibberellic acid derivatives in living cells. *Angewandte Chemie-International Edition* **54**, 2825-2829.

Schnabel E.L. a Frugoli J.F. (2004) The *PIN* and *LAX* families of auxin transport genes in *Medicago truncatula*. *Mol. Genet. Genomics* **272**, 420-432.

Smulders M.J.M., Vandeven E., Croes A.F. a Wullems G.J. (1990) Metabolism of 1-naphthaleneacetic acid in explants of tobacco - evidence for release of free hormone from conjugates. *J. Plant Growth Regul.* **9**, 27-34.

Soni R., Carmichael J.P., Shah Z.H. a Murray J.A.H. (1995) A family of cyclin D-homologs from plants differentially controlled by growth-regulators and containing the conserved retinoblastoma protein-interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.

Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M. a 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.

Stals H. a Inzé D. (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* **6**, 359-364.

Staswick P.E. (2009) The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol.* **150**, 1310-1321.

- Steffens B., Feckler C., Palme K., Christian M., Böttger M. a Lüthen H. (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J.* **27**, 591-599.
- Strnad M., Peters W., Beck E. a Kamínek M. (1992) Immunodetection and identification of *N*(6)-(o-hydroxybenzylamino)purine as a naturally-occurring cytokinin in *Populus X canadensis* Moench cv *robusta* leaves. *Plant Physiol.* **99**, 74-80.
- Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**, 674-688.
- Suzuki T., Imamura A., Ueguchi C. a Mizuno T. (1998) Histidine-containing phosphotransfer (HPt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1258-1268.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H. a Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.
- Swartzberg D., Hanael R. a Granot D. (2011) Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biol.* **13**, 439-444.
- Takahashi S., Shudo K., Okamoto T., Yamada K. a Isogai Y. (1978) Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N*-(4-pyridyl)urea derivatives. *Phytochemistry* **17**, 1201-1207.
- Tam Y.Y., Epstein E. a Normanly J. (2000) Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-9-acetyl-aspartate indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol.* **123**, 589-595.
- Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B. a Friml J. (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2738-2754.
- Tang X. a Dmochowski I.J. (2006) Synthesis of light-activated antisense oligodeoxynucleotide. *Nat. Protoc.* **1**, 3041-3048.
- Tao Y., Ferrer J.-L., Ljung K., Pojer F., Hong F., Long J.A., Li L., Moreno J.E., Bowman M.E., Ivans L.J., Cheng Y., Lim J., Zhao Y., Ballare C.L., Sandberg G., Noel J.P. a Chory J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164-176.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksova K., Schmölling T., Sandberg G. a Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol. Plant.* **117**, 579-590.
- Thimann K.V. (1938) Hormones and the analysis of growth. *Plant Physiol.* **13**, 437-49.
- Tian Q., Uhlir N.J. a Reed J.W. (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **14**, 301-319.
- To J.P.C., Deruere J., Maxwell B.B., Morris V.F., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E. a Kieber J.J. (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901-3914.
- Urao T., Yakubov B., Yamaguchi-Shinozaki K. a Shinozaki K. (1998) Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **427**, 175-178.
- Van Staden J., Cook E. a Noodén L.D. (1988) Cytokinins and senescence. In *Senescence and Aging in Plants* (Nooden L.D. a Leopold A.C., ed.), 281-328, Academic Press, San Diego, USA.
- Vanneste S. a Friml J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**, 1005-1016.
- Walker J.W., Feeney J. a Trentham D.R. (1989) Photolabile precursors of inositol phosphates - preparation and properties of 1-(2-nitrophenyl)ethyl esters of *myo* inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochemistry (Mosc.)* **28**, 3272-3280.
- Ward J.L. a Beale M.H. (1995) Caged plant hormones. *Phytochemistry* **38**, 811-816.

Warther D., Gug S., Specht A., Bolze F., Nicoud J.F., Mourot A. a Goeldner M. (2010) Two-photon uncaging: New prospects in neuroscience and cellular biology. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 7753-7758.

Werner T., Motyka V., Strnad M. a Schmülling T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10487-10492.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H. a Schmülling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.

Werner T. a Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.

Williams D.B.G. a Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *The Journal of organic chemistry* **75**, 8351-4.

Wright C.W., Guo Z.-F. a Liang F.-S. (2015) Light control of cellular processes by using photocaged abscisic acid. *ChemBioChem* **16**, 254-261.

Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A. a Schmuelling T. (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **156**, 1808-1818.

Xu T., Wen M., Nagawa S., Fu Y., Chen J.-G., Wu M.-J., Perrot-Rechenmann C., Friml J., Jones A.M. a Yang Z. (2010) Cell surface- and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 99-110.

Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T. a Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017-23.

Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A. a Ori N. (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr. Biol.* **15**, 1566-1571.

Yang X., Tang S., Lu T., Chen C., Zhou L., Su Y. a Xu J. (2013) Sulfonic acid resin-catalyzed oxidation of aldehydes to carboxylic acids by hydrogen peroxide. *Synth. Commun.* **43**, 979-985.

Yang Y., Yang Y., Xie X., Cai X., Wang Z., Gong W., Zhang H., Li Y. a Mei X. (2015) A near-infrared two-photon-sensitive peptide-mediated liposomal delivery system. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **128**, 427-438.

Young D.D. a Deiters A. (2007) Photochemical control of biological processes. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**, 999-1005.

Zabada M. a Klán P. (2001) Fotolabilní chránící skupiny. *Chem. Listy* **95**, 694-699.

Zacarias L. a Reid M.S. (1990) Role of growth-regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* **80**, 549-554.

Zatloukal M., Gemrotová M., Doležal K., Havlíček L., Spíchal L. a Strnad M. (2008) Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 9268-9275.

Zhang K., Letham D.S. a John P.C.L. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34(cdc2)-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.

Zhang K., Novák O., Wei Z., Gou M., Zhang X., Yu Y., Yang H., Cai Y., Strnad M. a Liu C.-J. (2014) *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications* **5**,

Zolman B.R., Martinez N., Millius A., Adham A.R. a Bartel B. (2008) Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics* **180**, 237-251.

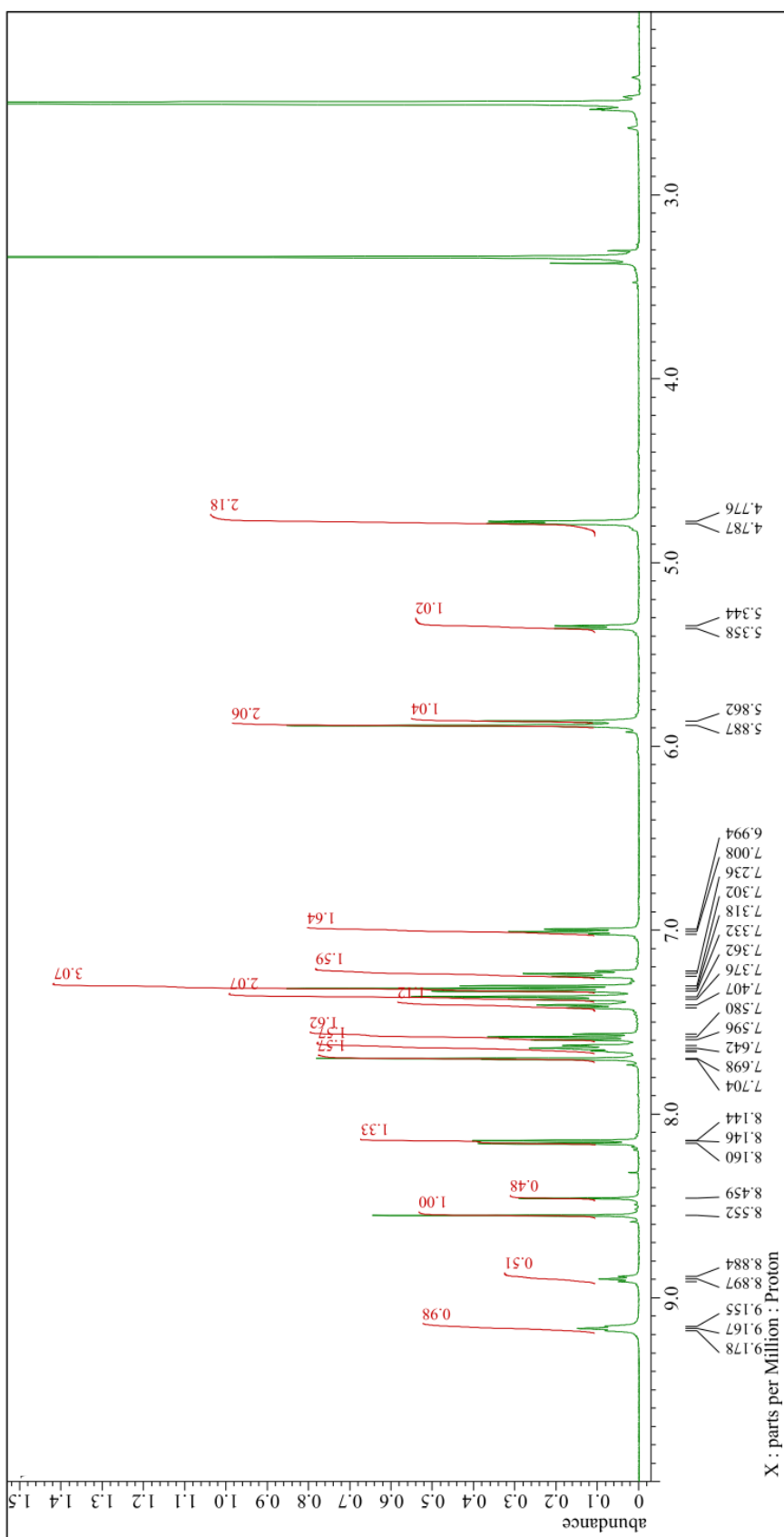
Zwack P.J., Robinson B.R., Risley M.G. a Rashotte A.M. (2013) Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses. *Plant Cell Physiol.* **54**, 971-981.

Zwack P.J., Compton M.A., Adams C.I. a Rashotte A.M. (2015) Cytokinin response factor 4 (CRF4) is induced by cold and involved in freezing tolerance. *Plant Cell Rep.* **35**, 573-584.

Přílohy A

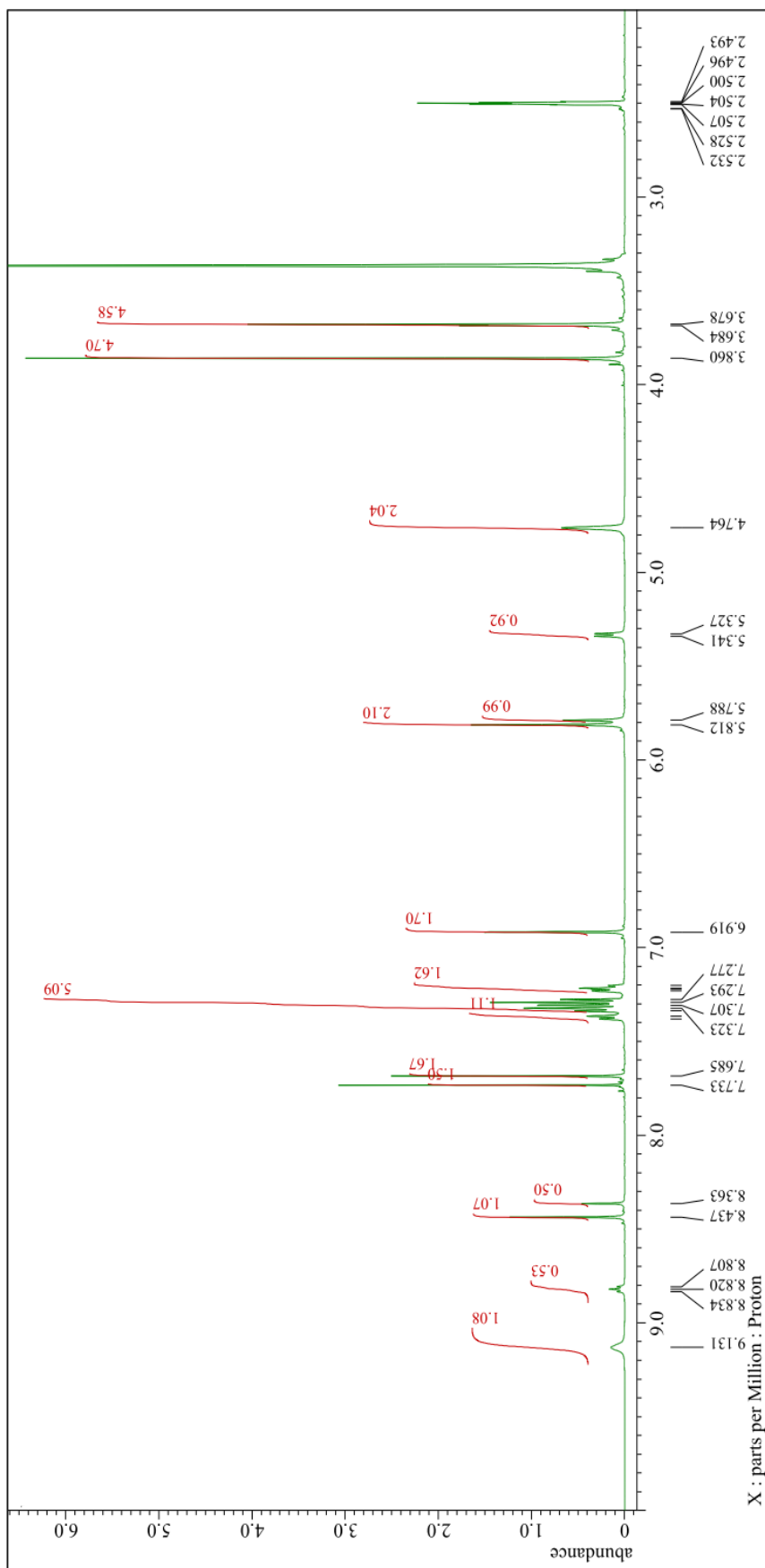
¹H NMR spektra *N*3-substituovaných caged-cytokininů

Příloha A1



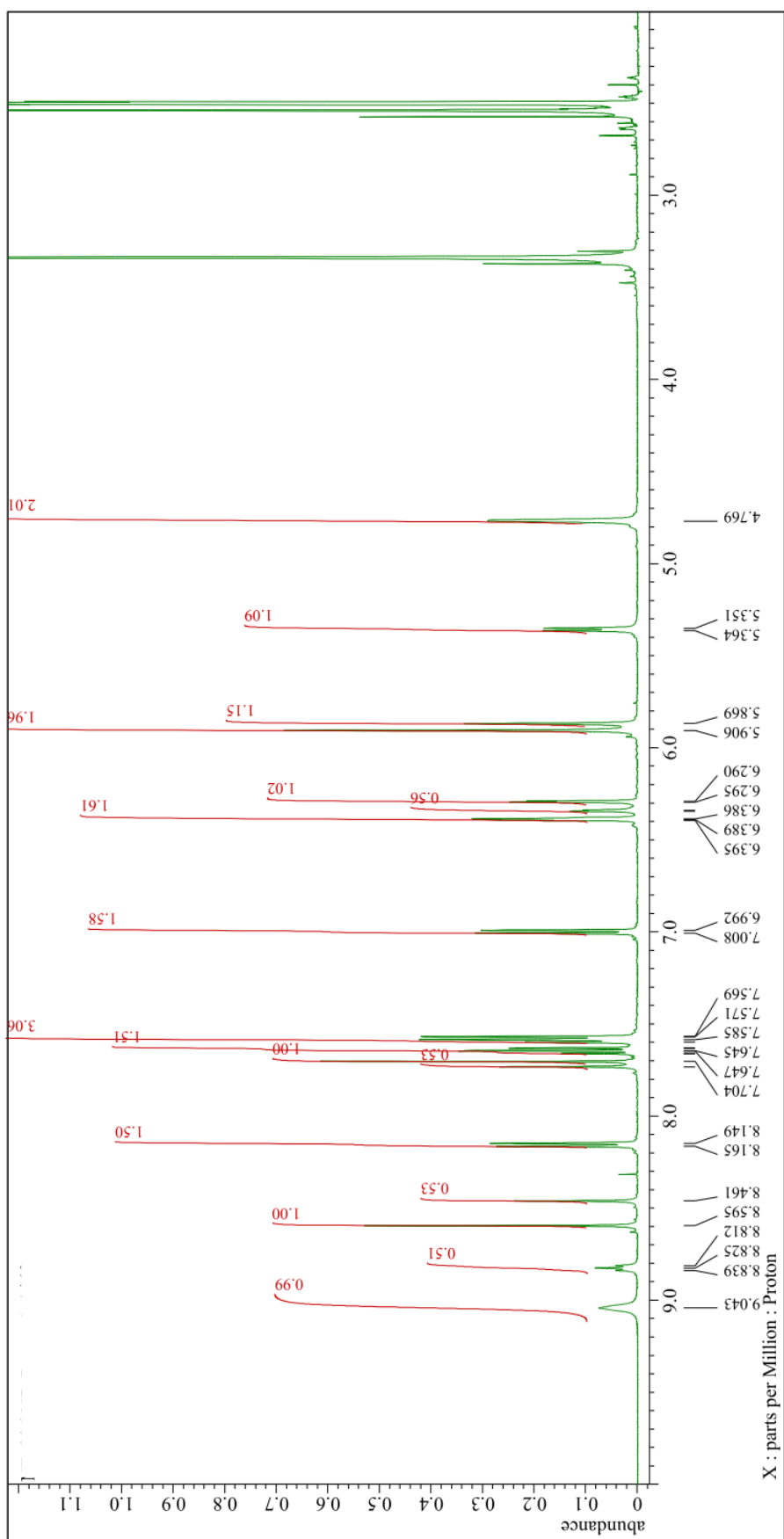
¹H NMR spektrum látky **11** měřené v DMSO-d₆. Ve spektru se vyskytují dvě tautomerní formy téže látky v poměru 2:1. Dublety s chemickým posunem 4,78 a 5,86 odpovídají CH₂ skupině a tripletu s chemickým posunem 8,89 a 9,16 NH skupině postranního řetězce připojeného v pozici C6 na purinový skelet (benzylamino-).

Příloha A2



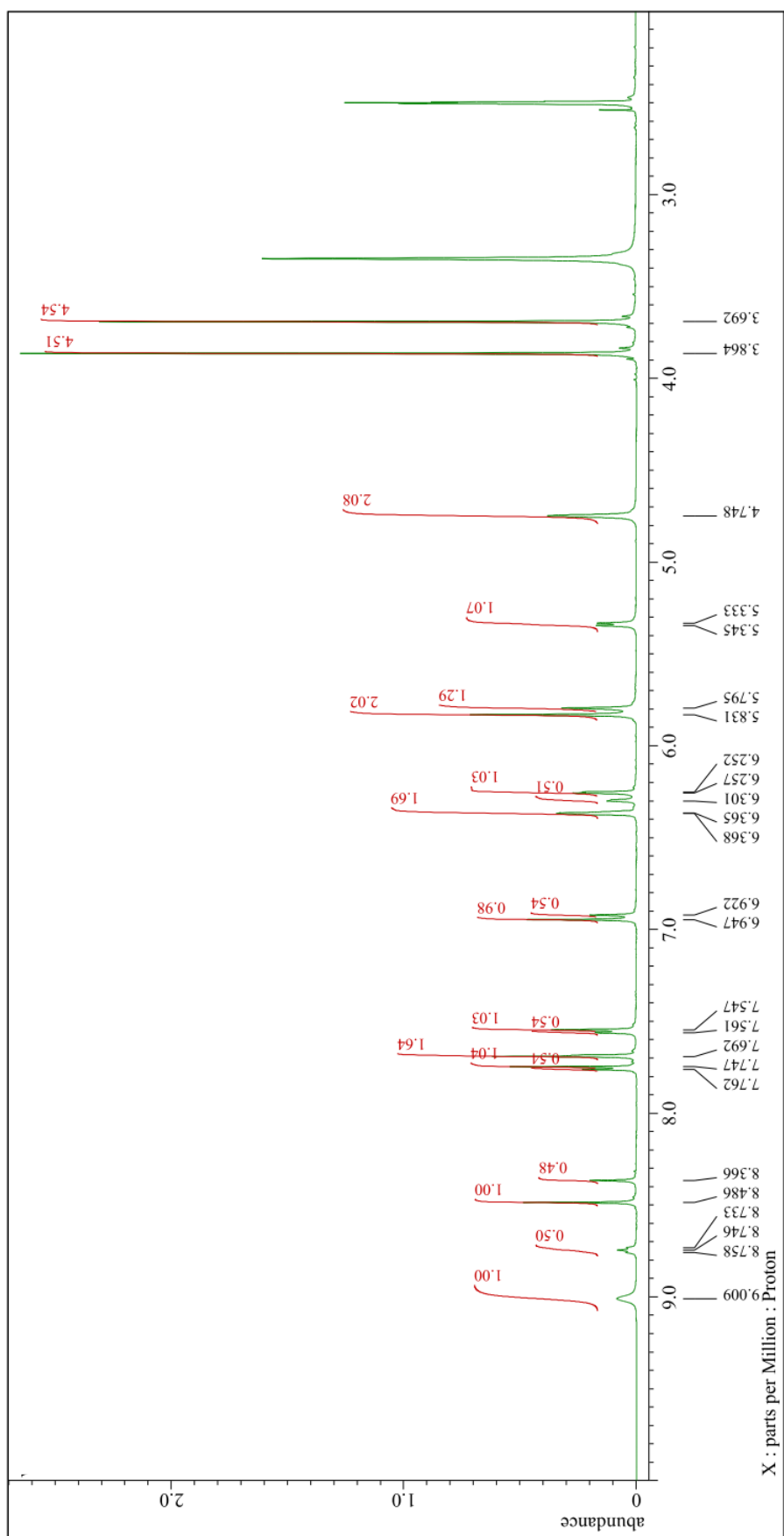
¹H NMR spektrum látky **14** měřené v DMSO-d₆. Ve spektru se vyskytují dvě tautomerní formy téže látky v poměru 2:1. Dublety s chemickým posunem 5,33 a 5,80 odpovídají CH₂ skupině a triplety s chemickým posunem 8,82 a 9,13 NH skupině postranního řetězce připojeného v pozici C6 na purinový skelet (benzylamino-).

Příloha A3



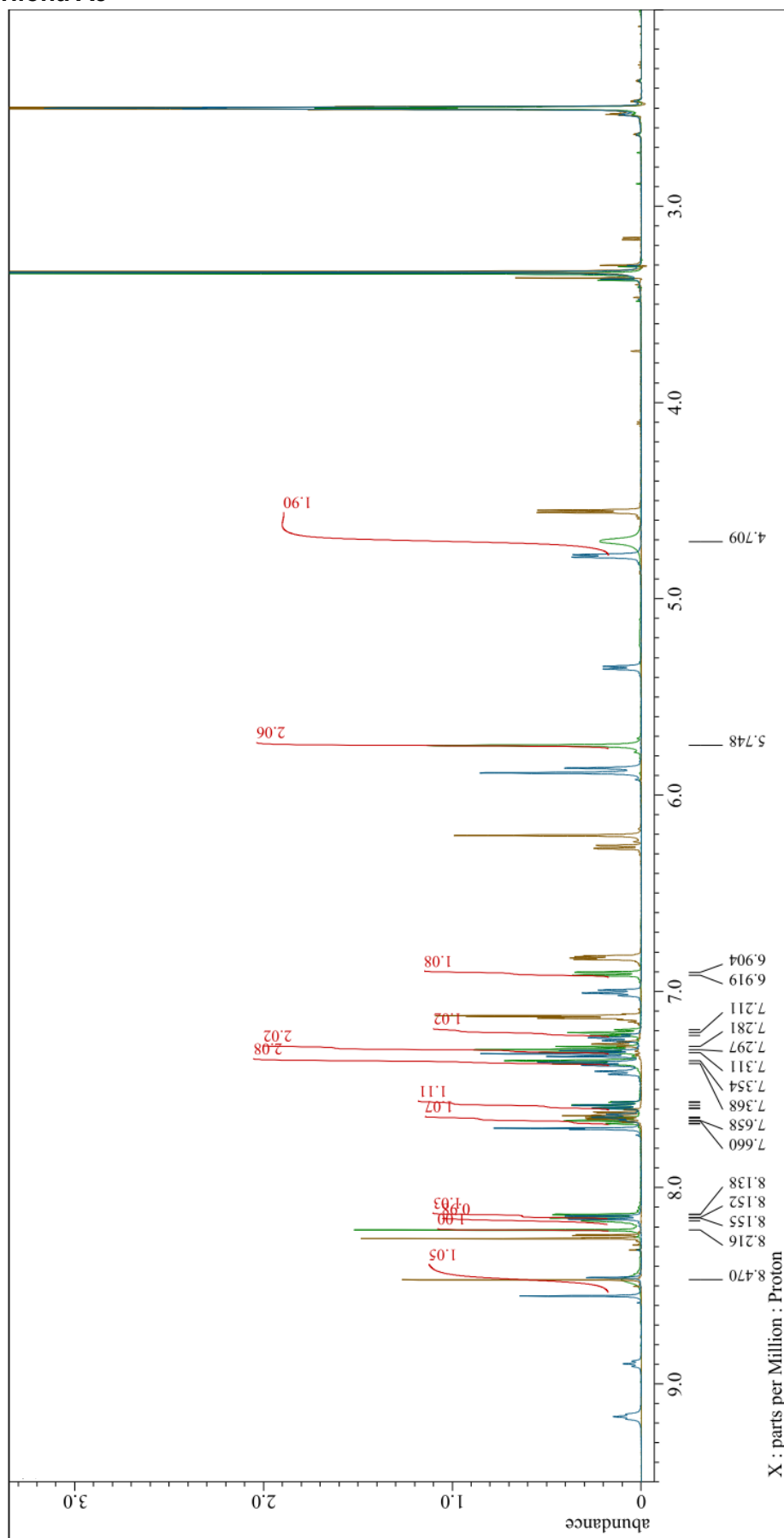
^1H NMR spektrum látky **25** měřené v DMSO-d_6 . Ve spektru se vyskytují dvě tautomerní formy téže látky v poměru 2:1. Dublety s chemickým posunem 4,76 a 5,35 odpovídají CH_2 skupině a triplety s chemickým posunem 8,82 a 9,04 NH skupině postranního řetězce připojeného v pozici C6 na purinový skelet (furfurylamino-).

Příloha A4



^1H NMR spektrum látky **28** měřené v $\text{DMSO-}d_6$. Ve spektru se vyskytují dvě tautomerní formy téže látky v poměru 2:1. Dublety s chemickým posunem 4,74 a 5,34 odpovídají CH_2 skupině a triplety s chemickým posunem 8,74 a 9,00 NH skupině postranního řetězce připojeného v pozici C6 na purinový skelet (furfurylamino-).

Příloha A5

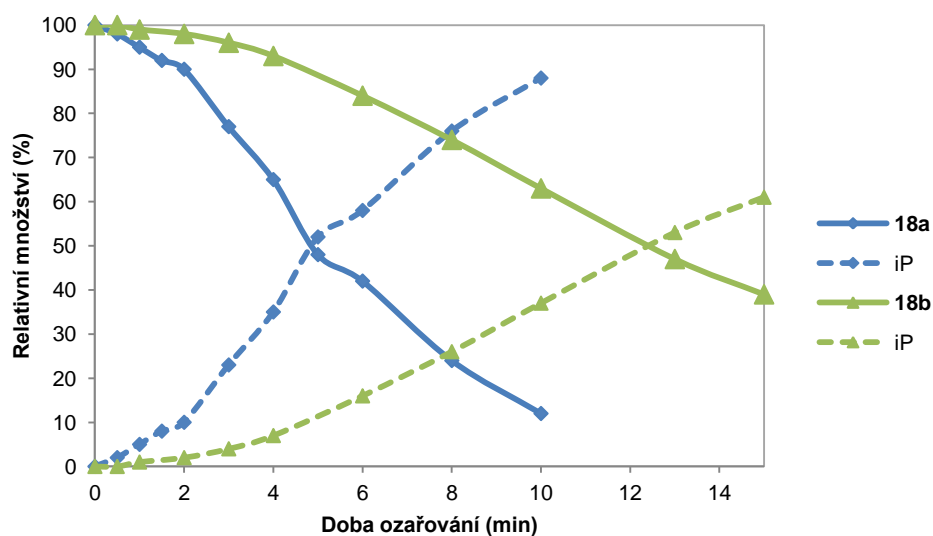


Porovnání ^1H NMR spekter látek **11** (zelená), **12** (hnědá) a **13** (modrá) měřená v DMSO- d_6 .

Přílohy B

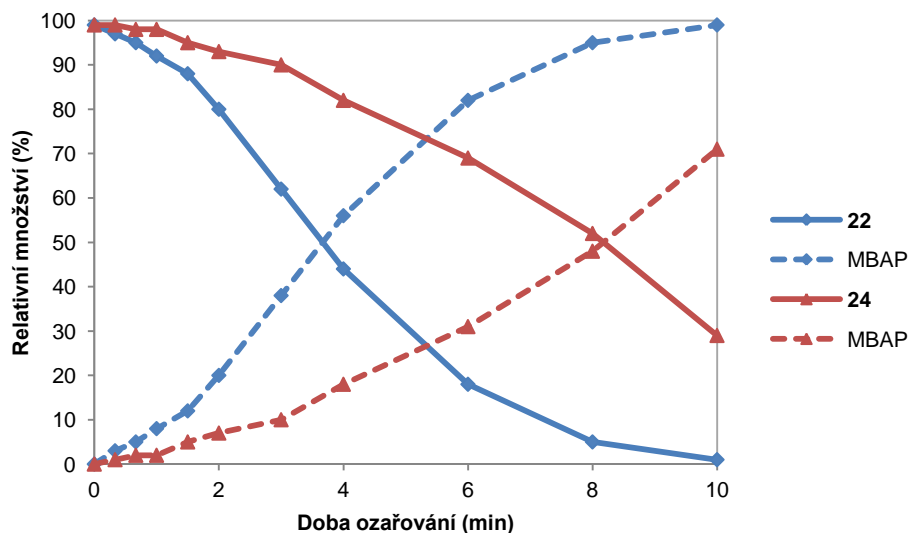
Fotostabilitní studie vybraných caged-fytohormonů

Příloha B1



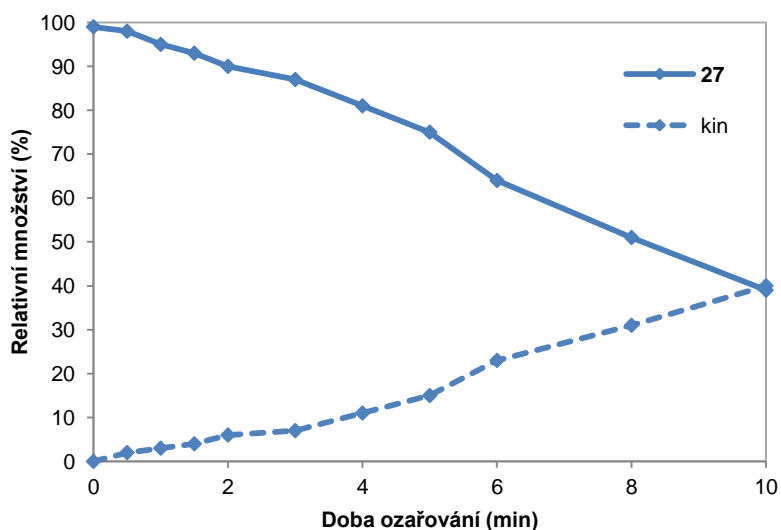
Porovnání průběhu fotolýzy látky **18** při 100% (modrá) a 50% intenzitě UV záření (zelená). Roztoky látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byly za chlazení ozařovány ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (iP).

Příloha B2



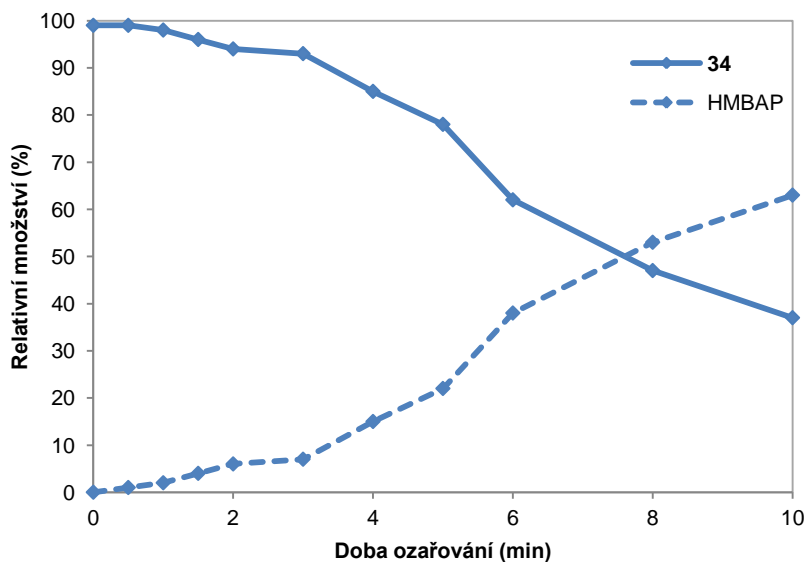
Porovnání průběhu fotolýzy 2-nitrobenzylvého (**22**) a 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylvého (**24**) derivátu MBAP. Roztoky látek (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byly za chlazení ozařovány ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (MBAP).

Příloha B3



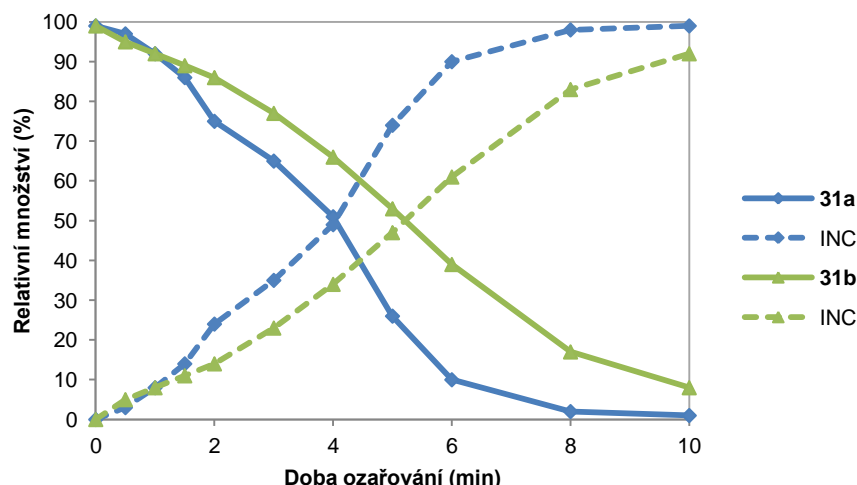
Průběh fotolýzy látky **27** při 100% intenzitě UV záření. Roztok látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (kin).

Příloha B4



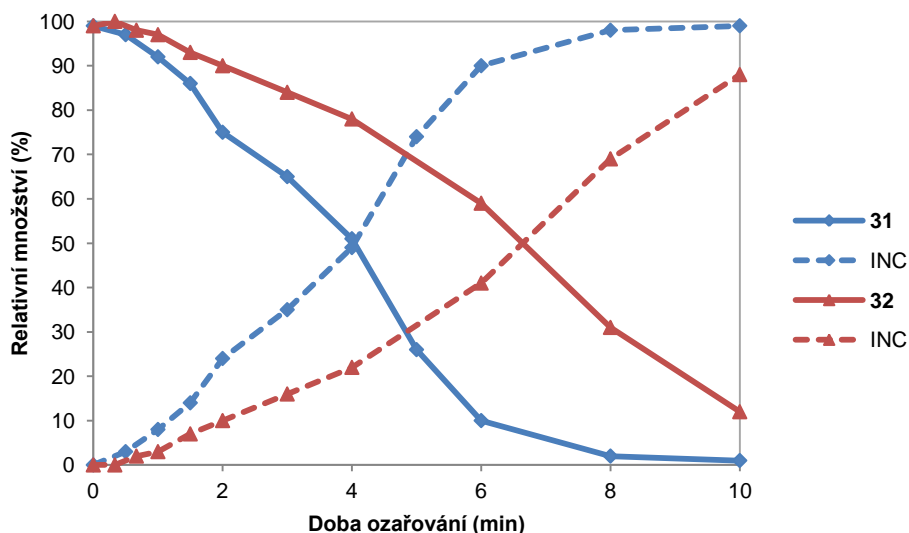
Průběh fotolýzy látky **34** při 100% intenzitě UV záření. Roztok látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (HMBAP).

Příloha B5



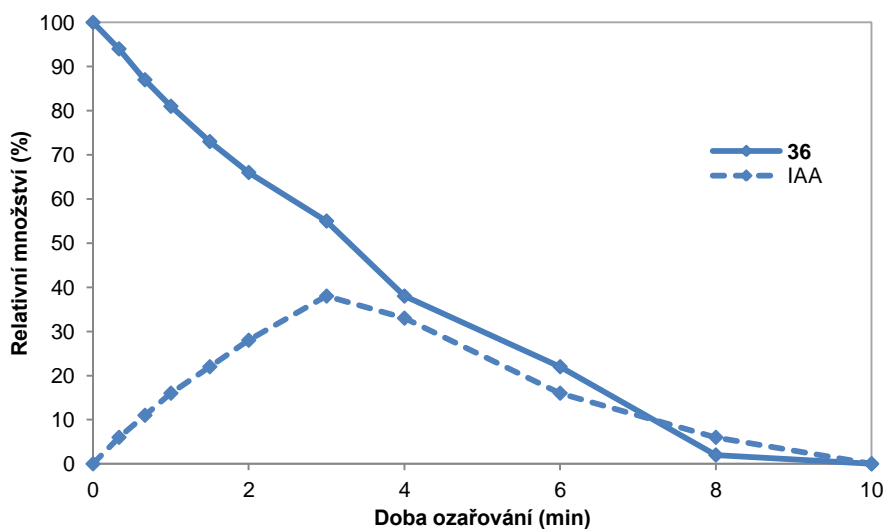
Porovnání průběhu fotolýzy látky **31** při 100% (modrá) a 50% intenzitě UV záření (zelená). Roztoky látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byly za chlazení ozařovány ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (INC).

Příloha B6



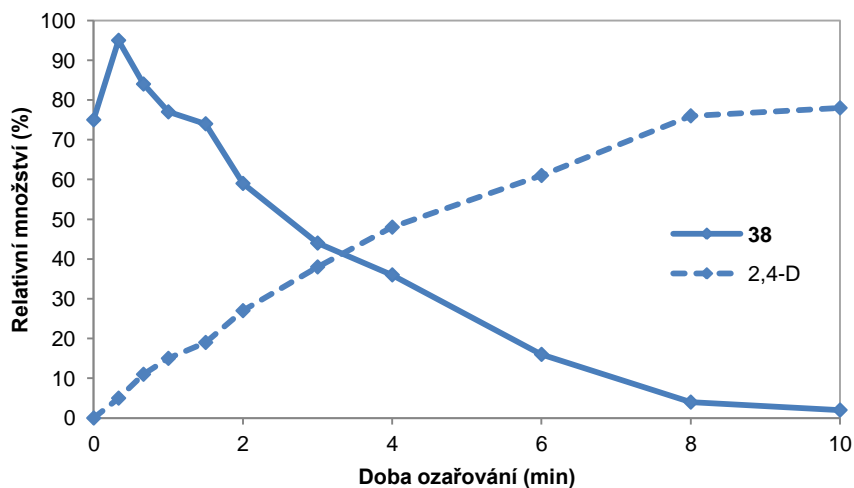
Porovnání průběhu fotolýzy 2-nitrobenzylového (**31**) a 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylového (**32**) derivátu INC. Roztoky látek (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byly za chlazení ozařovány ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (INC).

Příloha B7



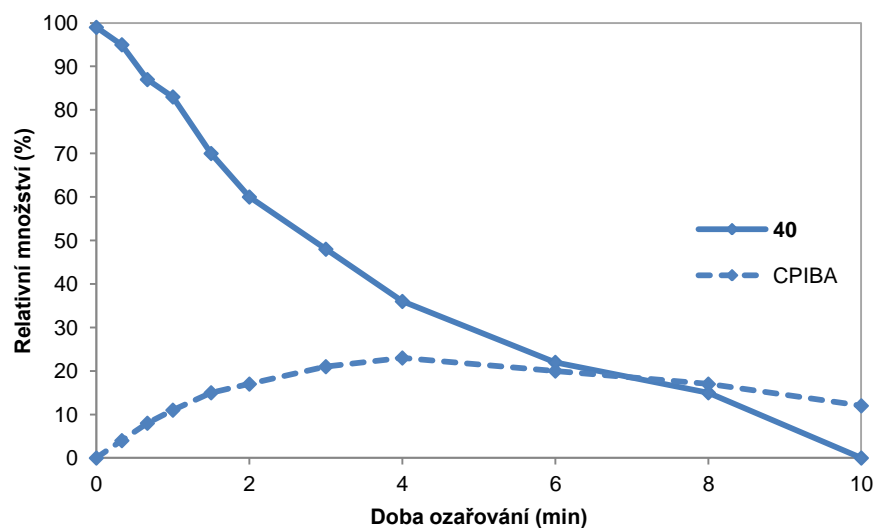
Průběh fotolýzy látky **36** při 100% intenzitě UV záření. Roztok látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (IAA).

Příloha B8



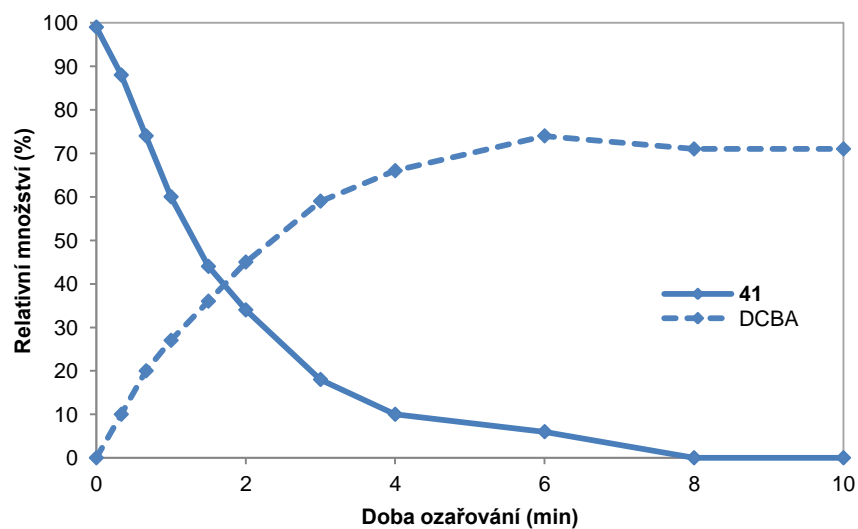
Průběh fotolýzy látky **38** při 100% intenzitě UV záření. Roztok látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (2,4-D).

Příloha B9



Průběh fotolýzy látky **40** při 100% intenzitě UV záření. Roztok látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (CPIBA).

Příloha B10

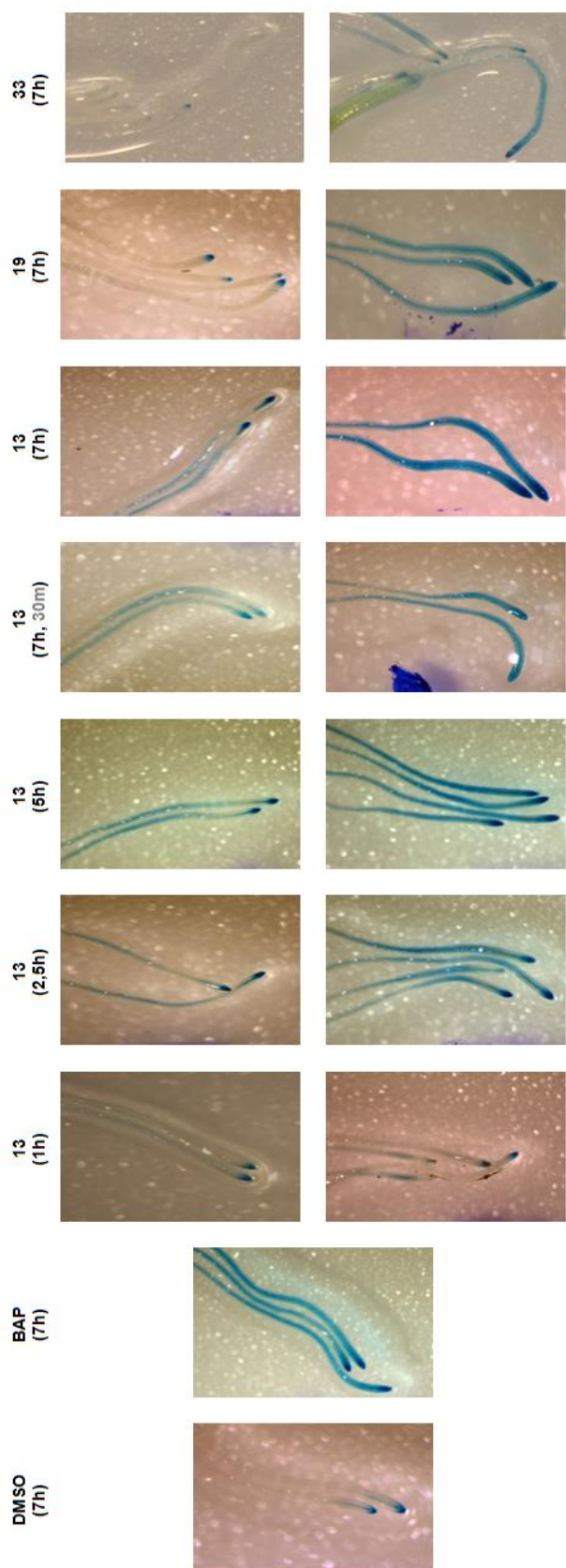


Průběh fotolýzy látky **41** při 100% intenzitě UV záření. Roztok látky (1mM v MeOH, pod 2 % DMSO) byl za chlazení ozařován ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla a frakce odebírané ve stanovených časových intervalech byly následně měřeny pomocí HPLC-UV/VIS. Plnou čarou je vyznačen pokles koncentrace testované caged-látky, přerušovaná čára značí vznik aktivní formy fytohormonu (DCBA).

Přílohy C

Výsledky kvalitativního *ARR5::GUS* biotestu

Příloha C1



Optimalizace histochemické lokalizace β -glukuronidasy v kořenech *A. thaliana*. Ze zásobního roztoku látky **13**, **19** a **33** (finální koncentrace $20\mu\text{M}$, $0,1\%$ DMSO) byly odebrány alikvoty, které byly za chlazení ozařovány po dobu 10 min ve vzdálenosti 5 cm od zdroje světla. Čtyřdenní semenáčky *ARR5::GUS* byly inkubovány v tekutém MS médiu s přidávkem neozařeného (-UV) a ozařeného (+UV) vzorku při $24\text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě. V daných časových intervalech (1, 2,5, 5 a 7 h) byly odebrány 2-4 rostliny, v nichž po inkubaci s chromogenním substrátem X-Glu (standardně 1 h) byla stanovena aktivita β -glukuronidasy.