

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra biotechnologií



**Trisubstituované deriváty purinů a jejich
biotechnologické aplikace**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Anna Malíšková
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Vedoucí práce:	Mgr. Magdaléna Bryksová, Ph.D.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat především své vedoucí diplomové práce Mgr. Magdaléně Bryksové, PhD. za odborné vedení, pomoc v laboratoři a trpělivost při mé práci. Mgr. Dardanu Klosovi za pomoc v laboratoři a při organizaci diplomové práce. Za pomoc při testování biologické aktivity bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Vylíčilové, PhD., Mgr. Jiřímu Vollerovi, PhD. a Mgr. Veronice Vojáčkové. Poděkování patří také paní Mgr. Haně Omámikové a Ing. Janě Kočířové za zpracování fyzikálně chemických testů. Za finanční podporu děkuji Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2024_007).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Malíšková
Název práce	Trisubstituované deriváty purinů a jejich biotechnologické aplikace
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra chemické biologie
Vedoucí práce	Mgr. Magdaléna Bryksová, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt:

Diplomová práce je zaměřena na syntézu derivátů aromatických cytokininů na pozici C2, C6 uhlíku a N9 dusíku. Nejdříve byla zpracována literární rešerše zaměřená na aromatické cytokininy, jejich vlastnosti, biosyntézu, roli v signalizaci a jejich využití v biotechnologiích. Dále byla teoretická část zaměřena na deriváty aromatických cytokininů, které již byly prostudovány. Praktická část je zaměřena na syntézu nových derivátů tohoto typu cytokininů, kde byly na pozici C6 a N9 purinového kruhu navázány zvolené substituenty. Na závěr proběhlo testování jejich biologické aktivity, a to pomocí senescenčního testu, kompetitivního testu na receptor AHK4, kalusového testu a testu cytotoxicity na nádorových a nenádorových buňkách.

Klíčová slova	Deriváty cytokininů, biologická aktivita, nádorové buňky, biotechnologie
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Anna Malíšková
Title	Trisubstituted purine derivatives and their biotechnology application
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Department of chemical biology
Supervisor	Mgr. Magdaléna Bryksová, Ph. D
The year of presentation	2024

Abstract:

The thesis is focused on synthesis of aromatic cytokine derivatives at the position of C2, C6 carbon and N9 nitrogen. At first, a literary research focused on aromatic cytokines, their properties, biosynthesis, their role in signalling and their use in biotechnology was conducted. Furthermore, the theoretical part focused on derivatives of aromatic cytokines that had already been studied. The practical part is focused on the synthesis of new derivatives of this type of cytokine, where the chosen substituents were bound to the position of the C6 and N9 purine rings. Finally, their biological activity was tested, using a senescence test, a competitive AHK4 receptor test, a callus test, and a tumour and antitumour cell cytotoxicity test.

Keywords	Cytokinins Derivatives, biology activity, tumor cell, biotechnology
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD	1
2.1 Cytokininy	3
2.1.1 Historie objevu cytokininů	3
2.1.2 Chemická struktura cytokininů	4
2.1.3 Metabolismus cytokininů	6
2.1.4 Role cytokininů v signalizaci rostlin	7
2.1.5 Role cytokininů v regulaci buněčného cyklu	9
2.2 Deriváty cytokininů	11
2.3 Využití cytokininů a jejich derivátů v biotechnologii	13
2.3.1 Mikropropagace rostlin	13
2.3.2 Cytokininy v medicíně	14
2.3.3 Cytokininy a jejich kosmetické aplikace	15
2.4 Inhibitory cyklin dependentních kinas	15
2.5 Využití pyrazolu jako motivu pro přípravu léčivých látek	17
2.6 Cytokininové biologické testy	18
2.7 Cytotoxické testy na živočišných buňkách	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Použité chemikálie	20
3.2 Metody a přístrojová technika	20
3.3 Syntézy derivátů	21
3.3.1 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9H-purin-6-amin (AM04)	21
3.3.2 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-fluoro-6-chloro-9H-purin-6-amin (AM05)	22
3.3.3 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM08)	23
3.3.4 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM09)	24
3.3.5 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM-12)	25
3.3.6 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-fluoro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM13)	26
3.4 Biologické testy	28
3.4.1 Testy senescence	28
3.4.2 Receptorový test	28
3.4.3 Kalusový test	29

3.4.4 Cytotoxicita na buňky nádorových linií.....	29
3.4.5 Cytotoxicita na buňky epitelu oka	29
4. VÝSLEDKY	31
DISKUZE.....	36
Závěr	38
Použitá literatura	39

Seznam zkratek

GA	Gibereliny
ABA	Kyselina abscisová
SA	Kyselina salicylová
IAA	Kyselina indol-3-octová
PAA	Kyselina fenylactová
NMR	Nukleární magnetická rezonance
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (z angl. High-resolution mass spectrometry)
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (z angl. Thin layer chromatography)
SAR	Systémově získaná rezistence (z angl. Systemic acquired resistance)
S-fáze	Syntetická fáze
M-fáze	Mitotická fáze
G-fáze	Gap fáze
IPT	Isopentenyltransferasa
BAP	6-benzylaminopurin
iP	Isopentenyl adenin
mT	meta topolin, 6-(3-hydroxybenzylamino) purin
<i>cZ</i>	<i>Cis</i> -zeatin, (<i>Z</i>)-2-methyl-4-(7 <i>H</i> -purin-6-ylamino)but-2-en-1-ol
<i>tZ</i>	<i>Trans</i> -zeatin, (<i>E</i>)-2-methyl-4-(7 <i>H</i> -purin-6-ylamino)but-2-en-1-ol
AMP	Adenosin monofosfát
ADP	Adenosin difosfát

ATP	Adenosin trifosfát
DMAPP	Dimethylallylpyrofosfát
iPRMP	Isopentenyladenosin-5-monofosfát
iPRDP	Isopentenyladenosin-5-difosfát
iPRTP	Isopentenyladenosin-5-trifosfát
LOG	Fosforibohydrolasa (z angl. Lonely Guy)
DHZ	Dihydrozeatin, 2-methyl-4-(7 <i>H</i> -purin-6-ylamino)butan-1-ol
CKX	Cytokinin oxidasa/ dehydrogenasa
UGT	Uridin difosfát glykosyltransferasa
HK	Histidinkinasa
HPP	Histidin fosfotransferový protein
RR	Protein regulace odezvy signálu (z angl. response regulator)
THP	Tetrahydropyran
THF	Tetrahydrofuran
TF	Transkripční faktory
CDK	Cyklin dependentní kinasa
CKI	Inhibitory cyklin dependentních kinas
AHK3	Arabidopsis histidinová kinasa 3
AHK4	Arabidopsis histidinová kinasa 4
AQP3	Aquaporin3
AHP	Histidin fosfotransferový protein
FMCA	fluorometrický test cytotoxicity mikrokultury (fluorometric microculture cytotoxicity assay)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid

DMSO	dimethylsulfoxid
TEA	Triethylamin
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
MV4-11 leukémií	nádorová buněčná linie zasažená bifenotypickou B-myelomonocytickou leukémií
K562	lidská buněčná linie zasažena myeloidní leukemií
MCF-7	buněčná linie karcinomu prsu
ARPE19	buňky pigmentového epitelu sítnice oka

CÍLE PRÁCE

V rámci teoretické části bude vypracována rešerše zaměřená na problematiku syntézy derivátů purinů a jejich vlivu na biologické systémy.

Praktická část diplomové práce bude zaměřena na chemickou syntézu trisubstituovaných derivátů purinů a jejich následnou charakterizaci pomocí nukleární magnetické resonance (NMR), vysokotlaké kapalinové chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry HPLC/MS) a elementární analýzy.

Následně budou provedeny testy biologické aktivity na rostlinných liniích v senescenčním, kalusovém a receptorovém testu. Na živočišných a lidských buněčných liniích budou provedeny testy cytotoxicity pomocí testu přeměny resazurinu na resofurin.

1 ÚVOD

Rostliny jako statické organismy se musí zvládat vyrovnávat s nejrůznějšími podněty jak z vnějšího, tak i z vnitřního prostředí. Proto mají velmi komplexní systém signalizačních drah, který jim umožňuje regulovat jejich růst a vývoj. Ke správné reakci na přijímané podněty jsou důležité fytohormony, které jsou regulátory růstu rostlin, ovlivňují jejich diferenciaci, vývoj embryí nebo zpomalení stárnutí. Mezi fytohormony patří například auxiny, gibereliny (GA), kyselina abscisová (ABA), cytokininy, kyselina salicylová (SA), brasinosteroidy a peptidové hormony (Khan, 1971).

Auxiny jsou rostlinné hormony, které mají vliv na mnoho aspektů vývoje a růstu rostliny. Jedním z hlavních efektů auxinů je fototropismus, který byl testován aplikací auxinů na dekapitované výhonky. Auxiny ovlivňují růst kořenové soustavy, inhibují prodlužování kořenů, ale naopak podporují růst a zakládání laterálních kořenů (Pickard a Thimann, 1964). Mezi nejvíce prostudované auxiny patří kyselina indol-3-octová (IAA) a její chlorovaná forma (Chadwick et al., 1967). Dále byla jako aktivní auxin identifikována kyselina fenylactová (PAA) (Wightman, 1977) a 3-indol máselná kyselina (Zolman et al., 2000).

ABA je fytohormon, který je v rostlinách všudypřítomný, a během života rostliny se jeho funkce mění. U dospělých rostlin reguluje reakce na environmentální podněty, jako je sucho nebo zasolení půdy. Při nedostatku vody potřebují rostliny ABA k udržení pozitivní vodní bilance a k uzavírání průduchů, čímž zamezují ztrátám vody odpařováním (Waadt et al., 2014). Kromě abiotického stresu má ABA vliv i na reakci na patogenní organismy. Bylo zjištěno, že při napadení rostliny patogeny dochází ke zvýšené expresi ABA (Huai et al., 2019; Du et al., 2014).

SA je sekundární metabolit, který je produkován řadou prokaryotických i eukaryotických organismů včetně rostlin. U rostlin má SA velký vliv při imunitních reakcích na patogenní organismy. Akumuluje se nejen v napadeném pletivu, ale i distálních pletivech, což je způsobeno systémově získanou rezistencí (systemic acquired resistance, SAR), která přenáší signál o napadení rostliny do okolních pletiv (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Zvýšení hladin SA a jejich funkčních analogů aktivuje expresi na patogeny závislých genů a zvyšuje imunitu vůči virovým, houbovým, bakteriálním a oomycetovým patogenům (Ryals et al., 1996).

GA mají stejně jako ostatní fytohormony vliv na růst a vývoj rostlin. Byla popsána jejich schopnost navrátit trpasličí vzrůst některých fenotypů rostlin kukuřice nebo hrachu

(Phinney 1956, Brian a Hemming 1955). Dále bylo zjištěno, že ovlivňují dobu kvetení rostlin (Lang 1956) a klíčení semen (Urbanova, T. and Leubner-Metzger, 2016). Brasinosteroidy mají velký vliv na tvorbu a regeneraci buněčné stěny (Wolf et al., 2012). Další z funkcí brasinosteroidů je regulace stresové reakce rostlin na sucho, kdy reguluje otvírání stomat, odpařování vody a výměny plynů (Dong a Bergmann, 2010), ale také regulace metabolismu v reakci na světlo (Song et al., 2009). Jedním z nejvíce studovaným peptidovým hormonem je CLAVATA3 protein, který reguluje dělení apikálního stonkového meristému (Fletcher et al., 1999).

Tato diplomová práce bude zaměřená na cytokininy a jejich deriváty, které jsou důležitými rostlinnými hormony, bez nichž by rostliny nebyly schopny správného růstu, reakcí na biotický a abiotický stres a ani rozmnožování.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Cytokininy

Cytokininy jsou přirozeně se vyskytující malé organické molekuly, které se podílejí na řadě procesů v rostlinách, jako je regulace růstu rostlin, jejich diferenciaci, vývoj embryí, fotosyntéza nebo třeba zpomalení senescence (O'Brien a Benkova, 2013; Guo a Gan, 2005). Cytokininy hrají klíčovou roli skoro ve všech vývojových obdobích rostlin (Hönig et al., 2018). Hladina cytokininů je ovlivněna také buněčným cyklem, kdy se nejvíce cytokininů tvoří během syntetické fáze (S-fáze), naopak během mitotické fáze (M-fáze) jsou hladiny cytokininů sníženy (Redig et al., 1996).

Cytokininy nemusí být syntetizovány pouze v rostlinách, ale jsou tvořeny některými bakteriálními, houbovými nebo hmyzími druhy, které interagují s rostlinami. Tyto druhy jsou schopny tvořit různé skupiny cytokininů, pomocí nichž ovlivňují rostliny a modulují například jejich růst nebo imunitní odpověď. Mezi interagující organismy patří jak rostlině prospěšné organismy (symbionti), tak rostlinné patogeny či parazité. Rostlinní symbionti napomáhají rostlině produkovat určité druhy fytohormonů, a tím zvyšují odolnost vůči biotickému či abiotickému stresu, ale také podporují její růst. Naopak rostlinní parazité dokáží vytvořit cytokininy, které potlačují imunitní odpověď napadeného organismu a tím zvyšují virulenci patogenu (Akhtar et al., 2020).

Cytokininy jsou syntetizovány kromě rostlin a rostlinných parazitů také v sinicích, kde jsou zodpovědné za interakce mezi rostlinami a sinicemi. Bylo zjištěno, že sinice exkretují některé druhy cytokininů do media. Takto získané cytokininy mohou být následně použity pro *in vitro* regeneraci rostlin (Uniyal et al., 2022). Některé sinice jsou schopné kolonizovat kořeny rostlin, prorůst stěnu kořene a stimulovat jejich růst. U těchto sinic jsou hlavním iniciátorem kolonizace kořenů rostlin právě cytokininy. Tato hypotéza byla potvrzena studií linie sinic s vyřazeným genem isopentenyl transferasy (IPT), který je důležitý pro syntézu cytokininů (Lee et al., 2021).

2.1.1 Historie objevu cytokininů

První cytokininy byly objeveny v 50. letech 20. století vědeckou skupinou doktora Millera a doktora Skooga kteří objasnili i jejich vliv na vývoj rostliny. Jako první identifikovali 6-furfurylaminopurin (kinetin), který podporuje buněčné dělení. Bylo také zjištěno, že cytokininy lze exogenně přidat pro zlepšení růstu *in vitro* kultivovaných rostlin (Miller et al., 1956).

První přirozeně se vyskytující identifikovaný cytokinin byl isoprenoidní derivát pojmenovaný jako *trans*-zeatin (tZ), který byl izolovaný roku 1963 z kukuřice seté (*Zea mays*) (Letham, 1963). Později byly identifikovány i další přirozeně se vyskytující cytokininy jako je N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenin (iP), cis Zeatin (cZ) nebo dihydrozeatin (DHZ) (Miller, 1967; Koshimizu et al., 1967)

Také mezi aromatickými cytokininy bylo do dnešního dne identifikováno mnoho přirozeně se vyskytujících zástupců jako je N⁶-(3-hydroxybenzyl) adenin (meta-topolin, mT) (Werbouck et al., 1996) nebo 6-(3-methoxy benzylamino) purin ribosid (Tarkowská et al., 2003). V současnosti je však jedním z nejpoužívanějších cytokininů syntetický 6-benzylaminopurin (BAP), který podporuje u kultivovaných tkání buněčné dělení (Miller et al., 1956). Aromatické cytokininy umožnily velký rozvoj v mikropropagaci řady kulturních rostlin, které by bylo jinak obtížné kultivovat (Koprna et al., 2016). Vlastnosti BAP a jeho vliv na růst rostlin byly studovány již od 50. let 20. století a spolu s kinetinem jsou jedny z nejpoužívanějších cytokininů v kultivačních médiích pro růst rostlin (Scott a Liverman, 1956; Senanayake et al., 2024). Pro správný růst rostlin na kultivačním mediu je potřeba přidat další z fytohormonů, a to auxiny, které umožňují regulaci růstu stonkových a kořenových výhonků. Nejvíce prostudovaným a využívaným auxinem v mikropropagaci rostlin je IAA (Liverman a Bonner; 1953, Darise et al., 2023).

2.1.2 Chemická struktura cytokininů

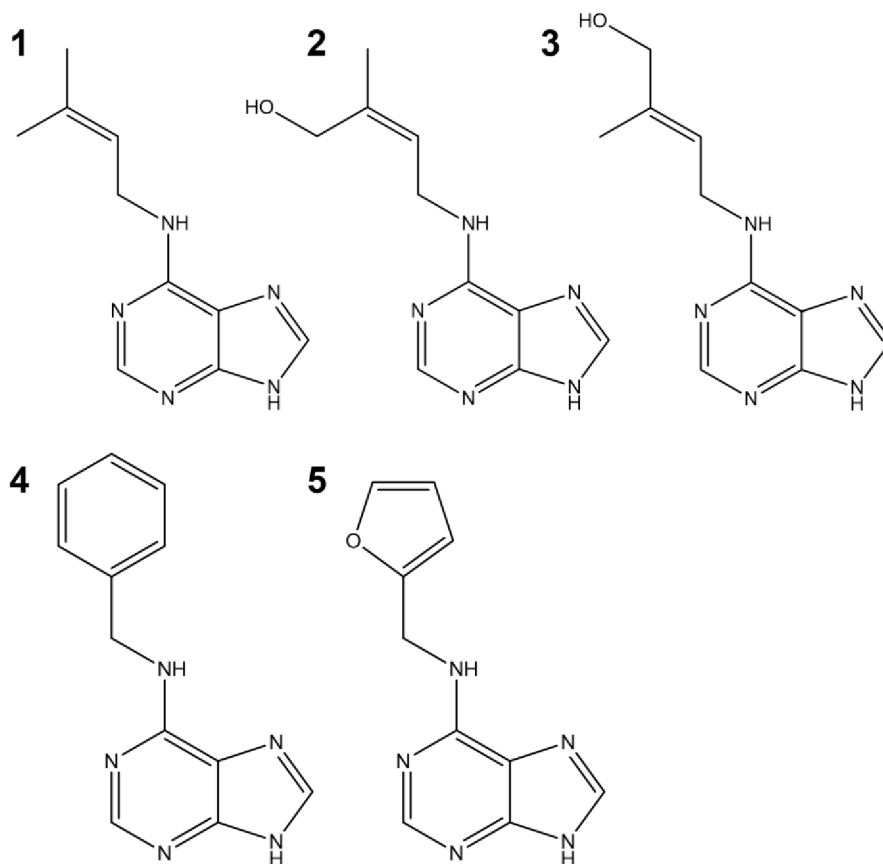
Cytokininy je možné rozdělit dle původu do dvou základních skupin. Do první skupiny řadíme ty cytokininy, které lze běžně najít v přírodě. Tyto značíme jako přirozeně se vyskytující nebo přírodní. U zbylých cytokininů nebyl zatím přirozený výskyt potvrzen, a tudíž se značí jako syntetické cytokininy.

Cytokininy můžeme dále rozdělit do dvou kategorií dle struktury postranního řetězce, a to na isoprenoidní (obsahující isopren v alifatickém řetězci) a aromatické (obsahující aromatické jádro navázané na N⁶ pozici) (Tarkowski, 2004).

Mezi cytokininy obsahující isoprenoidní postranní řetězec patří například zeatin nebo iP. Zeatin se vyskytuje ve dvou konfiguracích, a to jako *tZ* a *cZ*. Při srovnání má *tZ* přirozeně vyšší aktivitu má v porovnání s *cZ*, který je obecně popisován jako málo aktivní nebo neaktivní (Grobkinsky et al., 2013).

Nejznámějšími aromatickými cytokininy jsou například BAP nebo kinetin (Horgan et al., 1975). Ty jsou jako zástupci aromatických cytokininů mnohem stabilnější v živých rostlinách oproti isoprenoidním cytokininům, které jsou náchylnější k oxidativní

degradaci. Aromatické formy cytokininů mají navíc přirozenou schopnost zamezovat tvorbě reaktivních forem kyslíku, což pozitivně ovlivňuje antisenescenční i antistresové vlastnosti rostlinných buněk (Plíhal et al., 2013) (Obrázek 1).



Obrázek 1: Zástupci nejznámějších cytokininů 1: isopententenyldenin, 2: cis-zeatin, 3: trans-zeatin, 4: 6-benzylaminopurin, 5: kinetin.

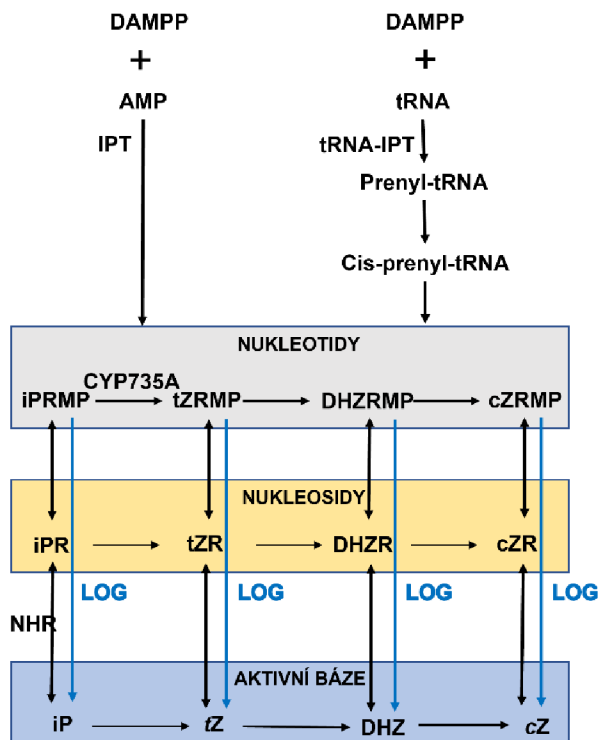
2.1.3 Metabolismus cytokininů

Biosyntetická dráha byla doposud plně popsána pouze u isoprenoidních cytokininů, ale u aromatických cytokininů není do dnešního dne objasněna (Davies, 2010).

Pro správný metabolismus cytokininů je důležitá řada enzymů. Jedním z hlavních enzymů biosyntézy cytokininů je IPT, která umožňuje navázání buď adenosin-5'-monofosfátu (AMP), adenosin-5'-difosfátu (ADP) nebo adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na isoprenoidní prekurzor dimetylallyl pyrofosfát (DMAPP), za vzniku isopentenyladenosin-5'-monofosfátu (iPRMP), isopentenyladenosin-5'-difosfátu (iPRDP) nebo isopentenyladenosin-5'-trifosfátu (iPRTP). Tyto meziproducty jsou poté přeměněny hydroxylací na nukleotid působením enzymu cytochromu P450 (Ding, 2006). Druhou možností biosyntézy nukleotidu z DMAPP je pomocí tRNA-IPT navázáním specifické tRNA za vzniku meziproductů prenyl-tRNA a cis-prenyl-tRNA, ze které vzniká daný ribonukleotid. Ze vzniklých ribonukleotidů poté vznikají aktivní volné báze iP, tZ, cZ nebo DHZ, a to buď přímo z ribonukleotidů pomocí enzymu fosforibohydrolasy (Lonely Guy, LOG) anebo katalýzou enzymem 5'ribonukleotid fosfohydrolázou za vzniku ribonukleosidu jako meziproductu (Márquez-López et al., 2019). (Obrázek 2)

Při regulaci metabolismu cytokininů dochází k jejich inaktivaci a tím jejich uložení pro pozdější využití. Jednou z možností inaktivace cytokininů je cytosolární enzym uridin difosfát glykosyltransferasa (AtUGT), který byl objeven u *Arabidopsis thaliana*. Ten je odpovědný za reverzibilní konjugaci glukosy či xylosy na hydroxylovou skupinu na N6-postranního řetězce tZ, cZ nebo DHZ. Pomocí této glykosylace dochází k vratné inaktivaci cytokininových volných bází (Šmehilová et al., 2016). Pro opětovné uvolnění aktivní formy cytokininu je využito aktivity β -glukosidasy, která rozštěpí navázaný glykosid (Brzobohatý et al., 1993).

Pro degradaci cytokininů je důležitý enzym cytokininoxidasa (CKX), která je potřebná pro ireverzibilní rozklad cytokininů. Tento enzym je pozitivně regulován přítomností auxinů. Při degradaci dochází ke štěpení postranního řetězce za vzniku adeninu nebo adenosinu (Hare a Staden, 1994). CKX byla poprvé popsána roku 1971 ve vědecké studii, ve které byla sledována aktivita tehdy neznámého enzymu z tabákového listu při přeměně substrátu iP na adenin (Paces et al., 1971). Místo degradace cytokininů bylo určeno v apoplastu. Na rozkladu se podílejí cytokinin dehydrogenasa 2 (CKX2) a cytokinin dehydrogenasa 4-6 (CKX4-6) (Skalický, 2018).



Obrázek 2: Biosyntéza biologicky aktivní báze jako prekurzoru pro syntézu cytokininů (Upraveno podle Ding 2006).

2.1.4 Role cytokininů v signalizaci rostlin

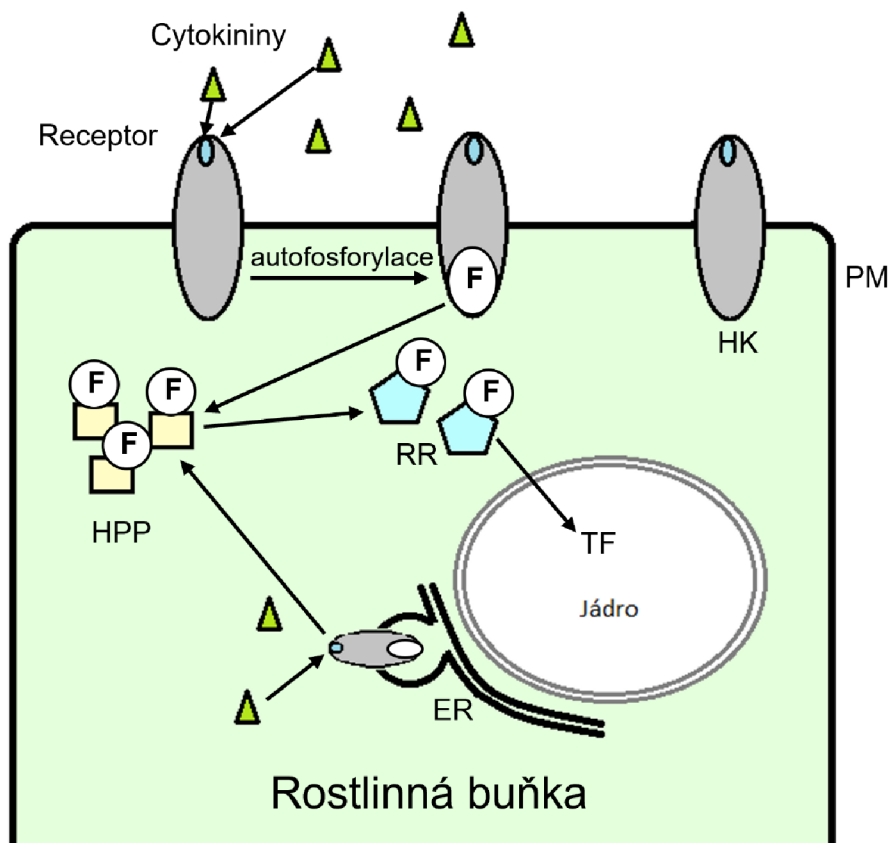
Plasticita a zároveň pevnost rostlin je dána rozložením různých druhů meristémů v rámci celé rostliny a také diferenciací jednotlivých orgánů. Diferenciace probíhá dle specifického vývojového programu rostliny, ale je také ovlivněna prostředím, ve kterém žije, což vede k optimalizaci morfologie a fyziologie rostliny pro dané prostředí (Srivastava 2002). Pro správný vývoj orgánů a celkový metabolismus rostliny je potřebná koordinovaná komunikace mezi rostlinnými orgány, pletivy nebo i jednotlivými buňkami v rostlině. Hlavními komunikačními kanály mezi rostlinnými orgány jsou xylém a floém. Pro přenos informací jsou potřebné fytohormony, různé druhy asimilátů, anorganické ionty, fytohormony, peptidy, ale také RNA (Sakakibara 2021).

Na hormonální signalizaci v rostlinách se nejvíce podílejí kromě cytokininů také auxiny. Funkce těchto dvou skupin fytohormonů jsou i nejvíce prostudovány. Auxiny a cytokininy se vzájemně ovlivňují a poměry těchto hormonů mají následně vliv na mnoho vývojových procesů (Hamil, 1993). V řadě případů signalizace těchto dvou typů hormonů působí vůči sobě antagonisticky. Pokud je v kultivačním mediu vyšší poměr auxinů vůči

cytokininům, tak je inhibován růst výhonků rostliny. Naopak, pokud má rostlina k dispozici větší poměr cytokininů, tak je inhibován růst kořenového systému. Bylo zjištěno, že antagonismus mezi cytokininy a auxiny je primárně určen na molekulární úrovni a je proto podstatný pro diferenciaci kořenových kmenových buněk během časné embryogeneze (Naseem a Dandekar, 2012).

Cytokininy mají důležitou roli v signalizaci u rostlin. Jako signální molekuly se vyskytují ve dvou formách. Prvním typem je tZ, který je syntetizovaný v kořenech a následně je přemístěn přes xylém akropetálně do nadzemní části rostliny. Druhý, iP, je tvořen ve výhoncích a poté je transportován směrem ke kořeni pomocí floému (Bürkle et al., 2003).

Potřebnou složkou pro cytokininovou signalizaci jsou histidinkinasy (HK), které se podílejí na celkové fytohormonové signalizaci. Samotný mechanismus signalizace spočívá ve dvousložkové signalizační kaskádě. Jako první detekuje receptor na HK cytokininový signál z vnějšího prostředí, následně dojde k autofosforylaci HK, který je lokalizován často v membráně buňky. Poté je signál přenesen na Histidin fosfotransfer protein (HPP) (Hutchison et al., 2006) a protein regulace odezvy signálu (response regulator, RR). Signál je dál přenesen přes výstupní doménu a modifikuje transkripci specifických genů. Transkripční faktory (TF) daných genů jsou fosforylovány pro odpověď na daný signál (viz Obrázek 3) (Ryo *et al.*, 2018).



Obrázek 3: Schématické znázornění cytokininové signalizační dráhy (Upraveno podle Hutchison et al., 2006).

2.1.5 Role cytokininů v regulaci buněčného cyklu

Při buněčném cyklu dochází ke kompletnímu zdvojení mateřské buňky za vzniku dvou identických dceřiných buněk s rovnoměrně rozdělenými buněčnými složkami. K samotnému dělení je nejdříve potřeba replikovat DNA buňky, což probíhá v S fázi. Rozdělení buňky probíhá poté v M fázi, kdy se nejdříve rovnoměrně rozestoupí zdvojené chromozomy a následně se rozdělí celá buňka. Pro S fázi a M fázi jsou důležité Gap fáze (G fáze), které slouží k syntéze komponent pro replikaci a následnou mitózu (Pardee et al., 1978).

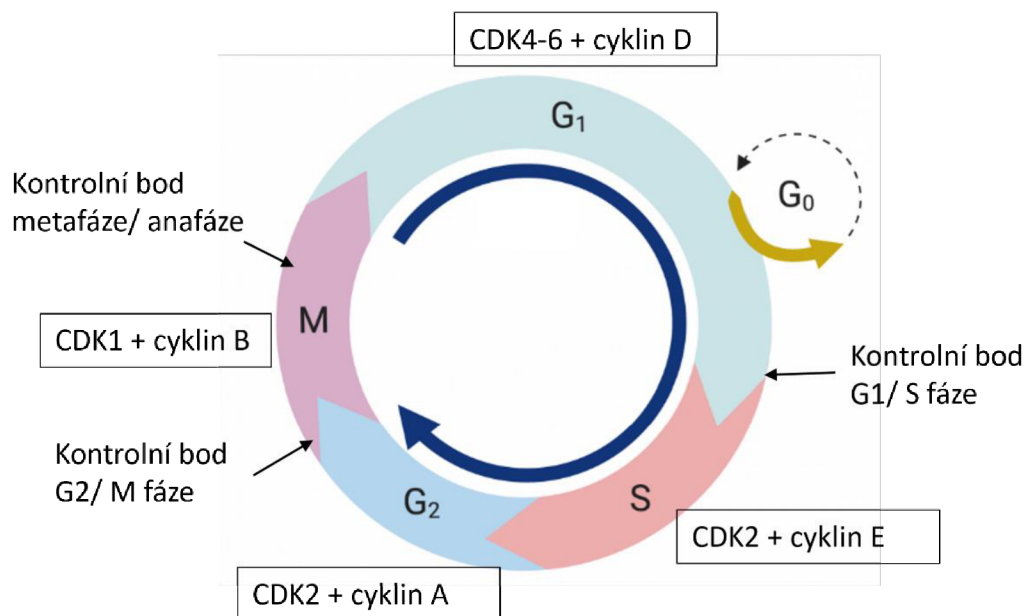
Cytokiny hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, kterou zabezpečují aktivací signální dráhy cyklinindependentních kinas (CDK), což jsou serin/ threoninové protein kinasy, které fosforylují specifické substráty a tím regulují syntézu DNA i mitózu. CDK jsou aktivovány navázáním cyklinu a následnou fosforylací vzniklého komplexu (Pines, 1999). CDK mohou být negativně regulovány zpětnovazebnou inhibicí cyklinindependentních kinas (CKI), které jsou nezbytné při regulaci proliferace a

diferenciace buněk (Sherr a Roberts, 1995). Špatná regulace buněčného cyklu a absence kontrolních mechanismů buněčného cyklu má za následek vznik nekontrolovaného buněčného dělení, což je typickým znakem nádorových buněk (Millard a Koff, 1998).

U rostlin je regulace buněčného cyklu o něco jednodušší než u živočichů. Samotné regulace se účastní několik faktorů jako je sacharosa, dusičnany, auxiny a cytokiny. Tyto faktory mají za úkol regulovat expresi klíčových komponent buněčného cyklu, jako jsou CDK a cykliny. Auxiny mají za úkol aktivovat CDK, sacharosa reguluje expresi cyklinu D2, dusičnany regulují expresi cyklinu D1 a cytokiny mají na starost expresi cyklinu D3 (Segers et al., 1996, Mészáros et al., 2000). V rámci regulace buněčného cyklu se zapojuje fytohormon ABA, který hraje roli ve zpětnovazebné inhibici regulací exprese CKI (Liu et al., 2003).

Regulace fáze G1 se účastní CDK 4-6 v komplexu s cykliny třídy D (Quelle et al., 1993). Kromě samotné G1 fáze tento komplex reguluje i vstup do následné S fáze, ve které si roli regulátoru přebírá komplex CDK2-cykliny E. Na konci S fáze se odpojují cykliny E a místo nich se napojí cykliny A, které regulují průchod G2 fází (Stead et al., 2002). Po přípravné G2 fázi se odpojuje komplex CDK2-cyklin A a dochází k přechodu do M fáze buněčného cyklu, kdy je fosforylován komplex CDK1-cyklin B. (Obrázek 5) Tento komplex je zodpovědný za průběh řady procesů během mitózy, jako je kondenzace chromozomů pomocí fosforylace histonových proteinů nebo rozpad jaderné membrány a následná tvorba mikrotubulového vřeténka potřebná pro rozestup chromozomů (Gavet a Pines, 2010).

Aktivovaný komplex cyklin-CDK fosforyluje specifický cílový protein regulace odezvy signálu RR pomocí ATP. RR je poté odpovědný za reakci na danou cytokininovou signalizaci (Horowitz et al., 1990). Nejdůležitější místa regulace buněčného cyklu jsou kontrolní body, ve kterých může dojít k jeho zastavení. Tyto kontrolní body se nacházejí mezi G1 a S fází, mezi G2 a M fází a mezi metafází a anafází mitózy. (Obrázek 4) Častým důvodem zastavení buněčného cyklu je detekce poškození DNA, které může být způsobeno vnitřními vlivy jako jsou chyby při replikaci DNA, tvorba onkogenů nebo zkrácení telomer (Grana et al., 1995; Strauss, et al., 1995). Kromě signálů zevnitř je buněčný cyklus regulován i vnějšími signály, jako je množství živin, biotické a abiotické stresy nebo UV záření. U mnohobuněčných organismů mají různé buňky odlišné funkce, a tudíž je potřebná rozdílná regulace buněčného cyklu pro různé typy buněk (Nigg, 1995).



Obrázek 4: Kontrolní body savčího buněčného cyklu působením CDK (Upraveno dle Grana et al., 1995).

2.2 Deriváty cytokininů

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou během své biosyntézy modifikovány. Při těchto úpravách jsou aminokyseliny nebo různé cukerné části (jako je například alanin, glukosa nebo ribosa) připojovány k základní kostře cytokininů. Podle modifikací se cytokininy vyskytují v různých formách jako jsou nukleotidy, nukleosidy, glykosidy (ve formě *O*-glykosidů nebo *N*-glykosidů), anebo ve formě volné báze. Tato forma je dána typem konjugované molekuly na základní cytokininové struktuře (Uniyal *et al.*, 2022).

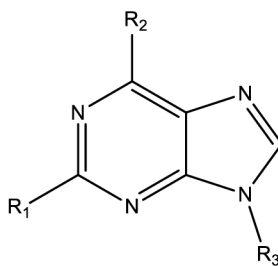
Při syntéze derivátů cytokininů dochází ke změnám jak jejich chemických, fyzikálních, ale i biologických vlastností. Cytokininy mají přirozeně řadu vlastností pro jejich využití v zemědělství, biotechnologiích, medicíně nebo kosmetice. Cílenou syntézou derivátů cytokininů můžeme jejich dosavadní vlastnosti vylepšit, nebo získat vlastnosti nové, a proto jsou hojně zkoumány (Oshchepkov *et al.*, 2020). Nejčastěji deriváty vznikají navázáním substituentů do pozic uhlíku C2 (R1 substituent), C6 (R2 substituent) anebo dusíku N9 (R3 substituent) výchozího adeninu (viz Obrázek 5). Vlastnosti derivátů cytokininů jsou ovšem modifikovány navázáním substituentů na všechny pozice purinového skeletu.

Diplomová práce se zabývá syntézou derivátů cytokininů se substitucí v pozicích uhlíku C2 a dusíku N9. Na pozici C2 byly navázány deriváty chloru nebo fluoru. Ve studii

vědeckého týmu Savelieva et al., 2018 byla testována řada analogů BAP, které byly substituovány v pozicích C2 a C6 uhlíku a N9 dusíku adeninu. V receptorovém biotestu bylo zjištěno, že aktivita receptoru AHK3 byla zvýšena po přidání analogů obsahující halogeny chlor a fluor na pozici C2 uhlíku v porovnání s analogy obsahující na této pozici vodík nebo amino skupinu. Substituce chloru nebo fluoru v pozici C2 uhlíku, oproti substituci amino skupiny, zvýšila aktivitu i v Amaranthovém testu (Savelieva et al., 2018).

Při studiu antisenescenční aktivity cytokininů na rostlinách bylo zjištěno, že lze zvýšit biologickou aktivitu přirozeně se vyskytujících cytokininů jejich modifikací. Zejména se osvědčilo navázání skupiny tetrahydropyranu (THP) nebo tetrahydrofuranu (THF) na N9 atom purinu (Szučová et al., 2009). Při studiu antisenescenční aktivity bylo zjištěno, že u derivátů vykazující vyšší antisenescenční aktivitu dochází ke snížení peroxidace lipidů v membránových strukturách za temnostních podmínek (Zavaleta-Mancera et al., 2007).

Kromě výše popsaného pozitivního efektu na rostlinné buňky byl u některých typů derivátů studován vliv na živočišné buňky. Bylo zjištěno, že cukerné cytokininové konjugáty s ribosou navázanou na pozici N9 dusíku mají slibné cytotoxické vlastnosti vůči širokému spektru nádorových buněk (glioblastom, rhabdomyosarkom, rakovina prsu, nádory centrálního nervového systému, kolorektální rakovina, rakovina plic, leukémie, melanom, rakovina prostaty, vaječnicků a ledvin) (Doležal et al., 2007; Voller et al., 2010; Voller et al., 2017). Problémem u řady ribosidů je jejich toxicita i na necílové tkáni (Jordheim et al., 2013).



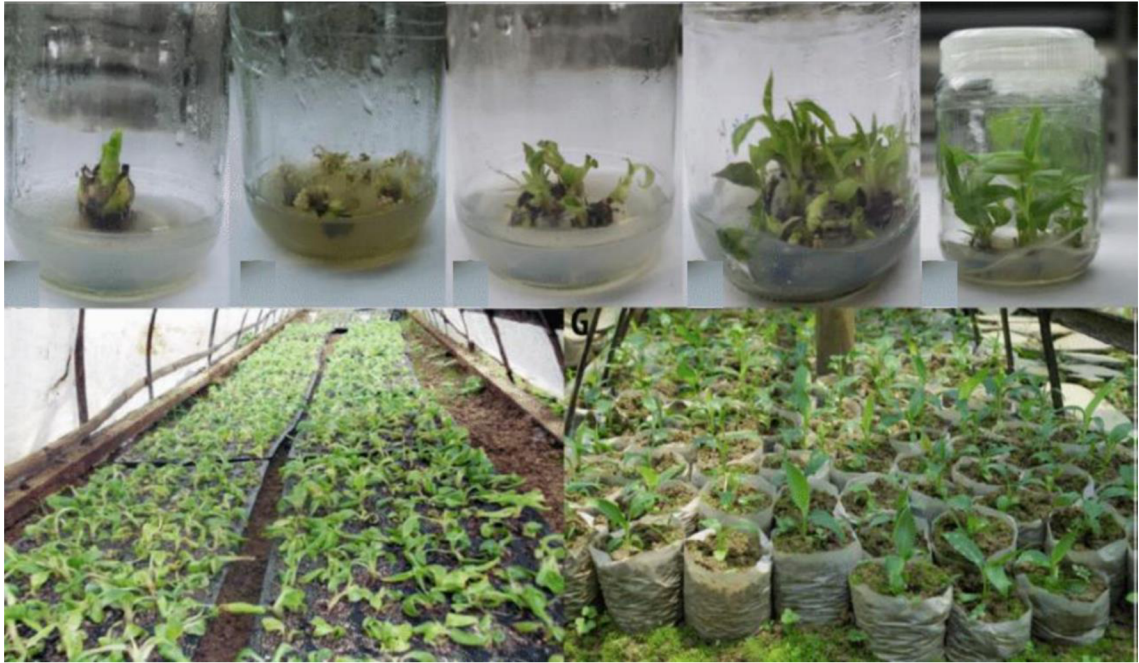
Obrázek 5: Schématické znázornění nejčastějších míst substitucí adeninu při tvorbě derivátů cytokininů.

2.3 Využití cytokininů a jejich derivátů v biotechnologii

Hlavním cílem biotechnologií v zemědělství je zvýšit výnosnost plodin, zlepšit jejich odolnost, růst a nutriční vlastnosti. Tato vylepšení jsou potřeba z důvodu vzrůstající lidské populace a tím i zvyšujících se nároků na množství potravin, a to se zmenšující se plochou pro pěstování, kvůli růstu měst. Zemědělské plodiny se potýkají s řadou negativní faktorů, jako jsou měnící se teploty, zasolení půdy a nedostatek vody nebo napadení plodin patogeny či škůdci. Pro zlepšení kvality plodin se za poslední roky vyvinuly nové technologie, jako jsou genetické modifikace, fotobiotechnologie nebo manipulace s fytohormonovou rovnováhou (Tripathy et al., 2017).

2.3.1 Mikropropagace rostlin

Exogenně aplikované cytokininy ovlivňují růst rostlin, čehož je využíváno při mikropropagaci rostlin. To znamená propagaci rostlin daného genotypu pomocí *in vitro* technik. Často se mikropropagace provádí za účelem vyššího výnosu rostlin nebo jejich levnější produkce (Debergh a Read, 1991). Nejpoužívanějším cytokininem pro mikropropagaci je BAP, který je využíván především pro jeho významnou podporu růstu rostlin a relativně jednoduchou přípravu (Plíhalová *et al.*, 2016). Při přidání cytokininů do kultivačního media dochází ke stimulaci tvorby výhonků z nediferenciovaného kalusu, kořeny se naopak tvoří minimálně (Fratini a Ruiz, 2002). Stimulace růstu výhonků je ovlivněna nejen typem využitého cytokininu, ale i druhem rostliny, která je kultivována (Shah et al., 2015). Nejčastěji kultivované plodiny v dnešní době jsou banány (viz Obrázek 6), jahody, jablka, růže, melouny, ale také celá škála okrasných nebo léčivých rostlin. Pro řadu rostlinných druhů je mikropropagace nejlepší možností, jak snížit náklady na produkci rostlin anebo zvýšit množství vypěstovaných plodin (Aremu et al., 2020).



Obrázek 6: Nahoře: Průběh mikropropagace banánů na kultivačním mediu. Dole: Pěstování banánů z kultivačního media v kontrolovaných podmínkách ve skleníku (Devi et al., 2017).

2.3.2 Cytokininy v medicíně

Velkou výzvou ve výzkumu nových látek využitelných v medicíně, je objevit látky s antimikrobiálními, protizánětlivými nebo třeba protinádorovými vlastnostmi bez vedlejších účinků na cílový organismus. Častou komplikací je nutnost kombinace léčiv pro léčbu zánětu a zároveň léčiv s antimikrobiálními vlastnostmi (Bekhit et al., 2005).

Role přirozeně se vyskytujících cytokininů v regulaci buněčného cyklu a diferenciaci rostlinných buněk ukazuje na jejich možnou klíčovou roli v biochemických procesech nejen v rostlinných, ale i živočišných nebo lidských buňkách. Cytokininy a jejich deriváty byly v posledních letech biologicky testovány na možnosti jejich využití také v lékařství. Mají slibné vlastnosti pro využití jako protinádorové, antivirové, antiparazitární léčiva a jiné farmaceutické prostředky nebo jako inhibitory neurodegenerace (Oschepkov et al., 2020).

Během posledních několika let byla testována biologická aktivita řady derivátů cytokininů, a to jak v živočišných, tak i v rostlinných buňkách. Odlišnou aktivitu u živočišných buněk oproti rostlinným způsobuje to, že živočišné buňky postrádají receptorové HK a vícekrokové fosforylační signalizační kaskády, které se vyskytují v rostlinách a jsou odpovědné za cytokininovou signalizaci. V práci, kterou zveřejnil

Voller et al. (2010) byla porovnávána cytotoxická aktivita některých vybraných nukleosidů a jejich odpovídajících nukleotidů v živočišných buňkách. Cytokininy byly testovány na protinádorovou aktivitu, kdy bylo zjištěno, že vybrané nukleotidy měly ke svým nukleosidovým derivátům srovnatelnou aktivitu. Na rozdíl od volných bází, které byli v rakovinných buňkách neaktivní.

2.3.3 Cytokininy a jejich kosmetické aplikace

Bylo zjištěno, že cytokininy mají vliv na *in vitro* kultivované epitelální buňky. Tato studie ukazuje, že tyto fytohormony mohou být použity jako lokální látky pro ochranu a regeneraci pokožkového epitelu (Rattan a Clark, 1994).

Mechanismus vlivu cytokininů na pokožkové buňky spočívá v jejich antioxidační aktivitě. Kinetin i BAP mají pozitivní vliv na aktivitu antioxidačních enzymů, ochraňují před oxidačním a glykosylačním poškozením DNA, a zabráňují degradaci membránových proteinů a fosfolipidů (Jabłońska-Trypuć et al., 2016). Důležitým faktorem pro účinky fytohormonů je použitá koncentrace. Při nízkých koncentracích vykazují antioxidační vlastnosti, ale naopak při použití vysokých koncentrací cytokininů je vliv oxidačního stresu zesílený a aktivuje buněčnou apoptózu (Othman, et al., 2016).

Z důvodu pozitivního vlivu cytokininů na pokožkové buňky, jsou komerčně vyráběny krémy obsahující jako aktivní složku cytokininy nebo jejich blízké deriváty. Při klinických studiích používání krému obsahující 2 % kinetinu na pleť byla zlepšená její hydratace a pružnost a byla zvýšena odolnost vůči UV záření (Ji et al., 2010). UV záření je problémové z důvodů dehydratace pleti, která je doprovázená ztrátou membránového transportéru vody (aquaporinu, AQP3) a tím dochází k celkovému stárnutí pleti. Bylo zjištěno, že tZ zabráňuje ztrátě AQP3, čímž pomáhá zachovat strukturu a hydrataci kůže a také urychluje hojení kožních ran (An et al., 2017).

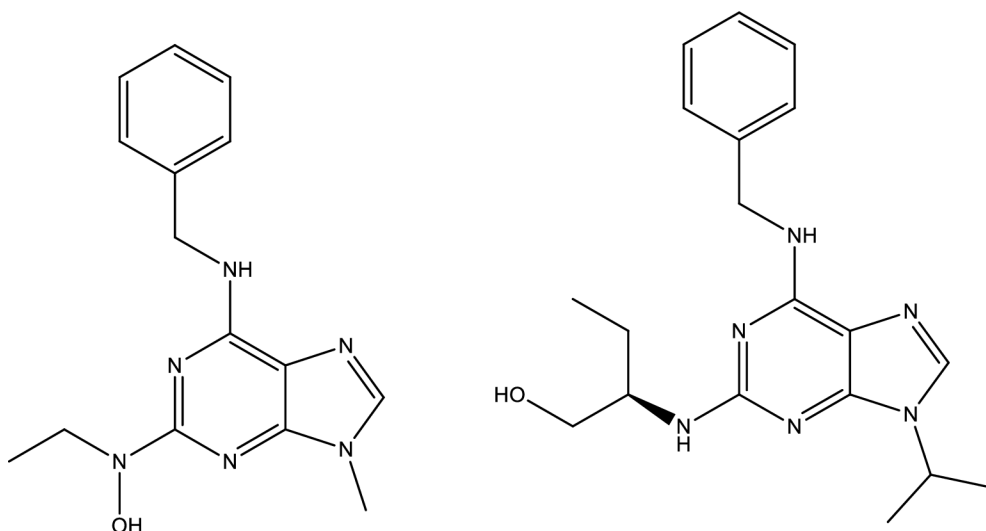
2.4 Inhibitory cyklin dependentních kinas

Jedny z medicínsky významných látek jsou CKI, které jsou schopné zastavit buněčný cyklus v jeho kontrolní fázi a tím zamezit například rakovinnému bujení nebo jinému proliferativnímu onemocnění. Při studiu cytokininových derivátů byla objevena řada aktivních CKI, jako potenciálních léčiv. CKI je skupina strukturně rozmanitých molekul, které mají určité společné znaky. Jsou to nízkomolekulární látky, které se vážou

hydrofobními vazbami a vodíkovými můstky k CDK. Inhibují aktivitu CDK tím, že kompetují s ATP o ATP-vazebné místo na CDK (Hardcastle et al., 2002).

V současné době je studován jejich vliv na nervové buňky, a tudíž i jejich možný vliv na neurodegenerativní onemocnění jako je například Alzheimerova choroba, některé druhy sklerosy nebo třeba mrtvice (Patrick et al., 1999). Dále je studován vliv inhibitorů CDK na regulaci virových patogenů. Bylo zjištěno, že některé viry jsou schopny regulovat tvorbu a aktivaci CDK, což je potřebné pro replikaci buňky a tím i virových částic. Výhodou CKI při regulaci virového napadení je jejich přímé zacílení na buněčné cíle. Což má za následek tvorbu nerezistentních kmenů virů (Schang et al., 2001).

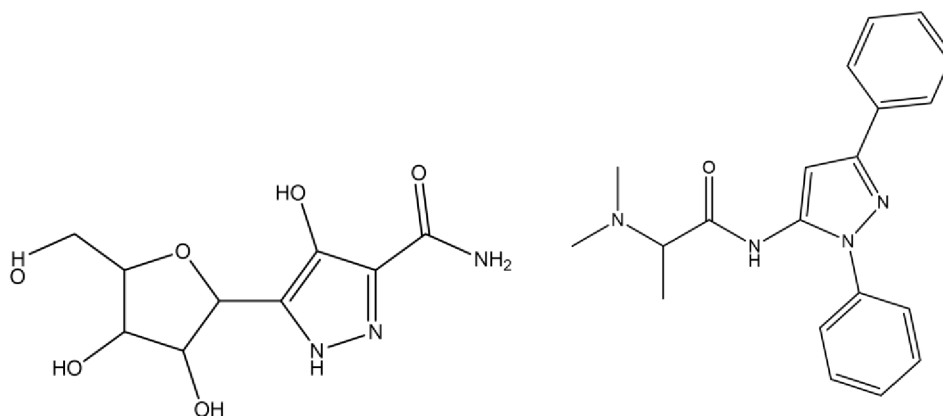
Jeden z prvních objevených CKI, pojmenovaný olomoucín, specificky blokuje CDK1, CDK2 a CDK5 kinasy a to již v mikromolárních koncentracích (Veselý et al., 1994). Při snaze zvýšit inhibiční aktivitu, byl vyvinut roskovitin, který je selektivnější vůči nádorovým buňkám a má i zvýšenou antimitotickou aktivitu (Havlíček et al., 1997) (Obrázek 7).



Obrázek 7: Struktura olomoucínu (vlevo) a roskovitinu (vpravo).

2.5 Využití pyrazolu jako motivu pro přípravu léčivých látek

V lékařství je věnována pozornost derivátům s pyrazolovou funkční skupinou, které lze využít i v dalších odvětvích, jako je technologie nebo zemědělství. Pyrazolové látky mají vysoký potenciál pro využití v medicíně. To je dáno jejich funkcí jako inhibitorů glykace proteinů. Výzkum pyrazolových léčiv se hojně rozšířil po objevu přírodního léčiva pyrazolového C-glykosidu Pyrazofurinu, který má ověřenou antimikrobiální a antivirotickou aktivitu (Comber et al., 1991) (Obrázek 8). Struktura pyrazolu se vyskytuje i v řadě dalších léčiv, jako jsou protizánětlivé léčiva Floxan a Difenamizol nebo protinádorové léčivo Pyrazomycin (Kumar et al., 2016; Alam et al., 2016). Dále byly mezi pyrazolovými deriváty látky s antibakteriální (Kumar et al., 2016), antimykotickou aktivitou (Ardiansah, 2017), antitumorózní aktivitou, antiflogistika, antituberkulózní a antioxidační vlastnosti (Ansari et al., 2017; Fustero et al., 2000). Antitumorózní aktivita byla studována na látkách s navázanou pyrazolovou strukturou již v dřívější studii Gucký et al., 2018. V této studii byly cytokininové deriváty testovány na lidských nádorových liniích MV4-11 (linie buněk myeloidní leukemie) a K562 (buňky linie chronické leukemie). V testech cytotoxicity bylo zjištěno, že řada z těchto strukturních derivátů mělo výrazné cytotoxické vlastnosti na vybraných nádorových liniích.



Obrázek 8: Vlevo: Chemická struktura pyrazofurinu. Vpravo: Chemická struktura difenamizolu.

2.6 Cytokininové biologické testy

Efekt cytokininů na jednotlivé fáze rostlinného vývoje může být hodnocen mnoha různými biotesty se specifickými parametry. Jedny z prvních popsanych biotestů hodnotí efekt cytokininů na klíčení semen ředkviček (Kuraishi a Okumura, 1956) a salátu (Miller, 1957). Další skupina testů posuzuje schopnost cytokininů aktivovat buněčné dělení, například na hypokotylech sóji (Manos a Goldthwaite, 1976, Newton 1980) nebo v mrkvi (Letham, 1967). Další typy biotestů posuzují vliv cytokininů na růst kotyledonů a byly popsány například v listech fazolí (Miller, 1963), dýni (Banerji a Loloraya, 1965), okurce (Narain a Loloraya, 1974) a ředkvičky (Letham 1971). Další typ biotestů popisuje schopnost tvorby pupenů a apikálního růstu v hrachu (Thimann a Sachs, 1966).

Jedním z biologických testů použitým v této diplomové práci pro určení biologické aktivity cytokininů je receptorový test. Rostlinné fytohormony cytokininy jsou detekovány rostlinou pomocí HK receptorů, které jsou lokalizovány na membráně. Cílem testu je ověření schopnosti cytokininů navázat se na membránový receptor a tím aktivovat specifickou signální dráhu. Byly identifikovány tři specifické receptory, které se využívají při receptorových testech cytokininů a to: *Arabidopsis* histidinová kinasa 2 (*Arabidopsis* histidin kinase 2, AHK2), *Arabidopsis* histidinová kinasa 3 (AHK3) a Cytokinine response (AHK4). Tyto receptory se liší svými biologickými i chemickými vlastnostmi. Všechny tři receptory obsahují část, která zasahuje do cytoplasmy, kde interagují s odpovědnými Histidin fosfotranferovými proteiny (AHP), které poté přenášejí signál do jádra. Dříve se vědci domnívali, že vazebná místa pro cytokininy jsou umístěny na plasmatické membráně, ale bylo zjištěno, že větší část vazebných míst pro cytokininy je umístěna na endomembránách endoplasmatického retikula (Wulfetange et al., 2011).

Dále se u cytokininů testuje jejich schopnost oddálit stárnutí listů. K senescenci listů dochází až v závěrečné fázi vývoje rostliny. Jedná se o postupnou degradaci a odumírání dané části rostliny, při které dochází ke změnám na buněčné úrovni, metabolismu, genové expresi i v detekci signálů z prostředí. Hlavním měřítkem při senescenčním biotestu je množství chlorofylu v listech. Při senescenci dochází ke zvýšenému rozkladu chlorofylu a degradaci listových proteinů, lipidů v membránách a RNA. Regulační dráhy rostlinných hormonů jsou propojeny v endogenní regulační síť, která řídí celý metabolismus a růst rostliny, včetně senescence rostlin. Cytokininy v této regulační dráze hrají roli při oddálení nástupu stárnutí. U *A. thaliana* bylo zjištěno, že

cytokininový receptor AHK3 hraje důležitou roli v regulaci cytokininem zprostředkované stárnutí listů (Holub et al., 1998).

Posledním cytokininovým biotestem využitým v této diplomové práci byl kalusový biotest. V tomto testu je využívána schopnost tvorby nediferenciovaného kalusu z pletivového vzorku rostliny. Samotnou tvorbu kalusu indukuje přítomnost cytokininů a auxinů v kultivačním mediu. V testu se poté hodnotí schopnost cytokininů nebo jejich derivátů indukovat množení buněk a následný růst kalusu (Van Staden a Drewes, 1991).

2.7 Cytotoxické testy na živočišných buňkách

Jedna z možností testování toxicity vytvořených látek na živé buňky je test redukce resazurinu. Resazurin se využívá jako indikátor chemické cytotoxicity a principem tohoto testu je redukce resazurinu na resorufin a dihydroresorufin pomocí metabolismu životaschopných buněk. Tato přeměna probíhá uvnitř buněk, kdy se na ni podílí oxidoreduktázy z mitochondrií nebo cytosolu. Změna barvy při redukci resazurinu se měří kolorimetricky nebo fluorimetricky. Resazurin je pro buňky netoxické barvivo, které je stabilní v kultivačním mediu. Při snížené proliferaci nebo zhoršení životaschopnosti buněk dochází ke snížení redukce resazurinu. Rychlost redukce barviva je přímo úměrná množství životaschopných buněk ve vzorku. Resazurin je světle modrá slabě fluorescenční látka, která se při redukci přemění na červeně fluorescenční resofurin (Anoopkumar-Dukie et al., 2005).

Dalším testem, který se využívá pro testování biologické aktivity látek je fluorometrický test cytotoxicity mikrokultury (fluorometric microculture cytotoxicity assay, FMCA). Jedná se o test sloužící pro určení cytotoxických vlastností studovaných látek na buněčné kultury. Buněčná kultura je vystavená studované látce v mikrotitrační destičce po dobu 2 dní, poté se hodnotí hustota živých buněk (Lindhagen et al., 2008). Dalším biologickým testem využívaným pro studium vlivu cytotoxicity studovaných látek nebo metabolické aktivity buněčných kultur je 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) test. Jedná se o kolorimetrický test určený pro vyhodnocení metabolické aktivity testovaných buněk. Metabolická aktivita a životaschopnost studovaných buněk se určuje podle míry redukce MTT na fialové krystaly formazanu. K tomu dochází v metabolicky aktivních buňkách pomocí NADPH závislých enzymů oxidoreduktas (Ghasemi et al., 2021).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Pro syntézu testovaných látek byly využity 4-(1H-pyrazol-1-yl) a diethylether anilin od firmy Merck Life Science spol. s r.o. Chemikálie 2,6-dichloro-9H-purin byl zakoupen od firmy Olchemim. Dále 2-fluoro-6-chloro-9H-purin, 2-fluoro-6-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin a 2,6-dichloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin byly připraveny na Katedře chemické biologie. NaCl, 1-propanol, metanol, chloroform byly zakoupeny od firmy Lach-ner s.r.o. Trimethylamin (TEA) a amoniak byly zakoupeny od firmy Penta s.r.o. Látky 2,3-dihydrofuran, ethylacetát a kyselina trifluoroctová byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich s.r.o.

3.2 Metody a přístrojová technika

Určení čistoty testovaných látek bylo provedeno na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) Beckman Gold Systém, přičemž byla využita kolona C18 Symetry, která měla průměr 2,1 mm a délky 150 mm s pórovitostí 5 μm . Jako mobilní fáze byl využit roztok MeOH:HCOONH₄ v poměru 1:9 s methanolvým gradientem 10 – 90 % 35 minut při pH 4 a průtoku 0,3 ml/min. Pro měření absorbance eluátu v oblasti UV byla využita vlnová délka 210 nm – 400 nm. Získaný eluát se separovanou látkou byl následně veden do hmotnostního spektrometru (MS) Waters Alliance 2695. Pro ionizaci vzorku byla využita ionizace elektrosprejem (ESI) při teplotě 120 °C, k desolvataci byla využita teplota 300 °C a dusík jako desolvatační plyn. Ionizace byla dosažena kapilárním napětím 3.0 kV a napětím na vstupní šterbině 20 V. Měření bylo prováděno pozitivním (ESI+) FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-850.

Ke stanovení syntetizovaných látek pomocí identifikace a porovnání vodíkového spektra ¹H byl využit NMR spektrometr - JEOL 500 ECA. Vzorky byly připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu-d₆ (DMSO-d₆).

Pro stanovení vzniklé látky po syntéze byla využita elementární analýza C, H, N pomocí analyzátoru Thermo Finnigan Flash EA1112.

3.3 Syntézy derivátů

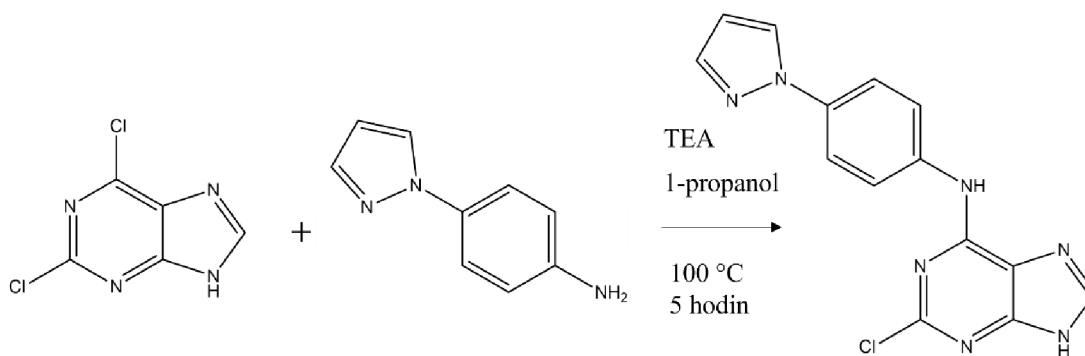
3.3.1 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9H-purin-6-amin (AM04)

Při této syntéze dochází k navázání 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilinu na 2,6-dichloro-9H-purin. Nejdříve bylo odváženo 1,13 g (1 ekv.) 2,6-dichloro-9H-purinu, který byl spolu s 1 g (1 ekv.) 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilinu rozpuštěn v 100 ml 1-propanolu. Reakce probíhala za přítomnosti bazického TEA o objemu 2,188 ml (2,5 ekv.). Reakční směs byla refluxována po dobu 5 hodin. Po dokončení reakce byla zkontrolována přítomnost produktu pomocí tenkovrstevné chromatografie (thin layer chromatography, TLC), kde jako mobilní fáze byl použit CHCl_3 : MeOH v poměru 9:1. Přečištění vzorku bylo zajištěno rekrystalizací v metanolu a následnou filtrací vzniklého krystalického produktu. (Obrázek 10)

Výtěžek: 1,23 g (66,3 %), HPLC: 98 %, Mr: 311,73

NMR: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 6.53 (t, $J=2,5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=1,5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J=8$ Hz, 2H), 8.32 (s, 1H), 8.44 (d, $J=2,5$, 1H), 10,35 (bs, 1H), 13.33 (bs, 1H)

EA (teoretická/ naměřená): C: (53,99 %/ 52,99 %), N (31,45 %/ 29,68 %), H (3,23 %/ 2,98 %)



Obrázek 10: Schéma syntézy N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9H-purin-6-aminu.

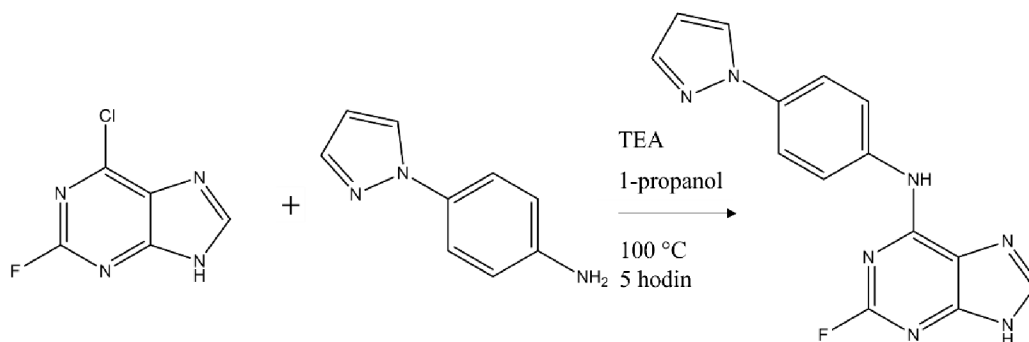
3.3.2 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-fluoro-6-chloro-9H-purin-6-amin (AM05)

Syntéza je založena na navázání 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilinu na komerčně dostupný 2-fluoro-6-chloro-9H-purin. Nejdříve bylo odváženo 1,08 (1 ekv.) g 2-fluoro-6-chloro-9H-purinu, který byl spolu s 1 g (1 ekv.) 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilinem rozpuštěn v 100 ml 1-propanolu. Reakce probíhala za přítomnosti bazického TEA o objemu 2,19 ml (2,5 ekv.). Reakční směs byla refluxována po dobu 5 hodin. Po dokončení reakce byla zkontrolována přítomnost produktu pomocí TLC, kde jako mobilní fáze byl použit CHCl_3 : MeOH v poměru 9:1. Pro využití v biologických testech je potřebná čistota produktu alespoň 97 %, čehož je docíleno následným přečištěním vzorku rekrytalizací v MeOH a následnou filtrací vzniklého krystalického produktu. (Obrázek 11)

Výtěžek: 1,19 g (61,7 %), HPLC: 100 %, Mr: 295,77

NMR: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 6.53 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.80 (d, J=9, 2H), 7.96 (d, J=9, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.44 (d, J=2, 1H), 10,43 (s, 1H), 13,30 (bs, 1H)

EA (teoretická/ naměřená): Nebylo změřeno z důvodu nedostatku vzorku.



Obrázek 11: Schéma syntézy N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-fluoro-6-chloro-9H-purin-6-aminu

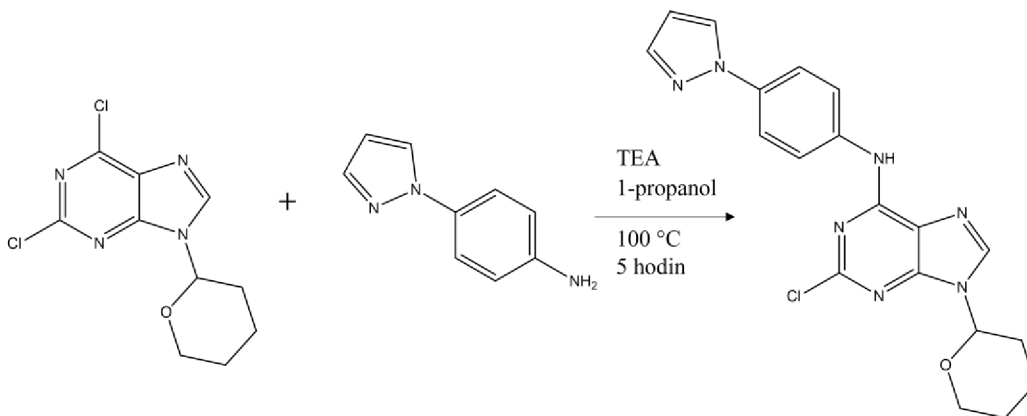
3.3.3 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM08)

Při této syntéze bylo rozpuštěno 270 mg (1 ekv.) 2,6-dichloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu ve 20 ml 1-propanolu. Do suspenze bylo dále přidáno 200 mg (1,2 ekv.) 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilinu. Reakce probíhala za přítomnosti 166,83 μ l (1,5 ekv.) bazického TEA. Reakční směs byla refluxována po dobu 5 hodin, a poté byla vložena do lednice. Po dokončení reakce byla zkontrolována přítomnost produktu pomocí TLC, kde jako mobilní fáze byl použit CHCl_3 : MeOH v poměru 9:1. Po zchlazení vznikly v reakční směsi krystaly produktu. Produkt byl přefiltrován a dosušen pomocí diethyletheru. (Obrázek 12)

Výtěžek: 166,3 mg (42,5 %), HPLC: 99 %, Mr: 395,85

NMR: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.36-1.44 (m, 1H), 1.58 (bs, 2H), 1.75 (bs, 1H), 1.92-2.02 (m, 2H), 3.66-3.75 (m, 1H), 4.00 (d, $J=11$ Hz, 1H), 5.63 (dd, $J=9,5$ Hz, 1H), 6.53 (t, $J=2$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=1,5$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J=9$ Hz, 2H), 8.45 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 8.57 (s, 1H), 10.50 (s, 1H)

EA (teoretická/ naměřená): C: (56,95 %/ 55,22 %), N (24,77 %/ 21,01 %), H (4,58 %/ 6,14 %)



Obrázek 12: Schéma syntézy N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-aminu

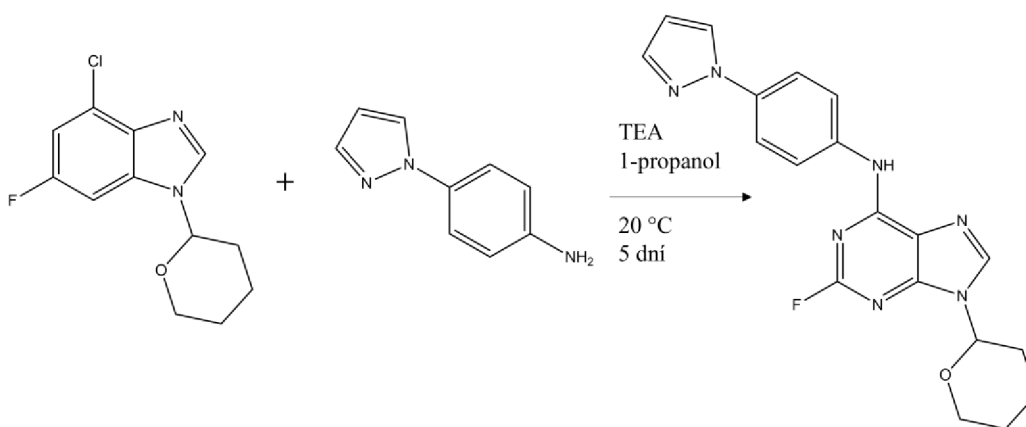
3.3.4 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM09)

Při této syntéze se navazuje 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilin na komerčně dostupný 2-fluoro-6-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin. Bylo naváženo 314 mg (1 ekv.) 2-fluoro-6-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu, který byl rozpuštěn v 15 ml 1-propanolu. Následně bylo přidáno 219 mg (1,2 ekv.) 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilinu a 228,36 μ l (1,5 ekv.) TEA. Reakce probíhala za pokojové teploty po dobu 5 dní. Po dokončení byla zkontrolována přítomnost produktu pomocí TLC, kde jako mobilní fáze byl použit CHCl_3 : MeOH v poměru 4:1. Rozpouštědlo bylo odpařeno a vzniklý gel byl rozpuštěn v ethylacetátu (EtAc) a následně extrahován vytřepáváním vodnou fází s přidaným vodným roztokem NaCl. Jelikož nebyla konverze výchozích látek úplná a v reakční směsi zůstala část výchozích látek, byl výsledný produkt přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHCl_3 :MeOH a gradientem 29:1 až 24:1. Výsledné frakce byly zakoncentrovány na rotační vakuové odparce. (Obrázek 13)

Výtěžek: 193,1 mg (41,6 %), HPLC: 100 %, Mr: 379,39

NMR: ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 1.28-1,43 (m, 1H), 1.27 (bs, 2H), 1.67-1.78 (m, 1H), 1.93-2.00 (m, 2H), 3.65-3.73 (m, 1H), 4.01 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 5.59 (dd, $J=9,5$ Hz, 1H), 6.53 (t, $J=2,5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=1$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J=9$ Hz, 2H), 8.45 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 10.55 (s, 1H)

EA (teoretická/ naměřená): C: (60,15 %/ 57,97 %), N (25,84 % /23,44 %), H (4,78 %/ 4,71 %)



Obrázek 13: Schéma syntézy N-(4-(1H-pyrazol-1-yl) fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-aminu

3.3.5 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM-12)

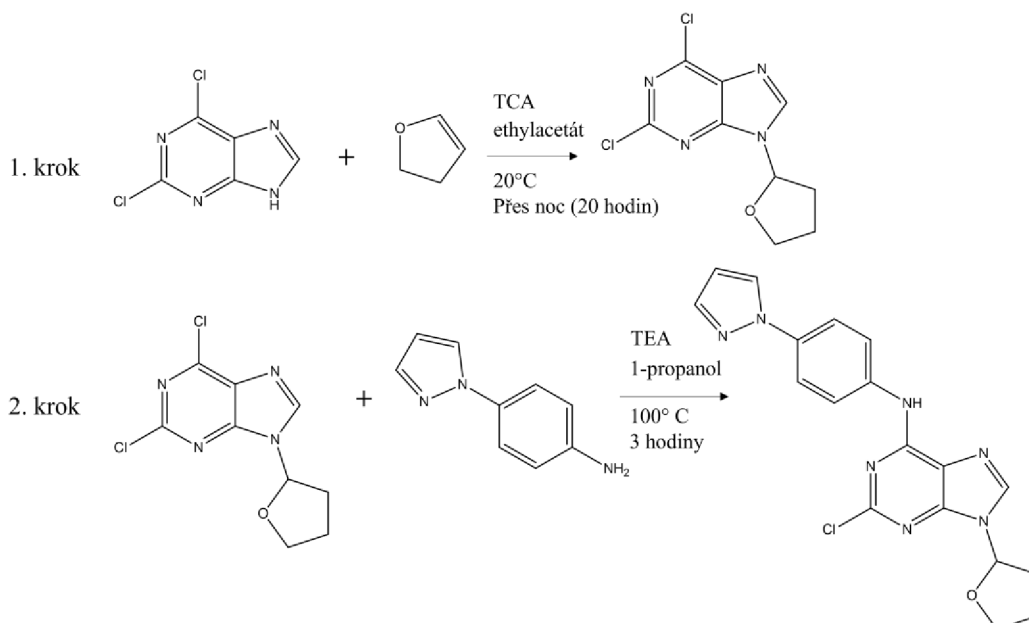
V prvním kroku syntézy se navazuje 2,3-dihydrofuran na komerčně dostupný 2,6-dichlorpurin za vzniku 2,6-dichloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu. Bylo naváženo 1,015 g (1 ekv.) 2,6-dichlorpurinu, který byl rozpuštěn v 15 ml EtAc. Poté se přidalo 0,845 ml (2,08 ekv.) 2,3-dihydrofuranu a 0,708 ml (1,85 ekv.) kyseliny trifluoroctové (TCA). Směs látek byla poté míchána přes noc za pokojové teploty, kdy vzniknul čirý žlutý roztok. Výsledná reakční směs byla upravena na pH 9,5 pomocí amoniaku a následně extrahována ze směsi vody a EtAc. Organická fáze byla odpařena a tím byl získán žádaný meziprodukt pro syntézu N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu-6-aminu.

Ve druhém kroku syntézy bylo smícháno 368 mg (1,2 ekv.) 4-(1H-pyrazol-1-yl)anilinu v 4,84 ml 1-propanolu. K roztoku bylo přidáno 0,5 g (1 ekv.) 2,6-dichloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 0,807 ml (3 ekv.) TEA. Směs byla refluxována po dobu 3 hodin. Po dokončení reakce byla zkontrolována přítomnost produktu pomocí TLC, kde jako mobilní fáze byl použit CHCl_3 : MeOH v poměru 9:1. Rozpouštědlo bylo odpařeno a vzniklý gel obsahující produkt syntézy byl rozpuštěn v EtAc a následně extrahován vytřepáváním vodnou fází s přidáním vodným roztokem NaCl. Po odpaření EtAc byl vzniklý gel s obsaženým finálním produktem přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHCl_3 :MeOH a gradientem 29:1 až 24:1. (Obrázek 14)

Výtěžek: 339,7 mg (46,1 %), HPLC: 99 %, Mr: 381,82

NMR: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.98-2.09 (m, 1H), 2.14-2.25 (m, 1H), 2.36-2.53 (m, 2H), 3.92 (q, J=7 Hz, 1H), 4.15 (q, J=7,5 Hz, 1H), 6.26 (t, J=5 Hz, 1H), 6.53 (t, J=2 Hz, 1H), 7.72 (d, J=2 Hz, 1H), 7.81 (d, J=9 Hz, 2H), 7.95 (d, J=9 Hz, 2H), 8.45 (t, J=3 Hz, 2H), 10.47 (s, 1H)

EA (teoretická/ naměřená): C: (56,62 %/ 52,57 %), N (25,68 %/ 23,5 %), H (4,22 %/ 4,49 %)



Obrázek 14: Schéma syntézy N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-chloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-aminu

3.3.6 N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-fluoro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-amin (AM13)

V prvním kroku syntézy se navazuje 2,3-dihydrofuran na komerčně dostupný 2-fluoro-6-chlorpurin za vzniku 2-fluoro-6-chloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu. Nejdříve byl navážen 1 g (1 ekv.) 2-fluoro-6-chlorpurinu, který byl rozpuštěn v 15 ml EtAc. Poté se přidalo 0,911 ml (2,08 ekv.) 2,3-dihydrofuranu a 0,82 ml (1,85 ekv.) TCA. Směs látek se poté nechala reagovat přes noc za pokojové teploty, kdy do druhého dne vznikne čirý žlutý roztok. Bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 9,5 pomocí amoniaku a roztok byl extrahován ve směsi voda/EtAc. Poté byl EtAc odpařen a tím byl získán žádaný meziprodukt pro syntézu N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-fluoro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-aminu.

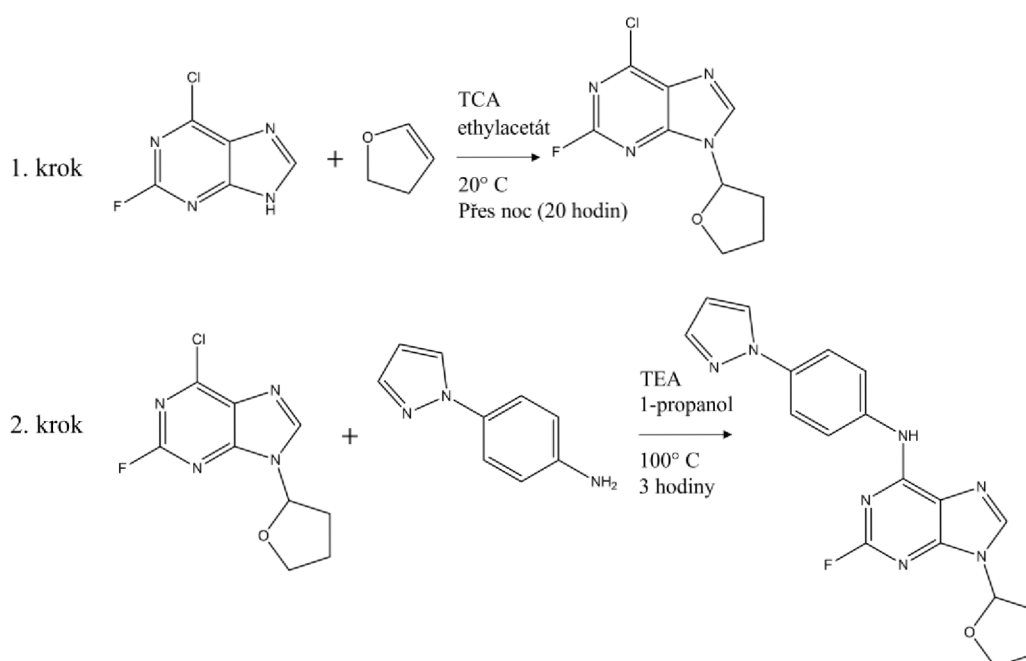
Ve druhém kroku syntézy bylo rozpuštěno 0,162 g (1,2 ekv.) 4-(1H-pyrazol-1-yl)anilinu v 5 ml 1-propanolu. K roztoku bylo přidáno 0,208 g (1 ekv.) 2-fluoro-6-chloro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 0,373 ml (3 ekv.) TEA. Směs byla refluxována po dobu 3 hodin. Po dokončení reakce byla zkontrolována přítomnost produktu pomocí TLC, kde jako mobilní fáze byl použit CHCl_3 : MeOH v poměru 9:1. Rozpouštědlo bylo odpařeno a vzniklý gel obsahující produkt syntézy byl rozpuštěn v EtAc a následně extrahován vytřepáváním vodnou fází s přidáním vodným roztokem NaCl. Po vysušení

EtAc byl vzniklý gel s obsaženým finálním produktem rozpuštěn v MeOH a následně rekrystalován. (Obrázek 15)

Výtěžek: 141,9 mg (45,3 %), HPLC: 99 %, Mr: 365,36

NMR: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.09 (d, $J=3$ Hz, 1H), 1.90 (s, 1H), 3.15 (d, $J=3,5$ Hz, 3H), 4.10 (d, $J=5$ Hz, 1H), 6.53 (t, $J=1,5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=1,5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J=9$ Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.44 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 10.42 (s, 1H), 13.30 (s, 1H)

EA (teoretická/ naměřená): Nebylo změřeno z důvodu nedostatku vzorku.



Obrázek 15: Schéma syntézy N-(4-(1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2-fluoro-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-aminu

3.4 Biologické testy

3.4.1 Testy senescence

Nejdříve byly připraveny 7-denní obilky pšenice ozimé (*Triticum aestivum* L. cv. Hereward), které klíčily v inkubátoru na živném Hoaglandově roztoku. Vyvinuté primární listy byly odstříhávány a po třech listech odváženy na analytických vahách tak, aby každá trojice vážila 100 g. Jednotlivé trojice byly zasunuty do jamek 96-jamkové destičky jejich bazálními konci, kde bylo odměřeno 150 μ l testované látky. Vzorky byly uloženy do vlhké komůrky a inkubovány po dobu 96 hodin při 25 °C. Po inkubaci byly listy přesunuty do kádinek s 5 ml 80 % ethanolu, ve kterých byly na 10 minut vloženy do 80 °C vodní lázně, což způsobilo extrakci chlorofylu. Po vychlazení roztoku ethanolu byly vyjmuty z roztoků listy a do nové 96-jamkové destičky byly napipetovány vzorky extrahovaného chlorofylu. V jednotlivých jamkách byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru Tecan Sunrise při vlnové délce 665 nm. Hodnoty byly porovnány s referenční hodnotou tZ.

3.4.2 Receptorový test

Nejdříve bylo do sterilní 6-jamkové desky napipetováno po 3 ml předem připraveného M9 media. Do každé jamky byly přidány 3 μ l antibiotika ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml a 6 μ l bakteriální pre-kultury *E. coli* KMI001-pINIII:AHK4. Připravené pre-kultury se nechaly kultivovat 17 hodin do thermomixeru při 300 rpm a teplotě 25 °C.

Po kultivaci byla kultura *E. coli* naředěna s novým M9 médiem a ampicilinem (o koncentraci 100 mg/ml) a následně byla rozpipetována a do 96-jamkové destičky. Poté byly k připraveným kulturám přidány testované látky a standart (tZ) tak, aby vznikla koncentrační řada testovaných látek o koncentracích 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M a 50 μ M. Vzorky byly kultivovány 17 hodin v kultivované třepačce (při 450 rpm) při 25 °C.

Po uplynutí kultivace byla stanovena aktivita β -galaktosidasy. Ke každému vzorku bylo přidáno 2 μ l 25 mM 4-methylumbelliferyl galaktosid (MUG) jako fluorogenní substrát pro β -galaktosidasu. Po 10 minutách byla reakce zastavena pomocí Stop pufru (glycin uhličitanový pufr) a byla změřena fluorescence při excitační/ emisní vlnové délce 365/ 460 nm.

3.4.3 Kalusový test

Při kalusovém biotestu je hodnocen růst kalusu po aplikaci testovaných látek ve srovnání se standardem BAP. Testované látky jsou přidány do kultivačního média a nárůst kalusů je hodnocen po 14 dnech. Hmotnost kalusů s testovanými látkami se srovnává s hmotností kalusu s aplikovaným standardem, který odpovídá hodnotě 100 %.

3.4.4 Cytotoxicita na buňky nádorových linií

Test cytotoxicity probíhal na lidské buněčné kultuře MV4-11. Jedná se o makrofágové buňky získané z kmenových buněk dětí trpící bifenotypickou B-myelomonocytickou leukémií. Dále byly látky testovány na buněčné kultuře K562, což je kultura z lidských buněk zasažených myeloidní leukémií. Poslední testovanou buněčnou kulturou je lidská buněčná linie z karcinomu prsu MCF-7. Kultura MV4-11 byla pěstována na médiu RPMI-1640 a kultury K562 a MCF-7 byly kultivovány na médiu DMEM. Do obou typů medií bylo přidáno 10 % fetální bovinní sérum, penicilin (100 U/ ml) a streptomycin (100 µg/ ml).

Při testu cytotoxicity byly buňky kultivovány v 96-jamkové destičce v hustotě 5000 buněk/ jamku. Ke všem třem typům buněčných kultur byly na 72 hodin ve vzrůstající koncentrační řadě přidány testované látky. Následné vyhodnocení probíhalo přidáním Resazurinu a měřením fluorescence vzniklého Resofurinu v emisní/ excitační vlnové délce 544/ 590 nm.

3.4.5 Cytotoxicita na buňky epitelu oka

Cytotoxicity připravených látek na nenádorové lidské buňky byla hodnocena na ARPE19 (buňky pigmentového epitelu sítnice oka). Buňky pocházejí z American Type Culture collection, Manassas, VA, USA. Účinky byly stanoveny pomocí 72 h ošetření testovanými sloučeninami, kdy byla sledována životaschopnost buněk pomocí testu redukce resazurinu, který stanovuje metabolickou aktivitu buněčné populace. Buňky byly udržovány ve standardním DMEM/ F12 médiu doplněném fetálním hovězím sérem (FBS) (10 %), glutaminem (2 mmol), penicilem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ ml) za standardních podmínek buněčné kultivace (37 °C, 5 % CO₂, vlhké prostředí). Buňky byly subkultivovány třikrát týdně. Pro zhodnocení toxicity byly buňky tripsinizovány a zředěny v médiu DMEM/ F12 s 10 % FBS. Buňky v kultivačním médiu

byly nasazeny do 96-jamkové destičky. Velikost inokula byla 5000 buněk. Po 24 hodinách inkubace byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami rozpuštěnými v 20 μ l kultivačního media. Byly testovány série ředění 6 koncentrací, každá ve třech opakováních. Maximální koncentrace a ředění byly upraveny pro jednotlivé sloučeniny, takže získané naměřené hodnoty umožňovaly výpočet koncentrace IC 50 pro toxické sloučeniny. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO. Po 72 hodinách bylo k buňkám přidáno 10 μ l roztoku resazurinu v kultivačním mediu. Fluorescence byla měřena po 2 hodinách pomocí čtečky M2 (Biotech). Každý experiment byl opakován dvakrát.

4. VÝSLEDKY

4.1 Rozpustnost testovaných látek

Byla testována rozpustnost testovaných látek ve vodném roztoku pomocí turbidometru TurbiCheck WL (Lovibond®, Německo), který pracuje v rozsahu měření: 0,01-1100 NTU. Při měření je použito bílé světlo a detekce rozptýleného světla pod úhlem 90°. Tento test je založen na průchodu světla měří-li se intenzita světla procházejícího vzorkem v původním směru. Ze změřeného rozdílu paprsku světla po průchodu vzorkem byla určena míra zákalu. Jako blank byla využita čistá voda.

Do 9980 μ L destilované vody bylo napipetováno 20 μ L 50 mM roztoku testované látky a poté byl změřen zákal. Roztoky byly ponechány za laboratorní teploty dva dny a poté bylo znova změřeno množství zákalu. Nejvíce rozpustná byla látka AM-09 a AM-12, nejméně rozpustná byla naopak látka AM-04.

Tabulka 1: Rozpustnost testovaných látek měřená turbidometricky.

Látka	Míra zákalu (NTU)
AM-04	46,605
AM-05	5,595
AM-08	12,685
AM-09	0,1
AM-12	1,05
AM-13	18,29

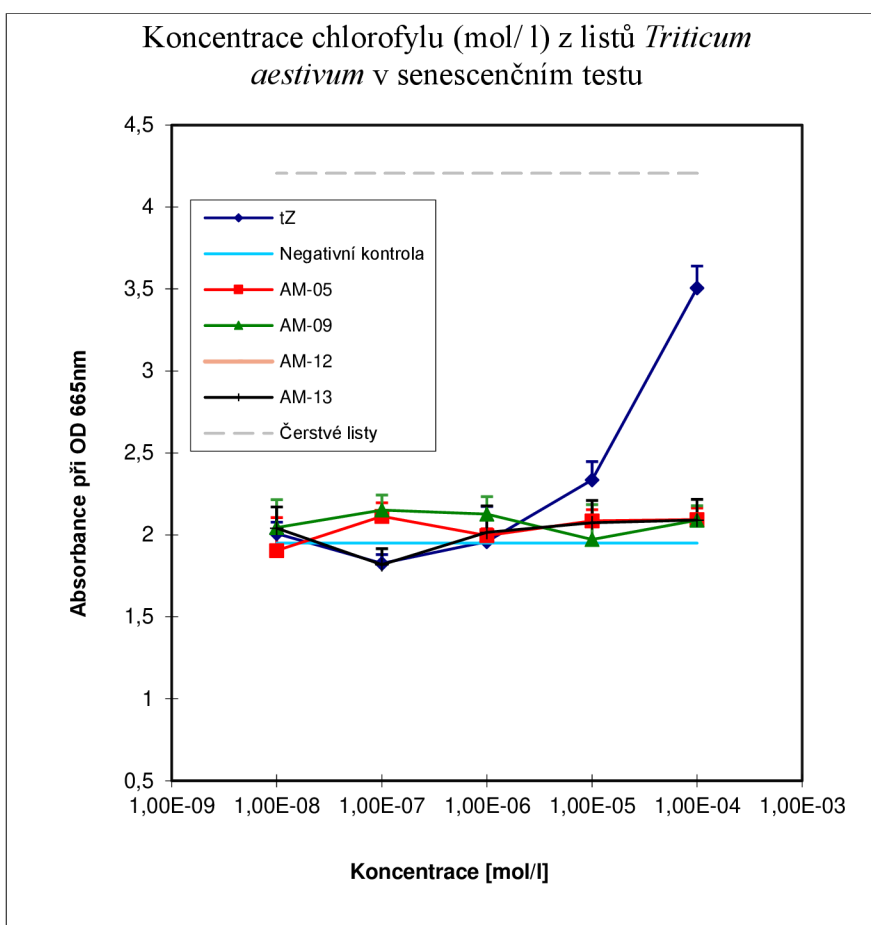
4.2 Biologické testy

4.2.1 Test senescence

Byl proveden test senescence na čtyřech testovaných látkách (AM-05, AM-09, AM-12 a AM-13). Zbylé dvě látky (AM-04 a AM-08) nebyly rozpustné ve vodě, a tudíž nemohly být otestovány. U žádné z testovaných látek hodnota antisenescenční aktivity nedosáhla hodnoty referenčního vzorku. (Tabulka 2, Graf 1)

Tabulka 2: Výsledky měření relativních aktivit testu senescence u testovaných látek. Naměřené hodnoty udávají míru zpomalení degradace chlorofylu. Měření antisenescenční aktivity bylo prováděno ve dvou opakováních. Jako referenční vzorek byl využit tZ (100 %).

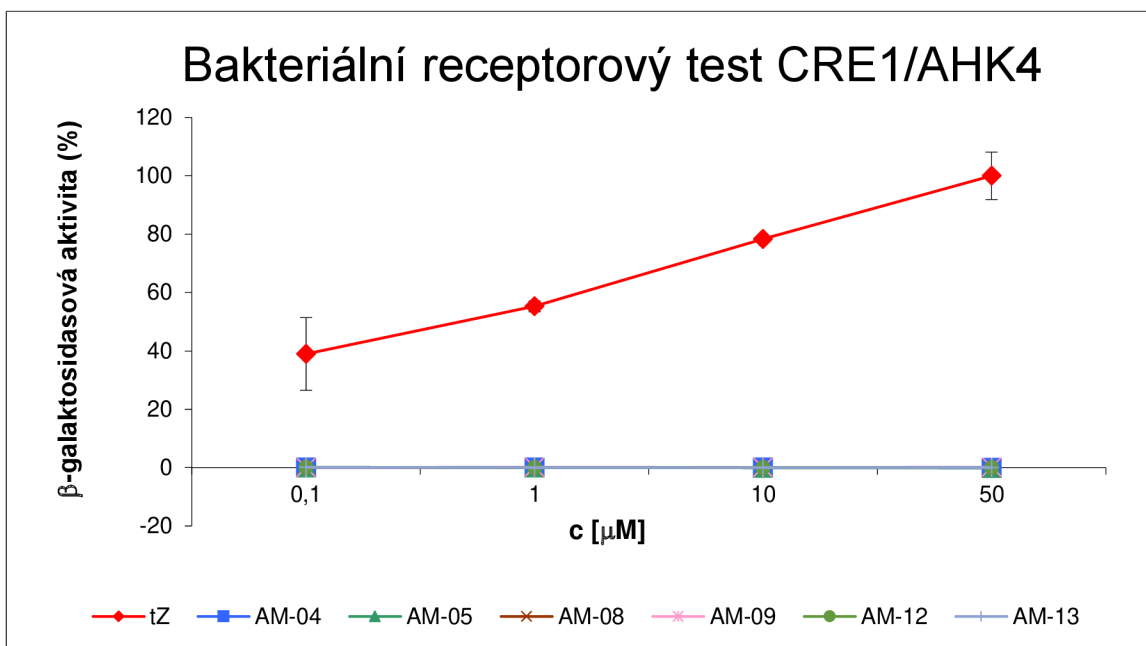
Látka	Optimální koncentrace	Relativní aktivita
AM05	10^{-7}	11 (± 1)
AM09	10^{-7}	13 (± 1)
AM-12	10^{-5}	12 (± 1)
AM13	10^{-4}	9 (± 1)



Graf 1: Měření koncentrace chlorofylu (mol/l) z listů *Triticum aestivum* v senescenčním testu. Jako pozitivní kontrola sloužil tZ, negativní kontrola destilovaná voda. Absorbance měřena spektrofotometrem při vlnové délce 665 nm. Modrá křivka značí pozitivní kontrolu tZ.

4.2.2 Receptorový test

Při receptorovém testu byla měřena schopnost navázání testovaných látek k histidinovému receptoru AHK4. Při měření aktivace enzymu β -galaktosidasy pomocí MUG bylo zjištěno, že testované látky, ve srovnání se standardem tZ, nemají detekovanou žádnou vazebnou schopnost na AHK4. (Graf 2)



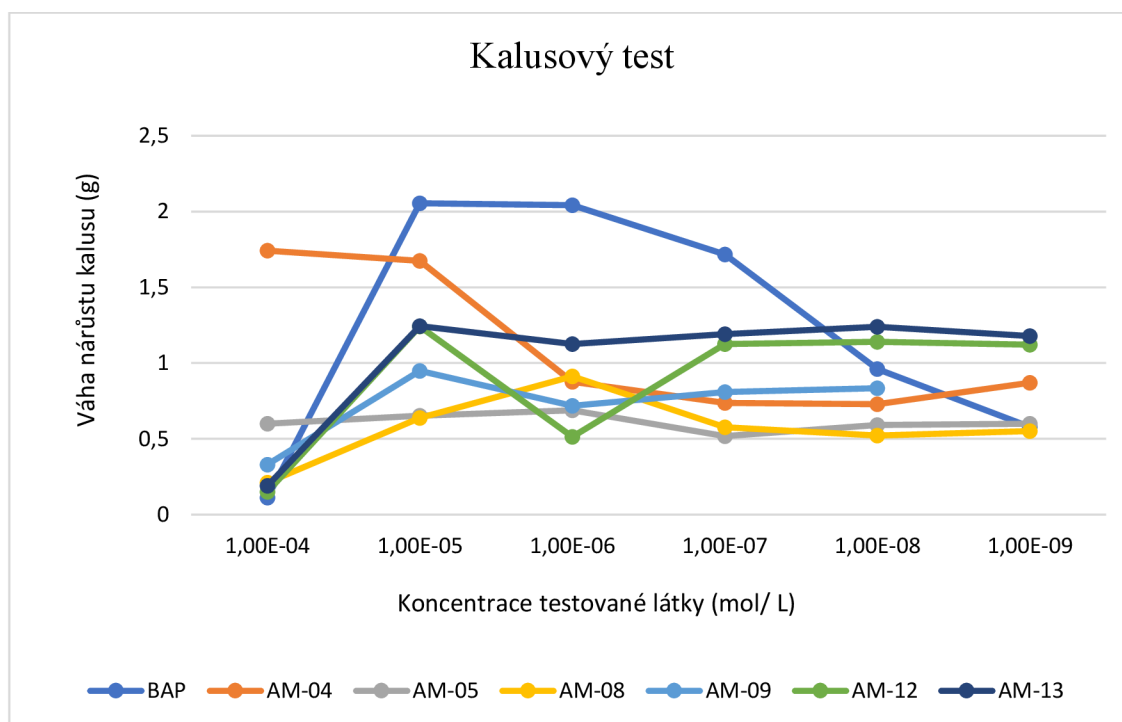
Graf 2: Měření aktivity β -galaktosidasy v receptorovém testu CRE1/ AHK4. Aktivita vyvolaná testovanými látkami je porovnávána s aktivitou tZ jako standardu.

4.2.3 Kalusový test

Při kalusovém testu byl studován vliv testovaných látek na růst kalusu. Růst kalusu byl srovnávám při aplikaci testovaných látek v různých koncentracích. Aktivita testovaných látek byla porovnáována se standardem BAP (100 %). (viz Tabulka 3, Graf 3)

Tabulka 3: Vyhodnocení kalusového biotestu. Srovnání relativní aktivity hodnocené podle nárůstu hmotnosti kalusu ve srovnání se standardem BAP (100 %). Hodnoty optimální koncentrace testovaných látek koncentraci, při které došlo k nejvyšší relativní cytokininové aktivitě. Měření bylo provedeno ve dvou opakování, výsledky jsou průměr z těchto měření.

Látka	Optimální koncentrace	Relativní aktivita
AM04	10^{-4}	75 (± 3)
AM05	10^{-6}	4 (± 1)
AM08	10^{-6}	15 (± 2)
AM09	10^{-5}	22 (± 4)
AM-12	10^{-5}	38 (± 10)
AM13	10^{-5}	39 (± 5)



Graf 3: Vyhodnocení kalusového biotestu. Srovnání nárůstu hmotnosti kalusů (g) po 14 dnech od aplikace testovaných látek. Jako pozitivní kontrola sloužil BAP, značená modrou křivkou.

4.2.4 Test cytotoxicity

U syntetizovaných látek byla testována cytotoxicita na buňkách lidských liniích K562, MCF7 a MV4-11. Látky AM-08, AM-09 a AM-12 nebylo možné rozpustit ve vodném roztoku na koncentraci vyšší než 12,5 μM . Nebyl sledován žádný vliv testovaných látek na buněčné kultury K562 a MCF7. Pozorovaný účinek byl pouze na buňky kultury MV4-11. Nejúčinnější látka byla AM-12, kde byla detekována nízká míra toxicity.

Tabulka 4: Výsledky testování cytotoxicity testovaných látek pomocí resazurinového testu na nádorových buněčných liniích.

Testovaná látka	Buněčné kultury			
	K562 GI ₅₀ [μM]	MCF7 GI ₅₀ [μM]	MV4-11 GI ₅₀ [μM]	
			Průměr	SMOD
AM-04	>25,0	>25,0	>25,0	
AM-05	>50,0	>50,0	>50,0	
AM-08	>12,5	>12,5	10,45	1,68
AM-09	>12,5	>12,5	11,08	2,05
AM-12	>12,5	>12,5	5,13	1,40
AM-13	>50,0	>50,0	>50,0	

4.2.5 Cytotoxicita na buňkách ARPE-19

U všech připravených látek byla zjišťována cytotoxicita na buňkách epitelu oční sítnice ARPE-19 pomocí resazurinového testu. Látky byly testovány v 6 různých koncentracích, avšak ani při nejvyšší koncentraci 50 μM / L nebyl u žádné z připravených látek zjištěn cytotoxický efekt. Z naměřených hodnot IC 50 tedy vyplývá, že žádná z testovaných látek nemá cytotoxické vlastnosti proti tomuto typu buněčných linií.

DISKUZE

Diplomová práce byla zaměřená na syntézu disubstituovaných a trisubstituovaných derivátů cytokininů a jejich následné testování biologické aktivity. Příprava derivátů probíhala dle protokolů strukturně podobných látek dle literatury Gucký et al., 2013. Deriváty s navázaným chlorem na uhlíku C2 měly vyšší míru konverze oproti derivátům s navázaným fluorem na stejné pozici. Fluoroderiváty proto musely být přečišťovány rekrystalizací nebo separací produktu chromatografií na koloně.

Pro ověření průběhu syntézy a míry konverze výchozích látek byla nejdříve využita HPLC/MS, která určila procentuální zastoupení složek v reakční směsi po syntéze a jejich molekulové hmotnosti. Poté byla využita NMR, pomocí které byla potvrzena struktura připravených derivátů. Za stejným účelem byla využita EA, která určovala procentuální zastoupení atomů C, N a H. Z důvodu nedostatečného množství syntetizovaných látek nebyla EA změřena pro všechny.

Následně byla testována biologická aktivita syntetizovaných látek na rostlinných vzorcích, a to pomocí testu senescence, receptorového testu a kalusového testu. V žádném z cytokininových testů aktivita ani jedné z testovaných látek nedosáhla aktivity referenčního vzorku. V případě receptorového testu látky neaktivují cytokininový receptor AHK4.

Připravené látky byly testovány na cytotoxické vlastnosti na lidských buněčných liniích. Nejdříve byla otestována cytotoxicita látek na nádorových liniích, to konkrétně na liniích K562, MCF7 a MV4-11. U tohoto testu měla zvýšené cytotoxické vlastnosti látka AM-12. V následném testu byla hodnocena cytotoxicita na nenádorových buňkách ARPE-19, ve kterém se ani jedna z látek nejevila jako toxická.

Vybraný strukturní motiv syntetizovaných látek vychází z již dříve připravených a otestovaných látek ze studie Gucký et al., 2013, které byly vyhodnoceny jako cytotoxické vůči buněčným kulturám chronické i akutní leukemie. Strukturně byl základní skelet adeninu ve výše zmíněné studii substituován, stejně jako v této diplomové práci, v pozicích uhlíku C2, C6 a dusíku N9. Na pozici uhlíku C2 byl navázán aminoskupina (-NH₂), na kterou byly následně navazovány další strukturní motivy. Oproti tomu v rámci této diplomové práce byly připraveny deriváty s atomem halogenu na pozici C2. Další pozicí substituce byl uhlík C6, na který byl navazován 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilin. V původní studii Gucký et al., 2013 byl C6 substituent prodloužen přes jeden uhlíkový můstek, což může být jedním z důvodů nižší aktivity námi připravených látek.

Takto připravené volné báze byly dále substituovány na pozici N9 tetrahydropyranem nebo tetrahydrofuranem, který dle několika dosud publikovaných studií (Szučová et al., 2009, významně ovlivňuje biologickou aktivitu cytokininových derivátů.

V rámci studia Gucký et al., 2013 byly studovány cytotoxické vlastnosti na nádorových buněčných liniích. Pro dané látky nebyla zkoumána specifčnost toxicity na nenádorové buňky. V rámci diplomové práce byla u jedné z látek (AM-12) detekována nižší míra cytotoxicity na nádorové buňky (v porovnání s cytotoxickými vlastnostmi látek ze studie Gucký et al., 2013), ale vůči buněčným liniím nenádorových buněk nebyla zjištěna toxicita. Úpravou strukturního motivu by mohla být zvýšena cytotoxicita vůči nádorovým buňkám a tím by strukturní motiv AM-12 mohl být výchozím bodem dalších studií antitumorové aktivity.

Za účelem zvýšení cytotoxicity na specifických nádorových liniích je častým substituentem na pozici C2 amino skupina, přes kterou mohou být následně navázány další strukturní motivy. Obvykle jsou však tyto struktury nesespecificky toxické i vůči nenádorovým buňkám. Dalším strukturním motivem, který v mnoha případech antitumorovou aktivitu je ribosa navázaná na N9 pozici. V této pozici byla v diplomové práci navázán THP nebo THF, které prokazatelně zvyšují biologickou aktivitu cytokininových derivátů (Doležal et al., 2007; Voller et al., 2010; Voller et al., 2017).

Závěr

V rámci diplomové práce bylo syntetizováno šest cytokininových derivátů. Deriváty AM-04 a AM-05 byly substituovány na pozicích C2 a C6, kdy u derivátu AM-04 byl v pozici C2 navázán chlor a u AM-05 fluor. Na pozici C6 byl stejně jako u všech dalších derivátů navázán 4-(1H-pyrazol-1-yl) anilin. Zbylé čtyři deriváty byly kromě pozic C2 a C6 substituovány i na pozici N9, a to pomocí THP nebo THF. Strukturní motiv derivátu AM-08 obsahoval chlor a THP, AM-09 fluor a THP, AM-12 chlor a THF a následně AM-13 obsahující fluor a THF.

Všech šest vytvořených látek bylo analyzováno fyzikálně-chemickými metodami, a to HPLC/MS, NMR a EA. Pomocí těchto metod byla potvrzena jejich struktura a čistota nezbytná pro další biologické testování.

Všechny připravené deriváty byly následně testovány jak v rostlinných cytokininových biotestech, tak i na nádorových a nenádorových živočišných buněčných liniích. V rostlinných testech byla zjišťována antisenescenční aktivita, schopnost vazby syntetizovaných látek na receptor AHK4 a vliv na růst kalusu. Ani u jedné z testovaných látek však nebyla detekována cytokininová aktivita.

V případě testování cytotoxických vlastností připravených derivátů nebyla u testovaných látek zjištěna významná cytotoxicita vůči použitým buněčným liniím.

I přes neprokázanou biologickou aktivitu derivátů připravených v rámci této diplomové práce, by tyto sloučeniny mohly sloužit jako základ pro další studium zmiňované skupiny cytokininových derivátů. Dalším postupem pro zvýšení antitumorové aktivity by mohlo být navázání amino-skupiny do pozice C2 nebo tvorby ribosidu daného cytokininu s cytotoxickými vlastnostmi (AM-12). Případně by mohlo zvýšit toxicitu využití pyrazolového substituentu na pozici C6, který bude mít řetězec před pyrazolem o jeden uhlík delší.

Použitá literatura

Akhtar, S. S., Mekureyaw, M. F., Pandey, C., & Roitsch, T. (2020). Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>

Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* *81*:5994–5998, <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.5994>

Al-Hiari, Y. M., Qaisi, A. M., El-Abadelah, M. M., Voelter, W. (2006): Synthesis and antibacterial activity of some substituted 3-(aryl)-and 3-(heteroaryl) indoles. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, *137*, 243-248. DOI 10.1007/s00706-005-0424-6

Alam, R., Wahi, D., Singh, R., Sinha, D., Tandon, V., Grover, A. (2016): Design, synthesis, cytotoxicity, HuTopoII α inhibitory activity and molecular docking studies of pyrazole derivatives as potential anticancer agents. *Bioorganic Chemistry*, *69*, 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.10.001>

An, S., Cha, H. J., Ko, J. M., Han, H., Kim, S. Y., Kim, K. S., Kim, S. Y. et al. (2017): Kinetin improves barrier function of the skin by modulating keratinocyte differentiation markers. *Annals of Dermatology*, *29*(1), 6-12. doi: 10.5021/ad.2017.29.1.6

Angra-Sharma R., Mandahar C. L. (1993): Involvement of carbohydrates and cytokinins in pathogenicity of *Helminthosporium carbonum*. *Mycopathologia* *121*, 91–99. [10.1007/BF01103576](https://doi.org/10.1007/BF01103576)

Anoopkumar-Dukie S., Carey J. B., Conere T., O'sullivan E., van Pelt F. N., Allshire A. (2005): Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol.* 2005 Oct; *78*(934):945-7. doi: 10.1259/bjr/54004230. PMID: 16177019.

Ansari, A.; Ali, A.; Asif, M. (2017): Biologically active pyrazole derivatives. *New J. Chem.* 2017, *41*, 16–41

Ardiansah, B. A. Y. U. (2017): Recent reports on pyrazole-based bioactive compounds as candidate for anticancer agents. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* *12*, 45. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i12.22065>

Aremu, A. O., Fawole, O. A., Makunga, N. P., Masondo, N. A., Moyo, M., Buthelezi, N. M., Doležal, K. et al. (2020): Applications of cytokinins in horticultural fruit crops:

Trends and future prospects. *Biomolecules*, 10(9), 1222.
<https://doi.org/10.3390/biom10091222>

Banerji, D., and Laloraya, M. M. (1965): Expansion of isolated pumpkin cotyledons with kinetin: Effect of seedling age. *Die Naturwissenschaften*, 12, 349–350. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

Bekhit, A. A., Ashour, H. M., Guemei, A. A. (2005): Novel Pyrazole Derivatives as Potential Promising Anti-inflammatory Antimicrobial Agents. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 338(4), 167-174. <https://doi.org/10.1002/ardp.200400940>

Brian, P. W., Hemming, H. G. (1955): The effect of gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. *Physiologia Plantarum*, 1955, Vol. 8, No. 3, 669-81 ref. bibl. 10

Bryksová, M., Dabravolski, S., Kučerová, Z., Zavadil Kokáš, F., Špundová, M., Plíhalová, L., Doležal, K. et al. (2020): Aromatic cytokinin arabinosides promote PAMP-like responses and positively regulate leaf longevity. *ACS Chemical Biology*, 15(7), 1949-1963. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00306>

Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K. Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*. 1993 Nov 12;262(5136):1051-4. doi: 10.1126/science.8235622. PMID: 8235622.

Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Frommer, W. B. et al. (2003): Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 34(1), 13-26., <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01700.x>

Chadwick, A. V., Burg, S. P. (1967): An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, 42(3), 415-420., <https://doi.org/10.1104/pp.42.3.415>

Comber, R. N., Gray, R. J., & Secrist III, J. A. (1992). Acyclic analogues of pyrazofurin: syntheses and antiviral evaluation. *Carbohydrate research*, 216, 441-452., [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(92\)84179-V](https://doi.org/10.1016/0008-6215(92)84179-V)

Davies, P. (2010): *Plant Hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!*. Springer, Netherlands. Dordrecht. Doi: 10.1007/978-1-4020-2686-7_1

- Darise, R. H., Guniarti, G., Triani, N. (2023): The effect of plant mediums and IAA plant growth regulator concentrations on the growth of cajuput (*Melaleuca cajuputi*) shoot cuttings, *Agro Bali: Agricultural Journal*, 2023, Vol. 6, No. 1, 129-140 ref. 30 ref., DOI: 10.37637/ab.v6i1.1120
- Debergh, P.C., Read, P.E. (1991). Micropropagation. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds) *Micropropagation*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_1.
- Devi, K., Gogoi, M. B., Singh, S., Sarmah, B. K., Modi, M. K., & Sen, P. (2017). In vitro regeneration of banana and assessment of genetic fidelity in the regenerated plantlets through RAPD. *Annual Research & Review in Biology*, 17(6), 1-11., <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/36339>
- Di Benedetto A., Galmarini C., Tognetti J. (2015): Effects of combined or single exogenous auxin and/or cytokinin applications on growth and leaf area development in *Epipremnum aureum*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2015;90:643–654. doi: 10.1080/14620316.2015.11668727.
- Du, M., Zhai, Q., Deng, L., Li, S., Li, H., Yan, L., Li, C. et al. (2014): Closely related NAC transcription factors of tomato differentially regulate stomatal closure and reopening during pathogen attack. *The Plant Cell*, 26(7), 3167-3184., <https://doi.org/10.1105/tpc.114.128272>
- Dunphy, W.G. (1994): The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol* 4:202– 207, [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90142-2](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90142-2) PMID: 14731678
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M., (1999): Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems, *Science*, 1999, vol. 283, pp. 1911–1914., DOI: 10.1126/science.283.5409.1911
- Fratini, R., Ruiz, M. L. (2002): Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38, 46-51., <https://doi.org/10.1079/IVP2001252>
- Fustero, S.; Sánchez-Roselló, M.; Barrio, P.; Simón-Fuentes, A. (2011): From 2000 to Mid-2010: A fruitful decade for the synthesis of pyrazoles. *Chem. Rev.* 2011, 111, 6984–7034., <https://doi.org/10.1021/cr2000459>

Gavet, O., Pines, J. (2010): Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 247-259., <https://doi.org/10.1083/jcb.200909144>

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. (2021): The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827. PMID: 34884632; PMCID: PMC8657538.

Grana, X., Reddy, E.P. (1995): Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Blood*. 1995, II. 211-219

Grobkinsky D.K., Naseem M., Abdelmohsen U.R., Plickert N., Engelke T., Griebel T., Zeier J., Novák O., Strnad M., Pfeifhofer H., et al. Cytokinins mediate activity against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiol*. 2011;157:815–830. doi: 10.1104/pp.111.182931.

Grobkinsky DK, Edelsbrunner K, Pfeifhofer H, van der Graaff E, Roitsch T. Cis- and trans-zeatin differentially modulate plant immunity. *Plant Signal Behav*. 2013 Jul;8(7):e24798. doi: 10.4161/psb.24798. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23656869; PMCID: PMC3906432.

Guo, Y., Gan, S. (2005): Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Current topics in developmental biology*, 71, 83-112., [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)71003-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)71003-6)

Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.S. Cytokinins: Metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci*. 2012;17:172–179. doi: 10.1016/j.tplants.2011.12.005.

Hamill, J. D. (1993): Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: a review. *Functional Plant Biology*, 20(5), 405-423., <https://doi.org/10.1071/PP9930405>

Hardcastle IR, Golding BT, Griffin RJ. Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:325-48. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.090601.125940. PMID: 11807175.

Hare, P.D. and van Staden, J. (1994), Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, 91: 128-136. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00668.x>

Havlicek, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 40(4), 408-412, <https://doi.org/10.1021/jm960666x>

Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D. E., & Strnad, M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from ortho-and meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*, 26, 109-115, <https://doi.org/10.1023/A:1006192619432>

Hönig M, Plíhalová L, Husičková A, Nisler J, Doležal K. (2018): Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 14;19(12):4045. doi: 10.3390/ijms19124045. PMID: 30558142; PMCID: PMC6321018.

Horgan, R., Hewett, E. W., Horgan, J. M., Purse, J., & Wareing, P. F. (1975): A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry*, 14(4), 1005-1008, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85176-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85176-4).

Horowitz, J. M., Park, S. H., Bogenmann, E., Cheng, J. C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., Weinberg, R. A. et al. (1990): Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2775-2779, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2775>

Huai, B., Yang, Q., Qian, Y., Qian, W., Kang, Z., & Liu, J. (2019): ABA-induced sugar transporter TaSTP6 promotes wheat susceptibility to stripe rust. *Plant Physiology*, 181(3), 1328-1343, <https://doi.org/10.1104/pp.19.00632>

Hutchison C.E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., et al. (2006): The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 18:3073–87, <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045674>

- Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., & Czerpak, R. (2016): N6-benzyladenine and kinetin influence antioxidative stress parameters in human skin fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry*, 413, 97-107, <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2642-5>
- Ji, C., Yang, Y., Yang, B., Xia, J., Sun, W., Su, Z., Bi, Z. et al. (2010): Trans-Zeatin attenuates ultraviolet induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. *International journal of molecular medicine*, 26(2), 257-263, https://doi.org/10.3892/ijmm_00000460
- Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., & Dumontet, C. (2013): Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 12(6), 447-464, <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* 42:677–685, <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Res* (2003) 116:233–239, <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0095-5>
- Khan, A. A. (1971): Cytokinins: Permissive Role in Seed Germination: With other plant hormones, cytokinins regulate germination and dormancy by a novel mechanism. *Science*, 171(3974), 853-859. DOI: 10.1126/science.171.3974.853
- Koprna R., De Diego N., Dundálková L., Spíchal L. (2016): Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorg Med Chem*. 2016 Feb 1;24(3):484-92. doi: 10.1016/j.bmc.2015.12.022. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26719210.
- Kolyachkina, S. V., Tararov, V. I., Alexeev, C. S., Krivosheev, D. M., Romanov, G. A., Stepanova, E. V., ... & Mikhailov, S. N. (2011): N 6-Substituted adenosines. Cytokinin and antitumor activities. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 76(11), 1361-1378. <https://doi.org/10.1135/cccc2011114>
- Koshimizu, K., Kusaki, T., Mitsui, T., Matsubara, S. (1967): Isolation of a cytokinin,(-)-dihydrozeatin, from immature seeds of *Lupinus luteus*. *Tetrahedron Letters*, 8(14), 1317-1320. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)90693-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)90693-2)

- Kumar, R. S., Arif, I. A., Ahamed, A., & Idhayadhulla, A. (2016): Anti-inflammatory and antimicrobial activities of novel pyrazole analogues. *Saudi journal of biological sciences*, 23(5), 614-620. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.005>
- Kuraishi, S., and Okumura, F. S. (1956). The effect of kinetin on leaf growth. *Shokubutsugaku Zasshi*, 69, 300–306. doi: 10.15281/jplantres1887.69.300
- Lang, A. (1956): Bolting and flowering in biennial *Hyoscyamus niger*, induced by gibberellin. Journal article, 31, (Suppl), *Plant Physiology*, (xxxv),
- Lee S. M., Ryu C. M., (2021): Algae as New Kids in the Beneficial Plant Microbiome. *Front Plant Sci.* 2021 Feb 4;12:599742. doi: 10.3389/fpls.2021.599742. PMID: 33613596; PMCID: PMC7889962.
- LETHAM D. S. (1962): ZEATIN, A FACTOR INDUCING CELL DIVISION ISOLATED FROM ZEA MAYS. *Life Sci* (1962). 1963 Aug;8:569-73. doi: 10.1016/0024-3205(63)90108-5. PMID: 14058503.
- Letham, D. S. (1967): Regulators of cell division in plant tissues. V. A comparison of the activities of zeatin and other cytokinins in five bioassays. *Planta*, 74, 228–242. doi: 10.1080/0028825X.1963.10429004
- Letham, D. S. (1971): Regulators of cell division in plant tissues XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 25, 391–396. doi: 10.1111/j.1399-3054.1971.tb01462.x
- Lindhagen E., Nygren P., Larsson R. (2008): The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc.* 2008;3(8):1364-9. doi: 10.1038/nprot.2008.114. PMID: 18714304.
- Liverman, J. L. and Bonner, J. (1953): The interaction of auxin and light in the growth responses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39(9), 905-916. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.9.905>
- Liu, W., Xu, Z. H., Luo, D., & Xue, H. W. (2003): Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *The Plant Journal*, 36(2), 189-202. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01866.x>

Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the activity response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002– 1004.

Manos, P. J., and Goldthwaite, J. (1976): An improved cytokinin bioassay using cultured soybean hypocotyl sections. *Plant Physiology*, 57, 894–897. doi: 10.1104/pp.57.6.894

Márquez-López, R.E., Quintana-Escobar, A.O. & Loyola-Vargas, V.M. Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators. *Phytochem Rev* 18, 1387–1408 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09656-6>

Mészáros, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Pettkó-Szandtner, A., Peres, A., Magyar, Z., Dudits, D. et al. (2000): Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G 2/M progression in alfalfa cells. *The Plant Cell Cycle*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0936-2_5

Métraux J.P, Signer H., Ryals J.A., Ward E., Wyss-Benz M., Raschdorf G.K., Schmid E., Blum W., Inverardi B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006(1990). DOI:10.1126/science.250.4983.1004

Mik V, Szüčová L, Smehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M, Spíchal L. (2011): N9-substituted derivatives of kinetin: effective anti-senescence agents. *Phytochemistry*. 2011 Jun;72(8):821-31. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.002. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21354583.

Millard, S. S., & Koff, A. (1998): Cyclin-dependent kinase inhibitors in restriction point control, genomic stability, and tumorigenesis. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 30, 37-42. PMID: 19828076, PMCID: PMC2762065

Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392-1392. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>

Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375-1380.

- Miller, C. O. (1958): The Relationship of the Kinetin and Red-Light Promotions of Lettuce Seed Germination. *Plant physiology*, 33(2), 115. doi: 10.1104/pp.33.2.115
- Miller, C. O. (1963): Kinetin and kinetin-like compounds. In *Modern methods of plant analysis*. Springer, Germany, Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-94878-7_10
- Miller, C. O. (1967). Zeatin and zeatin riboside from a mycorrhizal fungus. *Science*, 157(3792), 1055-1057. DOI: 10.1126/science.157.3792.1055
- Miura, G. A., Miller, C. O. (1969). 6-(γ , γ -Dimethylallylamino) purine as a precursor of zeatin. *Plant Physiology*, Volume 44, Issue 3, March 1969, Pages 372–376, <https://doi.org/10.1104/pp.44.3.372>
- Narain, A., and Laloraya, M. M. (1974). Cucumber cotyledon expansion as a bioassay for cytokinins. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 71, 313–322. doi: 10.1016/s0044-328x(74)80038-3
- Naseem, M., Dandekar, T. (2012). The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003026. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003026>
- Newton, C., Morgan, C. B., and Morgan, D. G. (1980). Evaluation of a bioassay for cytokinins using soybean hypocotyl sections. *Journal of Experimental Botany*, 31, 721–729. doi: 10.1093/jxb/31.3.721
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17:471–480. <https://doi.org/10.1002/bies.950170603>
- O'Brien, J. A., Benková, E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*, 4, 451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00451>
- Oshchepkov, M. S., Kalistratova, A. V., Savelieva, E. M., Romanov, G. A., Bystrova, N. A., Kochetkov, K. A. (2020). Natural and synthetic cytokinins and their applications in biotechnology, agrochemistry and medicine. *Russian Chemical Reviews*, 89(8), 787. DOI: 10.1070/RCR4921

- Othman, E. M., Naseem, M., Awad, E., Dandekar, T., Stopper, H. (2016). The plant hormone cytokinin confers protection against oxidative stress in mammalian cells. *PLoS One*, 11(12), e0168386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168386>
- Paces V, Werstiuk E, Hall RH. Conversion of N-(Delta-Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiol*. 1971 Dec;48(6):775-8. doi: 10.1104/pp.48.6.775. PMID: 16657878; PMCID: PMC396946.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):615-22. doi: 10.1038/45159. PMID: 10604467.
- Pickard, B. G., Thimann, K. V. (1964). Transport and distribution of auxin during tropistic response. II. The lateral migration of auxin in phototropism of coleoptiles. *Plant Physiology*, 39(3), 341. doi: 10.1104/pp.39.3.341
- Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1, E73–E79 1999. <https://doi.org/10.1038/11041>
- Phinney, B. O. (1956). Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42(4), 185-189. <https://doi.org/10.1073/pnas.42.4.185>
- Plíhal, O., Szüčová, L., Galuszka, P. (2013). N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for in vitro culturing. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6). <https://doi.org/10.4161/psb.24392>
- Plíhalová L, Vylíčilová H, Doležal K, Zahajská L, Zatloukal M, Strnad M. (2016): Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *N Biotechnol*. 2016 Sep 25;33(5 Pt B):614-624. doi: 10.1016/j.nbt.2015.11.009. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26703810.
- Podlešáková K, Zalabák D, Čudejková M, Plíhal O, Szüčová L, et al. (2012) Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range. *PLOS ONE* 7(6): e39293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039293>

Przheval'skii, N. M., Magedov, I. V., Drozd, V. N. (1997). New derivatives of indole. Synthesis of s-(indolyl-3) diethyl dithiocarbamates. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 33(12), 1475-1476. <https://doi.org/10.1007/BF02291655>

Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D. M. F. R., Roussel, M. F., Sherr, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes & development*, 7(8), 1559-1571. doi: 10.1101/gad.7.8.1559

Rattan, S. I., Clark, B. F. (1994). Kinetin delays the onset of aging characteristics in human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 201(2), 665-672. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1752>

Redig P, Shaul O, Inze D, Van Montagu M, Van Onckelen H (1996): Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett* 391:175–180. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00728-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00728-4)

Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D. (1996) Systemic Acquired Resistance.. *Plant Cell* 8, 1809– 1819. doi: 10.1105/tpc.8.10.1809

Ryo M, Yamashino T, Nomoto Y, Goto Y, Ichinose M, Sato K, Sugita M, Aoki S (2018): Light-regulated PAS-containing histidine kinases delay gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*, *Journal of Experimental Botany*, Volume 69, Issue 20, 14 September 2018, Pages 4839–4851, <https://doi.org/10.1093/jxb/ery257>

Sakakibara H. (2021): Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *Plant J.* 2021 Jan;105(2):421-430. doi: 10.1111/tpj.15011. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33015901.

Savelieva E.M., Zenchenko A.A., Drenichev M.S., Kozlova A.A., Kurochkin N.N., Arkhipov D.V., Chizhov A.O., Oslovsky V.E., Romanov G.A. (2022): In Planta, In Vitro and In Silico Studies of Chiral *N*⁶-Benzyladenine Derivatives: Discovery of Receptor-Specific *S*-Enantiomers with Cytokinin or Anticytokinin Activities. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 26;23(19):11334. doi: 10.3390/ijms231911334. PMID: 36232653; PMCID: PMC9569578.

Schang L.M. (2001): Cellular proteins (cyclin dependent kinases) as potential targets for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother.* 2001;12 Suppl 1:157-78. PMID: 11594683.

Scott R.A., Liverman J.L. (1956): Promotion of Leaf Expansion by Kinetin and Benzylaminopurine. *Plant Physiol.* 1956 Jul;31(4):321-2. doi: 10.1104/pp.31.4.321. PMID: 16654892; PMCID: PMC540793.

Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., de Almeida Engler, J., Jacqmar, A., Van Montagu, M., Inzé, D. (1996). The Arabidopsis cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *The Plant Journal*, 10(4), 601-612. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10040601.x>

Shah, S. H., Ali, S., Jan, S. A., Din, J., Ali, G. M. (2015). Callus induction, in vitro shoot regeneration and hairy root formation by the assessment of various plant growth regulators in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *he Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(2): 2015, Page: 528-538, ISSN: 1018-7081

Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclindependent kinases. *Genes Dev* 9:1149–1163

Senanayake, D., Silva, T. (2024). The effect of BAP concentration and salt strength of MS medium on the in vitro shoot growth and multiplication of *Passiflora edulis* var. Horana Gold. in Proceedings of the 3rd International Electronic Conference on Plant Sciences, 15–17 January 2024, MDPI: Basel, Switzerland

Song, L. I., Zhou, X. Y., Li, L. I., Xue, L. J., Yang, X. I., Xue, H. W. (2009). Genome-wide analysis revealed the complex regulatory network of brassinosteroid effects in photomorphogenesis. *Molecular Plant*, 2(4), 755-772. doi: 10.1093/mp/ssp039, Advance Access publication 23 June 2009

Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment.* Elsevier Science, 2002

Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dalton, S. et al. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene*, 21(54), 8320-8333. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206015>

Strauss, M., Lukas, J., Bartek, J. (1995): Unrestricted cell cycling and cancer. *Nature Med.* 1995, 1, 1245-1246. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1245>

Szüčová, L., Spíchal, L., Doležal, K., Zatloukal, M., Greplová, J., Galuszka, P., Strnad, M. (2009). Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(5), 1938-1947. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.041>

Šmečilová M, Dobrušková J, Novák O, Takáč T, Galuszka P. Cytokinin-Specific Glycosyltransferases Possess Different Roles in Cytokinin Homeostasis Maintenance. *Front Plant Sci*. 2016 Aug 23;7:1264. doi: 10.3389/fpls.2016.01264. PMID: 27602043; PMCID: PMC4993776.

Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Åstot, C., Holub, J., Fuksová, K., Schmülling, T., Sandberg, G. and Strnad, M. (2003), Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus × canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, 117: 579-590. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00071.x>

Tripathi, V., Edrisi, S. A., Chen, B., Gupta, V. K., Vilu, R., Gathergood, N., Abhilash, P. C. (2017). Biotechnological advances for restoring degraded land for sustainable development. *Trends in biotechnology*, 35(9), 847-859. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.001>

Uniyal S, Bhandari M, Singh P, Singh RK, Tiwari SP. Cytokinin biosynthesis in cyanobacteria: Insights for crop improvement. *Front Genet*. 2022 Sep 9;13:933226. doi: 10.3389/fgene.2022.933226. PMID: 36160007; PMCID: PMC9504062.

Urbanova, T. and Leubner-Metzger, G. (2016). Gibberellins and seed germination. In *Annual Plant Reviews*, Volume 49 (eds P. Hedden and S.G. Thomas). <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch9>

Van Staden, J., Drewes, F. E. (1991). The biological activity of cytokinin derivatives in the soybean callus bioassay. *Plant growth regulation*, 10, 109-115. <https://doi.org/10.1007/BF00024957>

Veselý, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Meijer, L. et al. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European*

Journal of Biochemistry, 224(2), 771-786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x>

Voller J, Zatloukal M, Lenobel R, Dolezal K, Béres T, Krystof V, Spíchal L, Niemann P, Dzubák P, Hajdúch M, Strnad M.(2010): Anticancer activity of natural cytokinins: a structure-activity relationship study. *Phytochemistry*. 2010 Aug;71(11-12):1350-9. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.04.018. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20553699.

Voller, J., Maková, B., Kadlecová, A., Gonzalez, G., Strnad, M. (2017). Plant Hormone Cytokinins for Modulating Human Aging and Age-Related Diseases. In: Rattan, S., Sharma, R. (eds) *Hormones in Ageing and Longevity. Healthy Ageing and Longevity*, vol 6. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63001-4_14

Vylíčilová H, Husičková A, Spíchal L, Srovnal J, Doležal K, Plíhal O, Plíhalová L. C2-substituted aromatic cytokinin sugar conjugates delay the onset of senescence by maintaining the activity of the photosynthetic apparatus. *Phytochemistry*. 2016 Feb;122:22-33. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.12.001. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26706318.

Vylíčilová, H., Bryksová, M., Matušková, V., Doležal, K., Plíhalová, L., & Strnad, M. (2020). Naturally occurring and artificial N9-cytokinin conjugates: from synthesis to biological activity and back. *Biomolecules* 2020, 10(6), 832; <https://doi.org/10.3390/biom10060832>

Waadt, R., Hitomi, K., Nishimura, N., Hitomi, C., Adams, S. R., Getzoff, E. D., Schroeder, J. I. (2014). FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in *Arabidopsis*. *elife*, 3, e01739. <https://doi.org/10.7554/eLife.01739>

Werbrouck, S.P.O., Strnad, M., Van Onckelen, H.A. and Debergh, P.C. (1996), *Metatopolin*, an alternative to benzyladenine in tissue culture?. *Physiologia Plantarum*, 98: 291-297. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x>

Wightman, F. (1977). Gas Chromatographic Identification and Quantitative Estimation of Natural Auxins in Developing Plant Organs. In: Pilet, PE. (eds) *Plant Growth Regulation. Proceedings in Life Sciences*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66589-9_9

Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmülling T. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 2011 Aug;156(4):1808-18. doi: 10.1104/pp.111.180539. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21709172; PMCID: PMC3149959.

Zavaleta-Mancera, H.A.; López-Delgado, H.; Loza-Tavera, H.; Mora-Herrera, M.; Trevilla-García, C.; Vargas-Suárez, M.; Ougham, H. (2007) Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J. Plant Physiol.* 2007, 164, doi: 1572–1582. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.003>

Zolman BK, Yoder A, Bartel B. (2000): Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* - 156: 1323–1337. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.3.1323>

Hypertextové odkazy

Ref 1: <https://www.universiteitleiden.nl/en/research/research-projects/science/ibl-the-mechanism-of-agrobacterium-mediated-transformation-of-eukaryotic-cells>

Ref 2: https://www.freepik.com/premium-photo/grape-leaf-affected-by-pathogen-peronospora-viticola-de-bary_21432494.htm