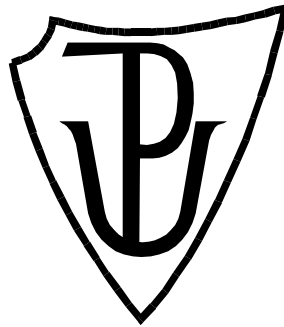


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Fluorescenčně značené cytokininy: syntéza,  
charakterizace a biologická aktivita**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	Alena Zemánková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Václav Mik, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2016

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Alena Zemánková
Název práce:	Fluorescenčně značené cytokinininy: syntéza, charakterizace a biologická aktivita
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Bakalářská práce je zaměřena na syntézu fluorescenčně značených derivátů aromatických cytokininů a jejich biologickou aktivitu. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zabývající se cytokinininy a jejich signální dráhou, malými organickými fluorofory a spojením cytokininů a fluorescence. V experimentální části byly nasyntetizovány fluorescenčně značené deriváty aromatických cytokininů odvozených od <i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladeninu a kinetinu. Připravené látky byly charakterizovány pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod, a zejména byla změřena jejich absorpční a fluorescenční spektra. Jejich biologická aktivita byla testována v kompetičním ligand-vazebném biotestu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z <i>A. thaliana</i> .
Klíčová slova:	Cytokinininy, cytokininové receptory, fluorescence, fluorescenční značení, kinetin, <i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenin
Počet stran:	60
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Alena Zemánková

Title of thesis: Fluorescently labelled cytokinins: synthesis, characterization and biological activity

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: Mgr. Václav Mik, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: This bachelor thesis deals with synthesis and biological activity of fluorescently labelled aromatic cytokinins derivatives. The theoretical part summarizes the current knowledge about cytokinins and their signalling pathway, small organic fluorophores and connection between cytokinins and fluorescence. In the experimental part, fluorescently labelled derivatives of aromatic cytokinins *N*<sup>6</sup>-benzyladenine and kinetin were synthesized. The physico-chemical properties of prepared compounds were investigated. Their biological activity was examined in ligand binding bioassay on cytokinin receptors AHK3 and CRE1/AHK4 from *A. thaliana*.

Keywords: Cytokinins, cytokinin receptors fluorescence, fluorescent labelling, kinetin, *N*<sup>6</sup>-benzyladenine

Number of pages: 60

Number of appendices: 0

Language: Czech

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

V Olomouci dne

Alena Zemánková

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a trpělivost při práci v laboratoři a sepisování této práce. Děkuji také Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D. za pomoc při měření fluorescenčních spekter, Mgr. Zuzaně Mičkové za asistenci a provedení kompetičních ligand-vazebných testů a týmu „HPLC-MS“ za změření a zpracování dat. Mé poděkování patří rovněž celému kolektivu laboratoře organické syntézy na Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná za poskytované rady během práce v laboratoři.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod a cíle práce	10
1 Cytokininy	12
1.1 Struktura cytokininů	12
1.2 Signální dráha cytokininů	14
1.2.1 Hybridní kinasové receptory (AHKs)	14
1.2.2 Histidin fosfotransferové proteiny (AHPs)	16
1.2.3 Regulátory odpovědi (ARRs)	17
1.2.4 Faktory cytokininové odpovědi (CRFs)	17
1.2.5 Mechanismus signalizace	17
2 Malé organické fluorofory	19
2.1 Malé organické fluorofory s emisí do 500 nm	19
2.2 Malé organické fluorofory s emisí nad 500 nm	22
3 Cytokininy a fluorescence	24
3.1 Fluorescenční deriváty cytokininů	24
3.2 Fluorescenčně značené cytokininy	27
4 Materiály a metody	30
4.1 Chemikálie	30
4.2 Metody	30
4.3 Syntéza	31
4.3.1 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylová kyselina (1)	31
4.3.2 2-chlor-6-substituované deriváty purinu (2, 3)	32
4.3.3 C2-substituované prekurzory pro fluorescenční značení (4-7)	32
4.3.4 N9-substituované prekurzory pro fluorescenční značení (10-11)	33
4.3.5 Značení 4-chlor-7-nitrobenzofurazanem (12-15 a 32, 33)	34
4.3.6 Značení Rhodaminem B (16-19)	34
4.3.7 Značení kumarin-3-karboxylovou kyselinou (20-23)	35
4.3.8 Značení 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylovou kyselinou (24-27)	36

4.3.9	Značení dansyl chloridem (28-31).....	36
4.4	Kompetiční (ligand-vazebný) test.....	37
5	Výsledky a diskuze .....	38
5.1	Syntéza .....	38
5.1.1	7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylová kyselina (1) .....	38
5.1.2	Příprava ligandů pro fluorescenční značení .....	38
5.1.3	Příprava fluorescenčně značených aromatických cytokininů.....	42
5.2	Kompetiční (ligand-vazebný) test.....	53
6	Závěr .....	55
7	Seznam použité literatury .....	56

## Seznam použitých zkratk

4PU	<i>N</i> -fenyl- <i>N'</i> -(4-pyridyl)močovina
AHKs	hybridní kinasové receptory z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AHPs	histidin fosfotransferové proteiny z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ARRs	regulátory odpovědi z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAMPP	4-butylamino-2-methylthiopyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin
BAP	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzylaminopurin, 6-benzylamino-9 <i>H</i> -purin
bs	široký singlet
CPPU	<i>N</i> -fenyl- <i>N'</i> -(2-chlor-4-pyridyl)močovina
CRFs	faktory cytokininové odpovědi
cZ	<i>cis</i> -zeatin, ( <i>Z</i> )-6-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9 <i>H</i> -purin
d	dublet
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
dd	dublet dubletu
DEAC	7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylát
DEAC-OH	7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylová kyselina
DHZ	dihydrozeatin, 6-[(3-methylbutyl)amino]-9 <i>H</i> -purin
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	deuterovaný dimethylsulfoxidu
DPM	počet rozpadů [2- <sup>3</sup> H]-tZ za minutu
DPU	<i>N,N'</i> -difenylmočovina
ekv.	ekvivalent
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
ER	endoplasmatické retikulum
ESI <sup>+</sup> -MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód
FEIP	7-fenylethynylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridin
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyladenin, 6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9 <i>H</i> -purin



<i>J</i>	interakční konstanta
Kin	kinetin, 6-furfurylamino-9 <i>H</i> -purin
lt	laboratorní teplota
m	multiplet
NBD	7-nitrobenzofurazan-4-yl
NBD-Cl	4-chlor-7-nitrobenzofurazan, 4-chlor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazol
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
s	singlet
t	triplet
TDZ	thidiazuron, <i>N</i> -fenyl- <i>N'</i> -(1,2,3-thidiazol-5-yl)močovina
TFA	trifluoroctová kyselina
tZ	<i>trans</i> -zeatin, ( <i>E</i> )-6-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9 <i>H</i> - purin
vbs	velmi široký singlet
VrCSBP	cytokinin-specifický vazebný protein z <i>Vigna radiata</i>
Z	zeatin
δ	chemický posun

## Úvod a cíle práce

Cytokinininy jsou malé organické molekuly odvozené od adeninu, které fungují jako rostlinné hormony, a ve velmi nízkých koncentracích ovlivňují řadu významných biologických i fyziologických procesů ve všech stádiích rostlinného života od vzorování embrya až po senescenci. Přestože byly objeveny již před více než 60 lety, není doposud zcela zmapován jejich transport v rámci rostliny a rostlinných buněk, signální kaskáda, některé metabolické dráhy, existence specifických cytokinin-vazebných proteinů, popřípadě interakce s dalšími fytohormony. Během jejich studia bylo zjištěno, že mají vliv i na buňky živočišné (protinádorová, antioxidantivní, antisenescenční aktivita).

Fluorescence je fyzikálně-chemický děj, při kterém dochází po absorpci záření k emisi energie v podobě světla při přechodu z prvního singletového stavu ( $S_1$ ) do singletové hladiny ( $S_0$ ). Při chemických analýzách za použití vhodných detektorů lze zaznamenat fluorescenci látky s koncentracemi až  $10^{-12}$ M.

Spojení fluorescence a cytokininů tak umožňuje vývoj velmi citlivých molekulárních nástrojů, jednak pro analytické účely – stanovení disociačních konstant, koncentrace analytu uvnitř organel, izolace vazebných proteinů atd. a při použití konfokální mikroskopie lze například studovat intracelulární lokalizaci jejich molekulárních cílů.

Cílem této bakalářské práce bylo:

- vypracování literární rešerše na téma cytokinininy a malé organické fluorofory
- příprava fluorescenčně značených derivátů aromatických cytokininů
- charakterizace připravených látek dostupnými fyzikálně-chemickými metodami

# **Teoretická část**

# 1 Cytokininy

Cytokininy patří mezi rostlinné hormony, jejichž název pochází z řeckého „cyto“ (buňka), „kinesis“ (dělení) a vyjadřuje jejich schopnost podporovat v přítomnosti auxinů buněčné dělení. Jejich objevení předcházelo hledání látky, která by byla schopna indukovat cytokinezi v tkáňové kultuře. Skupina prof. F. Skooga v 50. letech 20. století vyzolovala z autoklávovaného spermatu sledě látku, později pojmenovanou kinetin, jako faktor potřebný společně s auxiny pro buněčné dělení (Miller a kol., 1955b). Na základě chemických vlastností a reaktivity izolované sloučeniny s různými reakčními činidly byla navržena chemická struktura kinetinu (6-furfurylamino-9H-purinu), která byla následně potvrzena syntézou (Miller a kol., 1955a).

O několik let později byl identifikován první přirozeně se vyskytující cytokinin, *trans*-zeatin, získaný z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*) (Miller, 1961). V dalších letech bylo vyzolováno a nasyntetizováno mnoho dalších cytokininů, přičemž jako přirozeně vyskytující se cytokininy byly dlouhou dobu uznávány pouze isoprenoidní cytokininy. Aromatické cytokininy byly do této skupiny zařazeny až na základě jejich izolace z topolu (*Populus canadensis*) (Strnad a kol., 1994).

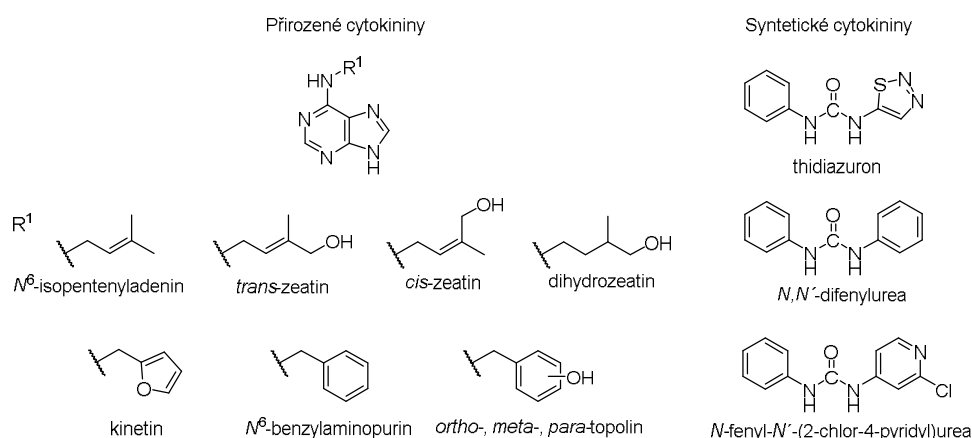
Od objevu prvního cytokininu bylo prokázáno, že cytokininy zásadně ovlivňují mnoho biologických i fyziologických procesů v rostlinách. Mají vliv na regulaci proliferace a diferenciaci rostlinné buňky, oddalování listové senescence, klíčení semen, apikální dominanci a odpovědi rostlin na abiotický či biotický stres (Werner a Schmölling, 2009).

## 1.1 Struktura cytokininů

Všechny přirozeně se vyskytující cytokininy jsou  $N^6$ -substituované deriváty 6-aminopurinu s isoprenoidním či aromatickým postranním řetězcem (Obrázek 1). Skupinu isoprenoidních cytokininů představují  $N^6$ -isopentenyladenin (iP; 6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9H-purin) a zeatin (Z; 6-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9H-purin). Zeatin obsahuje vedlejší řetězec s terminální hydroxyskupinou, která může být orientovaná v *trans*- nebo *cis*- konfiguraci představující tak *trans*-zeatin (tZ) či *cis*-zeatin (cZ). Do této skupiny isoprenoidních cytokininů se také řadí dihydrozeatin (DHZ; 6-[(3-methylbutyl)amino]-9H-purin), ačkoli má nasycený 3-methylbutylový postranní řetězec (Zürcher a Müller, 2016).

Mezi základní aromatické cytokininy patří kinetin s furfurylovým substituentem (Kin; 6-furfurylamino-9H-purin) a deriváty s benzylovým zbytkem,  $N^6$ -benzylaminopurin (BAP) nebo topoliny (Mok a Mok, 2001). Topoliny jsou hydroxylované formy BAP

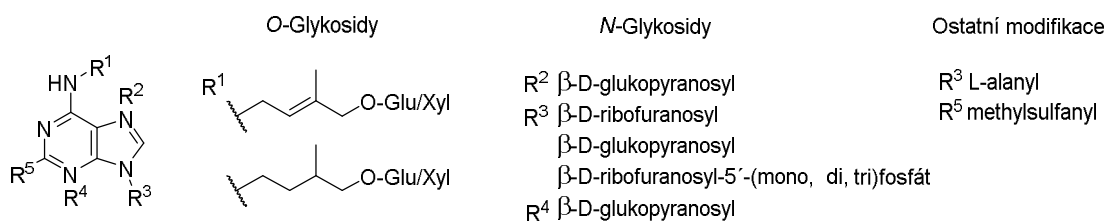
vyizolované z topolu (*Populus canadensis*), jmenovitě se jedná o *ortho*-topolin (6-[(2-hydroxybenzyl)amino]-9*H*-purin), *meta*-topolin (6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9*H*-purin) a *para*-topolin (6-[(4-hydroxybenzyl)amino]-9*H*-purin) (Strnad, 1997).



**Obrázek 1. Struktury vybraných cytokininů.** Dvě hlavní chemické třídy cytokininů: přirozeně se vyskytující isoprenoidní (vlevo nahoře) či aromatické (vlevo dole) a syntetické (vpravo).

Kromě přirozeně se vyskytujících cytokininů s purinovým skeletem existují také syntetické deriváty cytokininů, které jsou odvozené od fenylmočoviny, například thidiazuron (TDZ; *N*-fenyl-*N'*-(1,2,3-thidiazol-5-yl)močovina), *N,N'*-difenylmočovina (DPU) a forchlorfenuron (CPPU, *N*-fenyl-*N'*-(2-chlor-4-pyridyl)močovina) (Ricci a Bertolletti, 2009).

Cytokinininy s purinovým základem se objevují v rostlinách nejen ve formě volných bází, ale také nukleosidů, nukleotidů i *N*- či *O*-glykosidů (Obrázek 2).



**Obrázek 2. Struktury přirozeně vyskytujících se derivátů a konjugátů cytokininů.**

*O*-glykosylaci podléhají cytokinininy s terminální hydroxyskupinou na postranním řetězci, kde dochází k připojení β-D-glukosy nebo β-D-xylosy. Jelikož *O*-glykosidická vazba je lehce hydrolyzovatelná a *O*-glykosidy nejsou biologicky aktivní, jsou tyto cytokinininy považovány za transportní a zásobní formy cytokininů. Další modifikovanou formou cytokininů jsou *N*-glykosidy, které vznikají navázáním β-D-glukosy nebo vzácně β-D-xylosy do poloh *N*3, *N*7 a *N*9 na adeninovém kruhu. Vzhledem k tomu, že *N*-glykosidická vazba je velmi stabilní a tyto formy nevykazují biologickou aktivitu, má vznik *N*-glykosylovaných forem cytokininů za následek jejich inaktivaci. V případě

zeatinu a DHZ dochází také k připojení L-alaninu do N9-pozice za vzniku kyseliny lupinové, respektive dihydrolupinové (Frébort a kol., 2011).

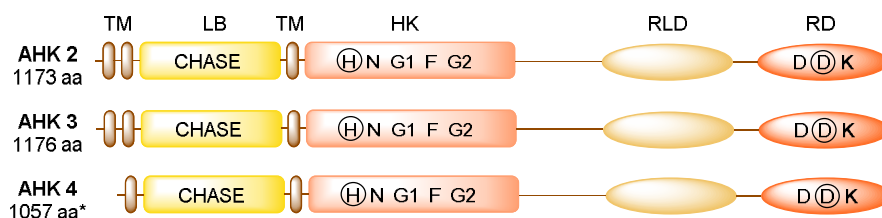
## 1.2 Signální dráha cytokininů

Schopnost vnímat a reagovat na cytokininy je klíčovou součástí téměř všech stádií rostlinného života, od vzorování embrya přes regulaci apikálních meristémů, vývoj orgánů až po senescenci. Je umožněna prostřednictvím modifikované dvou-komponentní His-Asp fosforylační signální dráhy, která vede od hybridního kinasového receptoru přes řadu fosforylačních kroků k regulaci genové exprese. Cytokininová signální dráha zahrnuje u *Arabidopsis thaliana* tři základní složky: hybridní kinasové receptory (AHKs), histidin fosfotransferové proteiny (AHPs) a regulátory odpovědi (ARRs). Do signalizace jsou také zapojeny faktory cytokininové odpovědi (CRFs) (Keshishian a Rashotte, 2015).

### 1.2.1 Hybridní kinasové receptory (AHKs)

Téměř půl století od objevení cytokininů byly jako cytokininové receptory u *A. thaliana* identifikovány tři transmembránové histidin kinasy (AHKs), z nichž první objevenou byla v roce 2001 CRE1/AHK4 (Inoue a kol., 2001, Suzuki a kol., 2001, Ueguchi a kol., 2001). Vzápětí byla uveřejněna také existence AHK2 a AHK3 (Hwang a Sheen, 2001).

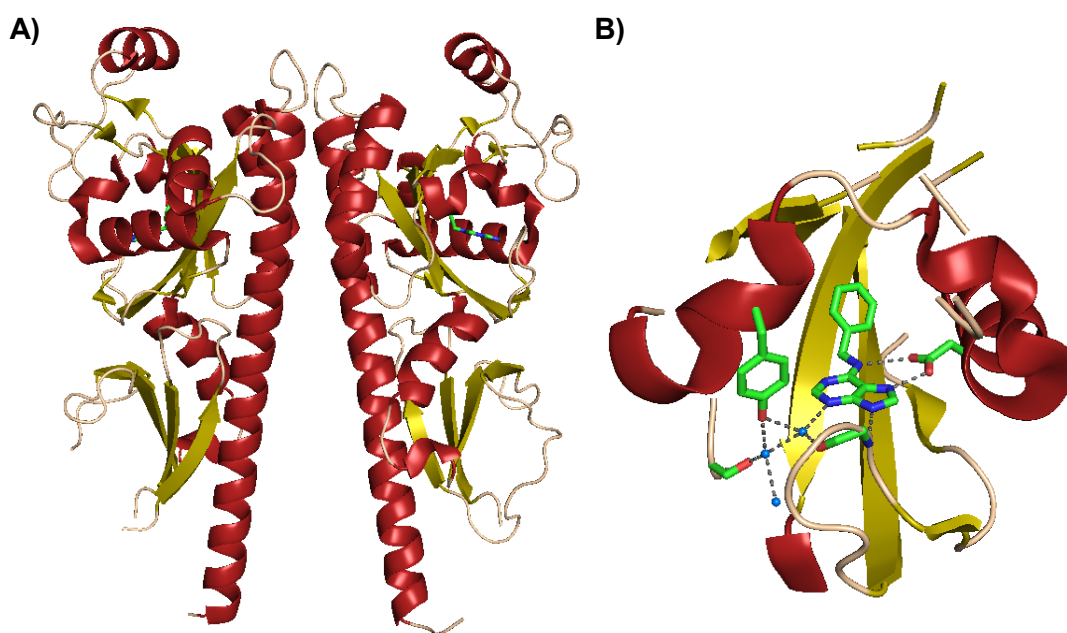
Výše uvedené AHKs se skládají ze dvou až tří transmembránových segmentů svírajících extracelulární vazebnou CHASE doménu (cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular), histidin kinasové domény, přijímací (receiver) domény a domény homologní k přijímací doméně, tzv. receiver-like domény (Obrázek 3) (Higuchi a kol., 2004, Inoue a kol., 2001, Nishimura a kol., 2004).



**Obrázek 3. Struktura cytokininových receptorů AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 v signální dráze cytokininů u *A. thaliana*.** Zakroužkované aminokyseliny jsou zodpovědné za přenos fosfátu. aa – aminokyselina, TM – transmembránová doména, LB – ligand-vazebná doména, HK – histidin kinasová doména, RLD – receiver-like doména, RD – přijímací (receiver) doména podle Heyl a Schmölling, 2003.

Zmiňovaná CHASE doména obsahuje 200-230 aminokyselinových zbytků, které mohou vázat nízkomolekulární ligandy, jakými jsou právě deriváty cytokininů (Anantharaman a Aravind, 2001). V roce 2011 byla publikována krystalová struktura

senzorové domény receptoru CRE1/AHK4 v komplexu s různými cytokininy (Obrázek 4A). Bylo zjištěno, že ligand je zanořen postranním řetězcem do nepolární vazebné kapsy receptoru a stabilizuje se uvnitř pomocí dvou přímých vodíkových vazeb mezi Asp262 a *N6* a *N7* atomy cytokininu (Obrázek 4B). Při vazbě tZ dochází k tvorbě další vodíkové interakci mezi Thr294 a terminální hydroxyskupinou na isoprenoidním řetězci, čímž se dosáhne stabilnějšího spojení, což staví tZ do pozice nejaktivnějšího cytokininu. Ke stabilizaci cytokininů v receptorovém místě přispívají také nepřímé vodíkové vazby zprostředkované molekulami vody, kterou jsou koordinovány postranními řetězci Ser199, Tyr250 a hlavním řetězcem Leu284 (Hothorn a kol., 2011).



**Obrázek 4. Krystalová struktura vazebné domény CRE1/AHK4 v komplexu s BAP.** A) Celková struktura komplexu; B) detail vazebného místa receptoru, aminokyseliny ve vzdálenosti do 12 Å od ligandu – modré kuličky = molekuly vody, přerušovaná šedá čára = vodíkové vazby, přímá interakce - Asp262, nepřímá interakce – postranní řetězec Ser199, Tyr250 a hlavní řetězec Leu284.

U receptorů AHK3 a CRE1/AHK4 byla také studována jejich afinita k různým cytokininům a jejich metabolitům (Tabulka 1). Z naměřených hodnot vyplývá, že volné báze cytokininů jsou nejlepšími ligandy receptorů, zatímco odpovídající ribosidy vykazují mnohem nižší míru interakce. Další formy jako ribotidy, *N*-, *O*-glukosidy, popřípadě *O*-acetyly jsou zcela neaktivní. Největší aktivitou disponuje isoprenoidní cytokinin tZ následovaný iP, naproti tomu cZ, DHZ a aromatické cytokininy jsou výrazně horšími ligandy. (Romanov a kol., 2006, Spíchal a kol., 2004).

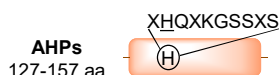
**Tabulka 1. Substrátová specifita cytokininových receptorů AHK3 a CRE1/AHK4.** <sup>a</sup>Aktivace cytokininových receptorů v *in vivo* ARR5::GUS receptorovém testu (Spíchal a kol., 2004). <sup>b</sup>Zdánlivé hodnoty  $K_D$  vypočítané jako koncentrace ligandů potřebné k vytlačení 50% 3H-zeatinu z aktivního místa receptorů (Romanov a kol., 2006). nd – nebylo detekováno.

Cytokinin	ARR5::GUS rel. aktivita [%] <sup>a</sup>		Apparent $K_D$ [nM] <sup>b</sup>	
	AHK4/CRE1	AHK3	AHK4/CRE1	AHK3
tZ	100,0	100,0	3,9	1,3
tZ ribosid	10,0	92,5	50	15
tZ ribosid 5'-monofosfát	0,3	40,4	-	-
tZ O-glukosid	0,0	0,0	nd	nd
tZ 9-glukosid	0,0	0,0	-	-
tZ O-acetyl	0,0	0,0	≥2750	≥2300
cZ	0,0	54,2	830	375
DHZ	0,1	52,9	400	50
iP	89,2	72,9	17	150
iP ribosid	10,0	10,1	130	≥2300
kin	2,5	23,8	-	-
BAP	7,7	23,6	300	1050
BAP ribosid	0,0	4,0	-	-
meta-topolin	28,6	79,8	-	-
meta-topolin ribosid	0,0	6,3	-	-

Subcelulární lokalizace zmiňovaných receptorů ještě stále není naprosto objasněna, protože byly prvně lokalizovány v plasmatické membráně (Kim a kol., 2006) a v pozdější studii na endoplazmatickém retikulu (ER) s CHASE doménou orientovanou do lumen ER (Caesar a kol., 2011).

### 1.2.2 Histidin fosfotransferové proteiny (AHPs)

Nepostradatelnou součástí fosforylační dráhy jsou AHPs zajišťující přenos fosfátu z AHKs v cytoplasmě na ARRs lokalizované v jádře. U *A. thaliana* je známo celkem šest AHPs, z čehož prvních pět (AHP1/2/3/4/5) stimuluje cytokininovou signální dráhu a šestý (AHP6) ji inhibuje, protože postrádá vysoce konzervovaný XH<sub>2</sub>QXKGSSXS motiv nezbytný pro fosfotransferovou aktivitu. Jedná se o proteiny, které jsou dlouhé 127-157 aminokyselin (Obrázek 5). Jejich struktura je ve srovnání s AHKs mnohem jednodušší, protože obsahují pouze krátkou histidin kinasovou doménu (Heyl a Schmölling, 2003).



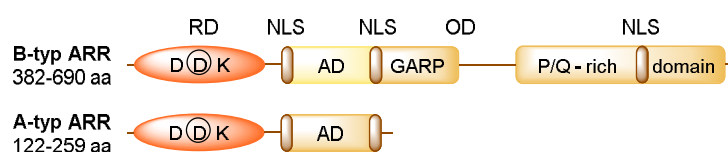
**Obrázek 5. Struktura AHPs s vysoce konzervovaným XH<sub>2</sub>QXKGSSXS motivem.** Podle Heyl a Schmölling, 2003.



### 1.2.3 Regulátory odpovědi (ARRs)

Konečnou skupinou proteinů v signální dráze cytokininů jsou ARRy nacházející se v jádře a sloužící k regulování odezvy či výstupu ve vnímání cytokininů.

Lze je rozdělit podle struktury do tří skupin: typ-A, typ-B a typ-C (Obrázek 6). Všechny ARRy jsou tvořeny přijímací doménou obsahující konzervované aspartátové reziduum účastnící se fosforylace. Zástupci ARRy typu-B mají dále výstupní doménu nesoucí DNA vazebný GARP motiv skládající se z 60 aminokyselin a fosforylací aktivované formy zastávají funkci transkripčních faktorů. Oproti tomu ARRy typu-A a -C DNA vazebnou doménu postrádají a jedná se o geny primární odpovědi, které mimo jiné zpětně inhibují cytokininovou signální dráhu (Keshishian a Rashotte, 2015).



**Obrázek 6. Struktura ARR typu-A a typu-B.** Zakroužkované aminokyseliny jsou zodpovědné za přenos fosfátu. aa – aminokyselina, RD – přijímací (receiver) doména, NLS – jaderná lokalizační sekvence. OD – výstupní doména, AD – kyselá doména, GARP – DNA vazebný motiv, P/Q rich domain – oblast bohatá na aminokyseliny prolin a glutamin, podle Heyl a Schmülling, 2003.

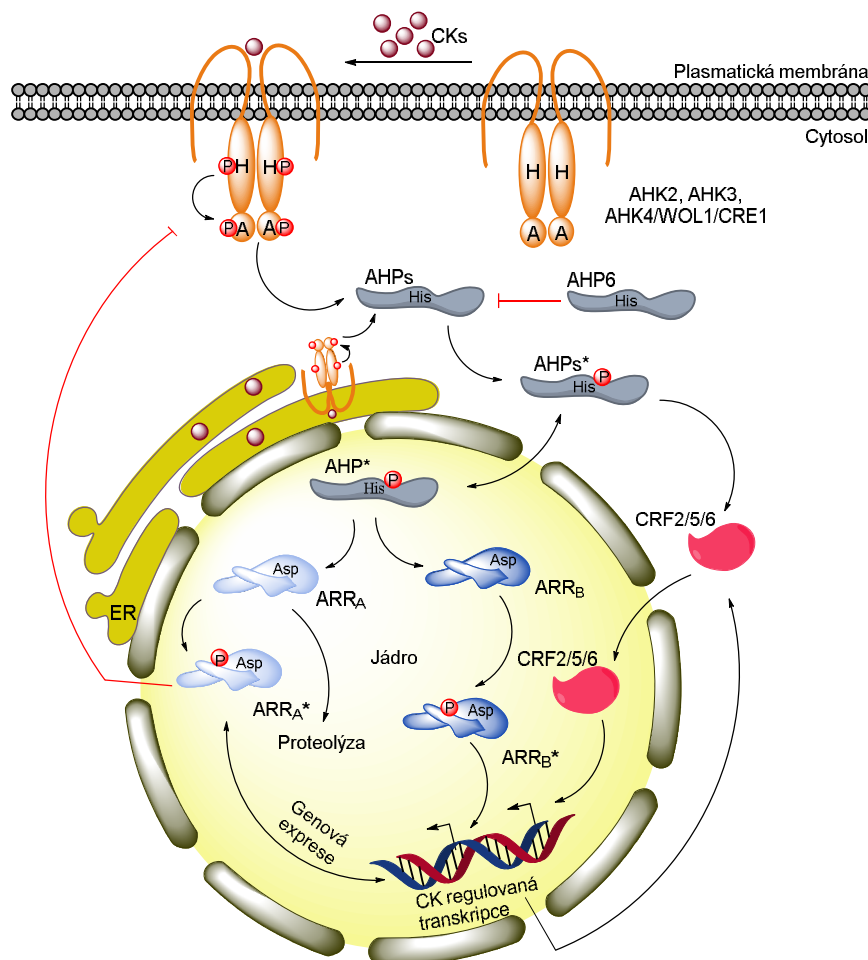
### 1.2.4 Faktory cytokininové odpovědi (CRFs)

Faktory cytokininové odpovědi tvoří vedlejší větev cytokininové signální dráhy, která je paralelní s dráhou ARR typu-B a pozměňují expresi totožných cílových genů (Hwang a kol., 2012). Jedná se o členy velké skupiny transkripčních faktorů APETALA2. U *A. thaliana* bylo nalezeno celkem šest genů kodujících CRFs. Avšak pouze CRF2, CRF5 a CRF6 jsou regulovány cytokininy, a to jednak prostřednictvím jejich exprese (cílový gen ARR typu-B) a aktivace (fosforylace AHPs). Po aktivaci fosforylací dochází k jejich přemístění z cytosolu do jádra, kde ovlivňují genovou expresi (Rashotte a kol., 2006).

### 1.2.5 Mechanismus signalizace

Cytokininová signální kaskáda začíná navázáním biologicky aktivního cytokininu na vazebnou CHASE doménu AHK nacházející se na extracelulární straně plasmatické membrány nebo v lumen endoplasmatického retikula. Vazbou ligandu dochází ke konformačním změnám, dimerizaci receptoru a autofosforylaci konzervovaného histidinového rezidua v histidin kinasové doméně. Po aktivaci receptoru následuje fosforylace aspartátového zbytku na přijímací doméně receptoru, odkud je signál dále přenesen na vysoce konzervovaný His mobilních AHP1-AHP5

lokalizovaných v cytoplasmě. Fosforylované AHPs jsou poté přemístěny z cytoplasmy do jádra, kde je jejich cílem fosforylace konzervovaného aspartátového rezidua ARRů typu-A nebo -B (Obrázek 7).



**Obrázek 7. Modifikovaný model signální dráhy cytokininů u *A. thaliana*.** Cytokininové receptory jsou pravděpodobně lokalizovány jak na plasmatické membráně, tak i na ER. Po vazbě cytokininu na receptor dochází k dimerizaci a autofosforylaci receptoru, poté je signál přenesen na mobilní AHPs, které jsou translokovány do jádra, kde fosforylují příslušné ARRy. CRF jsou aktivovány v cytosolu pomocí AHPs a po přesunu do jádra regulují genovou expresi. Inhibiči signální dráhy zajišťují AHP6 a fosforylované ARRy typu-A, podle (Shi a Rashotte, 2012).

Fosforylované ARRy typu-B aktivují genovou expresi ARRů typu-A, CRFs či genů regulujících vývoj kořene a stonku, de-etiolizaci, listovou expanzi, senescenci a cytokininovou homeostázi. Oproti tomu fosforylované ARRy typu-A mají vliv na regulaci cirkadiálních rytmů a funkci fytochromu (Ishida a kol., 2008).

CRF2/5/6 se po aktivaci prostřednictvím AHPs přemísťují z cytosolu do jádra, kde ovlivňují totožné geny jako ARR typu-B.

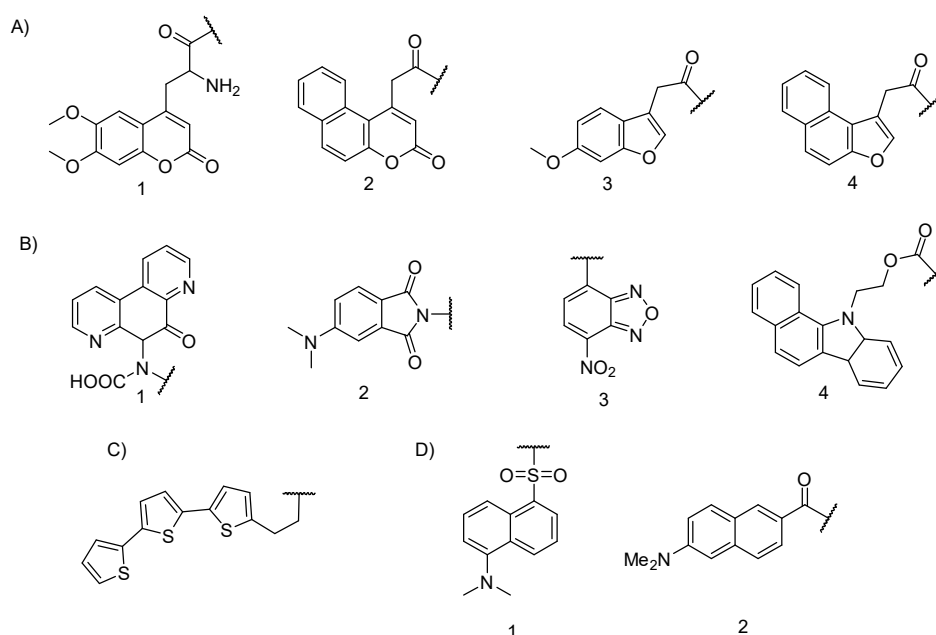
Negativní regulaci cytokininové signální kaskády zajišťují AHP6 a aktivované formy ARR typu-A (To a Kieber, 2008).

## 2 Malé organické fluorofory

Fluorescenční značení pomocí malých organických fluoroforů patří k jedné z nejběžnějších metod využívané ke sledování biologických událostí v živých buňkách i celém organismu. Použití fluorescenčních značek je vhodné vzhledem k jejich vysoké citlivosti, rychlé odezvě a technické jednoduchosti (Terai a Nagano, 2013). Fluorofory mohou vytvářet se vzorkem určeným k analýze kovalentní nebo nekovalentní vazby a vzniklé sloučeniny následně vykazují fluorescenci v oblasti krátkých či dlouhých vlnových délek v závislosti na použitém fluoroforu. Malé organické fluorofory lze rozdělit jak podle struktury, tak podle jejich emise na skupiny emitující pod 500 nm a nad 500 nm (Goncalves, 2009).

### 2.1 Malé organické fluorofory s emisí do 500 nm

Základními strukturálními motivy fluorescenčních značek s emisním maximem do 500 nm jsou nejčastěji dvou a více jaderné kondenzované heterocykly s kyslíkem, dusíkem i sírou nebo deriváty naftalenu (Obrázek 8).



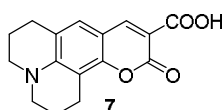
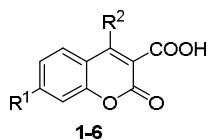
**Obrázek 8. Ukázky malých organických fluoroforů s excitačním maximem do 500 nm.** A) heterocykly s kyslíkem: 1 – benzopyran (kumarin), 2 – benzofuran, 3 – naftopyran, 4 – naftofuran; B) heterocykly s dusíkem: 1 – phanquinon, 2 – ftalimid, 3 – nitrobenzofurazan, 4 – dihydrokarbazol; C) heterocykly se sírou; D) barviva s naftalénovým jádrem.

Kumariny představují jednu z nejvšestrannějších skupin fluoroforů. Jejich strukturálním základem je 3-oxo-3H-benzopyran a jsou charakteristické emisí v modré oblasti spektra (410-470 nm), vysokým kvantovým výtěžkem fluorescence, dobrou

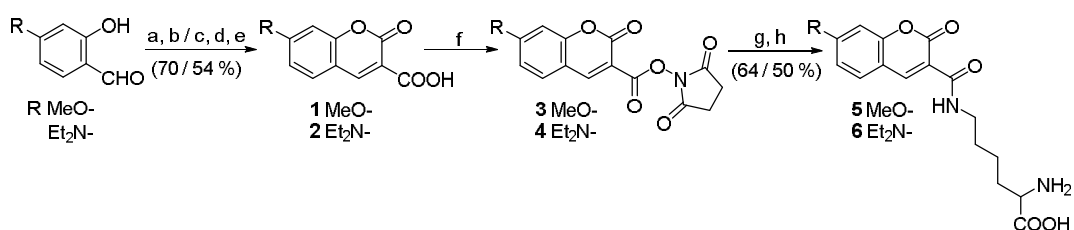
rozpuštěností a nízkou toxicitou (Wagner, 2009). Jejich spektroskopické vlastnosti závisí na jednotlivých substituentech základní jednotky (Tabulka 2).

**Tabulka 2. Spektrální vlastnosti derivátů kumarin-3-karboxylové kyseliny.** Měřeno <sup>a</sup>0,1M Tris, pH 9,0; <sup>b</sup>MeOH (Adronov a kol., 2000, Szijjarto a kol., 2013)

Látka	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ex <sub>max</sub> [nm]	em <sub>max</sub> [nm]
<b>1</b>	MeO-	H-	335 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>
<b>2</b>	Et <sub>2</sub> N-	H-	407 <sup>a</sup>	470 <sup>a</sup>
<b>3</b>	Et <sub>2</sub> N-	COOH-	395 <sup>a</sup>	543 <sup>a</sup>
<b>4</b>	OH-	H-	386 <sup>a</sup>	448 <sup>a</sup>
<b>5</b>	Br-	H-	352 <sup>b</sup>	414 <sup>b</sup>
<b>6</b>	4MeOBnO-	H-	372 <sup>b</sup>	413 <sup>b</sup>
<b>7</b>	-	-	444 <sup>b</sup>	487 <sup>b</sup>



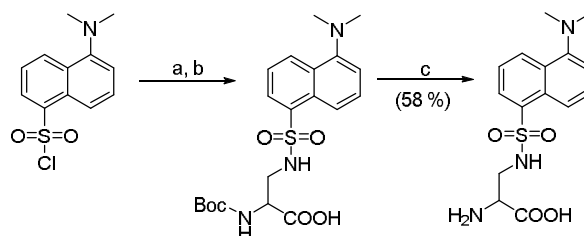
Kumarinové deriváty byly použity například k modifikaci lysinu (Berthelot a kol., 2004). Autoři nejprve připravili fluorofory Knoevenagelovou kondenzací salicylaldehydů s diethylmalonátem v přítomnosti piperidinu a následnou alkalickou hydrolyzou esteru. Poté aktivovali karboxylovou skupinu *N*-hydroxysukcinimidem pomocí DCC a zkonduzovali s chráněným lysinem. Chránicí skupinu následně odstranili pomocí HCl (Schéma 1). Oproti látkám **1** a **2** vykazovaly vzniklé produkty emisní maximum posunuté směrem k červené oblasti (**5** ex<sub>max</sub>/em<sub>max</sub> = 407/480 nm; **6** ex<sub>max</sub>/em<sub>max</sub> = 335/404 nm, 50 μM v 0,1M Tris-HCl, pH 9,0).



**Schéma 1. Syntéza fluorescenčně značeného lysinu pomocí kumarinových fluoroforů.** a – diethylmalonát, piperidin, EtOH, reflux, 12h; b – 20% NaOH, reflux, 2h, 12M HCl, 0 °C; c – diethylmalonát, piperidin, MeCN/toluen reflux, 12 h; d – 0,5M NaOH, MeOH, reflux; e – 2M HCl; f – DCC, NHS, DMF, 0 °C, 2 h nebo -10 °C, 20 h; g - Fmoc-Lys-OH, DIPEA, DMF, 0 °C, 30 min, **3** nebo **4**, lt, 2 h; h – 2M HCl, 4 °C, 12 h.

Hojně jsou využívány i aromatické fluorofory s naftalenovým jádrem, mezi něž patří 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonyl chlorid, neboli dansyl chlorid (ex<sub>max</sub>/em<sub>max</sub> = 337/492 nm, měřeno v chloroformu po připojení hexylaminu). Ten je běžně používán pro modifikaci aminokyselin při sekvencování proteinů a analýze aminokyselin (Gray, 1972). Byl použit například pro fluorescenční značení alaninu (Summerer a kol., 2006). K syntéze byla zvolena jako výchozí látka *N*<sub>α</sub>-Boc-L-2,3-

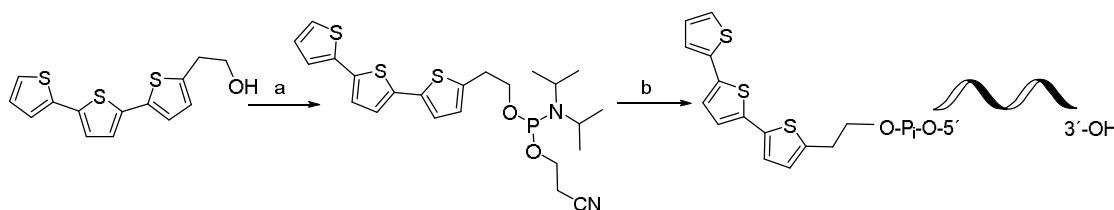
diaminopropanová kyselina, na kterou byl připojen dansyl v DCM za použití  $\text{Et}_3\text{N}$  jako báze. Chránící skupina byla odstraněna pomocí trifluoroctové kyseliny (Schéma 2). Dansylalanin byl poté začleněn do lidské superoxiddismutasy a použit pro sledování rozkládání tohoto protein v přítomnosti guanidinium chloridu.



**Schéma 2. Syntéza dansylalaninu.** a –  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM, 0 °C, Boc-Dap-OH, lt, 18 h; b – TFA, lt, 4 h; c – NaOH, HCl.

Užitečné optické vlastnosti vykazují rovněž některé dusíkaté heterocykly jako benzoaxiadiazoly, akridony, akridiny či 4,7-fenanthrolin-5,6-diony (phanquinony). Známým fluoroforem s benzoaxiadiazolovým jádrem je 4-chlor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl). Toto barvivo vykazuje excitační maximum přibližně 470 nm a emisní 530 nm, přičemž k emitaci dochází pouze po spojení s aminem. Používá se také jako derivatizační činidlo aminokyselin v HPLC analýzách či proteinů při elektroforézách (Goncalves, 2009).

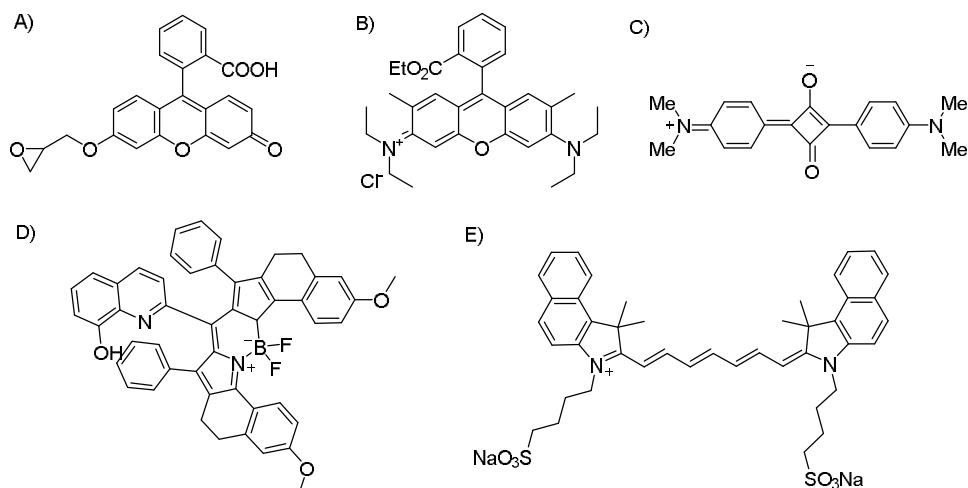
Oligothiofeny jsou simé heterocyklické sloučeniny s vlastní fluorescencí vyznačující se snadnou modifikací. Primárním zástupcem těchto látek je terthiofen ( $\text{ex}_{\text{max}}/\text{em}_{\text{max}} = 354 \text{ nm}/450 \text{ nm}$ , měřeno ve vodě), jenž byl kupříkladu připojen na oligonukleotidy prostřednictvím fosforamiditové vazby (Schéma 3) (Capobianco a kol., 2005).



**Schéma 3. Syntéza fluorescenčně značeného oligonukleotidu pomocí terthiofenu.** a – DIPEA, DCM, 2-kyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorfosfit, 30 min; b – MeCN, konc. amoniak, 50 °C.

## 2.2 Malé organické fluorofory s emisí nad 500 nm

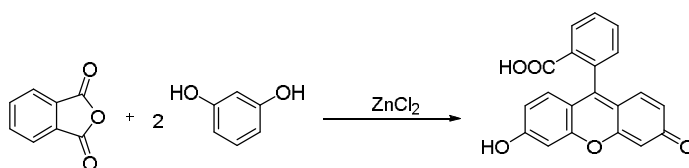
Fluorofory s emisí nad 500 nm jsou strukturně mnohem složitější, se zdatelně větší molekulovou hmotností, tvořeny vysoce konjugovanými systémy (Obrázek 9).



**Obrázek 9. Ukázky malých organických fluorescenčních značek s emisí nad 500 nm.** A – Fluoresceinové barvivo, B – Rhodaminové barvivo, C – Squarainové barvivo, D – BODIPY barvivo, E – Kyaninové barvivo.

Xanthenová barviva patří mezi nejstarší syntetické fluorofory a jejich základním strukturním motivem je *9H*-xanthen, neboli *10H*-9-oxoanthracen. Lze je rozdělit do tří podskupin na fluoresceiny, rhodaminy a eosiny.

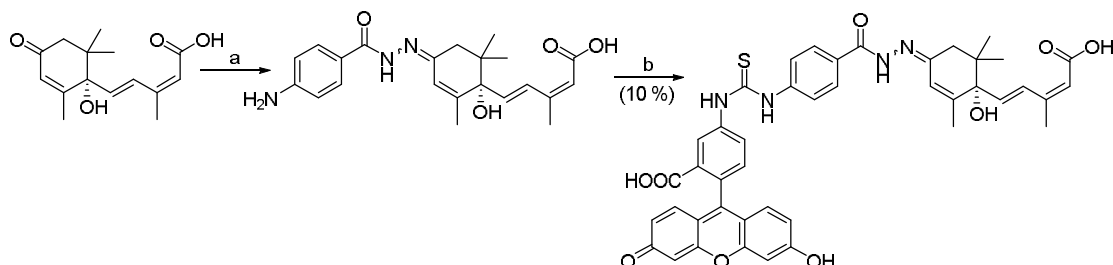
Základním zástupcem fluoresceinů je fluorescein, neboli 2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoová kyselina, kterou lze poměrně jednoduše připravit Friedel-Craftsovou acylací z anhydridu kyseliny ftalové a 1,3-dihydroxy-benzenu v přítomnosti chloridu zinečnatého (Schéma 4).



**Schéma 4. Syntéza fluoresceinu Friedel-Craftsovou reakcí.**

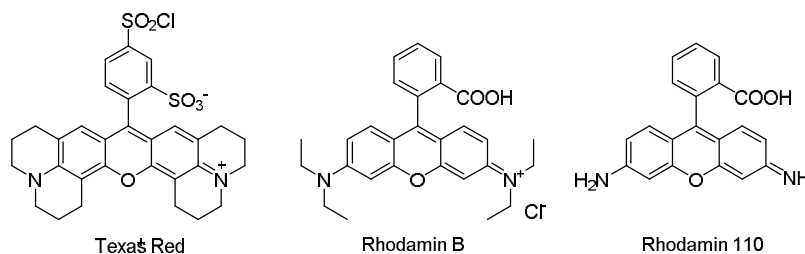
Jedná se o vysoce fluorescenční molekulu, jejíž absorpční a emisní vlastnosti jsou silně pH dependntní ( $\text{ex}_{\text{max}}/\text{em}_{\text{max}} = 490/514 \text{ nm}$ , měřeno v 0,1M Tris, pH 8,0). Tento fluorofor se běžně používá pro aplikace konfokální laserové skenovací mikroskopie či průtokové cytometrie (Sun a kol., 1997). Vzhledem k jeho omezené rozpustnosti a nízké reaktivitě se k fluorescenčnímu značení používají přednostně jeho reaktivnější formy (fluorescein-5-isothiokyanát (FITC) a 6-FAM fosforamidit). FITC s  $\text{ex}_{\text{max}} = 492 \text{ nm}$  a  $\text{em}_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$  (měřeno ve vodě) reaguje s nukleofily jako primárními

aminoskupinami, za vzniku thiomocovinového můstku  $-\text{NH}(\text{C}=\text{S})\text{NH}-$ , nebo s thioley. Tento mechanismus byl uplatněn při značení kyseliny abscisové (Schéma 5), kdy reakcí ketoskupiny kyseliny s 4-aminofenylkarbonylhydrazidem v kyselém prostředí vznikl meziprodukt, na jehož primární aminoskupinu byl následně připojen FITC (Asami a kol., 1997).



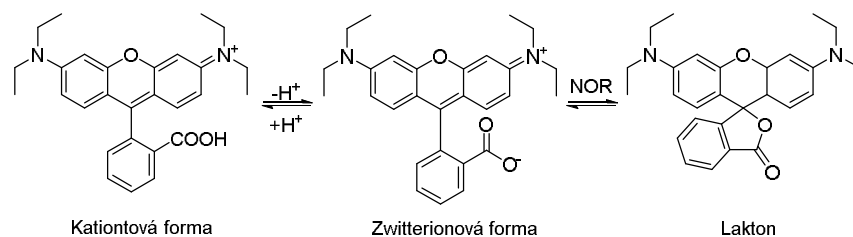
**Schéma 5. Příprava fluorescenčně značené kyseliny abscisové pomocí FITC.** a – 4-aminobenzhydrazid, MeOH, AcOH, 8 h; b – FITC, Et<sub>3</sub>N, THF.

Rhodaminy, syntetická organická barviva, se všeobecně využívají k charakterizaci propustnosti lipidové membrány, dynamice micel a studiu enzymatické aktivity. Typickými představiteli jsou Texaská červeň ( $\text{ex}_{\text{max}}/\text{em}_{\text{max}} = 596/615 \text{ nm}$ ), Rhodamin 110 ( $\text{ex}_{\text{max}}/\text{em}_{\text{max}} = 496/517 \text{ nm}$ ) a Rhodamin B ( $\text{ex}_{\text{max}}/\text{em}_{\text{max}} = 553/627 \text{ nm}$ ) (Obrázek 10).



**Obrázek 10. Struktura třech zástupců rhodaminů – Texaská červeň, Rhodamin B a Rhodamin 110.**

Rhodamin B se používá jako pH indikátor a fluorofor v mnoha biologických analýzách. V kyselém prostředí se nachází ve formě kationtů a jeho karboxylová skupina je protonizována (Schéma 6). Avšak v bazickém prostředí dochází k disociaci a přeměně na obojetný iont. V přítomnosti málo polárního organického rozpouštědla je následně zwitterionová forma barviva schopna procházet reverzní konverzí na bezbarvý laktón v důsledku přerušení  $\pi$  konjugace chromoforu (Beija a kol., 2009).



**Schéma 6. Molekulární struktury tří forem Rhodaminu B v závislost na pH.** NOR – nepolární organické rozpouštědlo.

Dalšími fluorescenčními sloučeninami emitujícími nad 500 nm jsou kyaniny, také nazývané polymethinová barviva, která jsou tvořena dvěma heterocyklickými kruhy spojenými polymethinovým řetězcem, jehož délka určuje spektrální rozsah. Ten se nachází v rozmezí od 400 do 800 nm v závislosti na struktuře (Tatikolov, 2012). Kyaninová barviva jsou využívána při genetické analýze, DNA sekvenování či *in vivo* zobrazování.

Do polymethinových barviv lze též zařadit squarainy používané jako senzory pro ionty. Tyto organická barviva se vyznačují rezonančně stabilními amfoterními strukturami s cyklobutendiyliumdiolátovým jádrem a absorpčním a emisním maximem mezi 630-670 nm, respektive 650-700 nm.

Fluorescenční značky označované jako BODIPY jsou založeny na 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu, který může být modifikovaný v pozici 1, 3, 5, 7 a 8. Jedná se o velmi univerzální fluorofory, které jsou pro biologické aplikace zajímavé z důvodu vysokého molárního absorpčního koeficientu, intenzivní fluorescence, fotostabilitě a necitlivosti k rozpouštědlům či pH. Jejich excitace a emise lze ovlivnit úpravou pyrrolového jádra (Fayed, 2009). Často vykazují optické vlastnosti lepší než fluorescein, tetramethylrhodamin a jiná barviva s delší vlnovou délkou (Goncalves, 2009).

### 3 Cytokiny a fluorescence

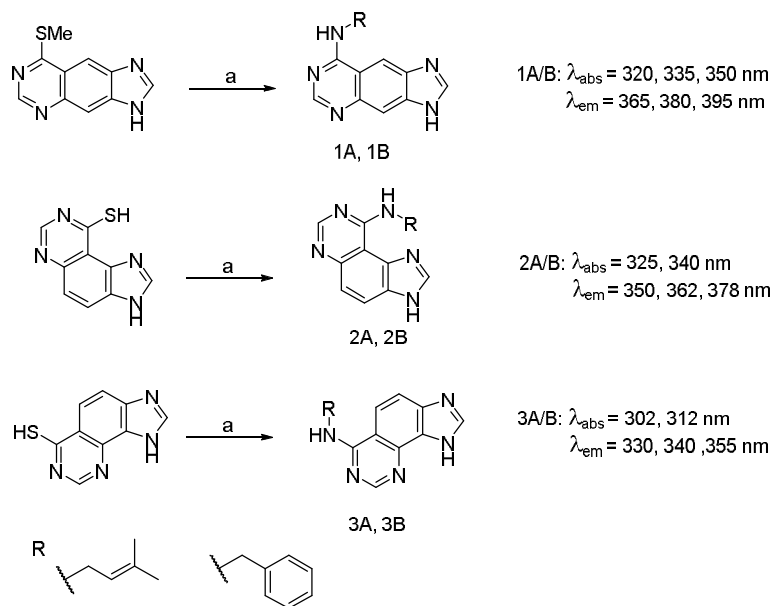
Fluorescence ve spojení s cytokininy představuje významný nástroj pro studium cytokininového metabolismu, mechanismu transportu a signalizace. Z literatury jsou obecně známy dva způsoby tohoto sloučení. Prvním z nich je příprava derivátů, které mimikují cytokiny a vykazují fluorescence, a druhým je připojení externího fluoroforu k cytokininu prostřednictvím oddalovacího řetězce.

#### 3.1 Fluorescenční deriváty cytokininů

Prvními fluorescenčními cytokininovými analogy publikovanými v roce 1976 byla benzoanologa BAP a iP připravena za vysokých teplot v tlakových ampulích reakcí



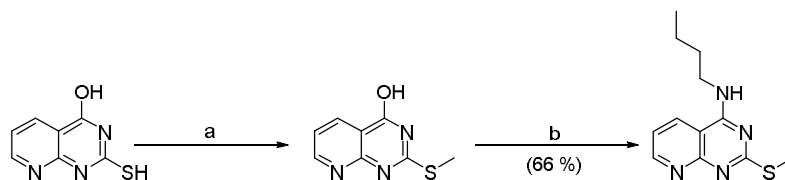
odpovídajících lineárních methylthio- nebo nelineárních thio- prekurzorů s příslušným aminem (Schéma 7).



**Schéma 7. Syntéza a spektrální vlastnosti imidazo[4,5]chinazolinových analogů cytokininů.**  
 a – benzylamin nebo 3-methylbut-2-enylamin, EtOH, 200 °C, 48 h.

Mezi jednotlivými deriváty BAP a iP patřící do určité skupiny nebyl z hlediska spektrálních vlastností zásadní rozdíl. Vzniklé lineární sloučeniny **1** ( $\text{ex}_{\text{max}} = 320, 335, 350 \text{ nm}$ ,  $\text{em}_{\text{max}} = 365, 380, 395 \text{ nm}$ , měřeno ve vodě;  $\Phi = 0,07/0,14$  vztaženo k chininu v 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a proximální **2** ( $\text{ex}_{\text{max}} = 325, 340 \text{ nm}$ ;  $\text{em}_{\text{max}} = 350, 362, 378 \text{ nm}$ , měřeno ve vodě;  $\Phi = 0,09/0,12$  vztaženo k chininu v 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) měly nezanedbatelný kvantový výtěžek fluorescence, zatímco látky typu **3** ( $\text{ex}_{\text{max}} = 302, 312 \text{ nm}$ ;  $\text{em}_{\text{max}} = 330, 340, 355 \text{ nm}$ , měřeno ve vodě) vykazovaly velmi nízkou fluorescenci pravděpodobně v důsledku vodíkového transferu mezi atomy N1 a N9. Biologická aktivita těchto látek byla otestována v tabákovém kalusovém testu a prokázána u lineárních derivátů **1** s nejvyšší aktivitou dosaženou při koncentraci  $10 \mu\text{M}$ , přičemž aktivnější byl isoprenoidní derivát. Pozitivní kontroly (iP a BAP) dosáhly stejné aktivity při koncentraci  $0,1 \mu\text{M}$  (Sprecker a kol., 1976).

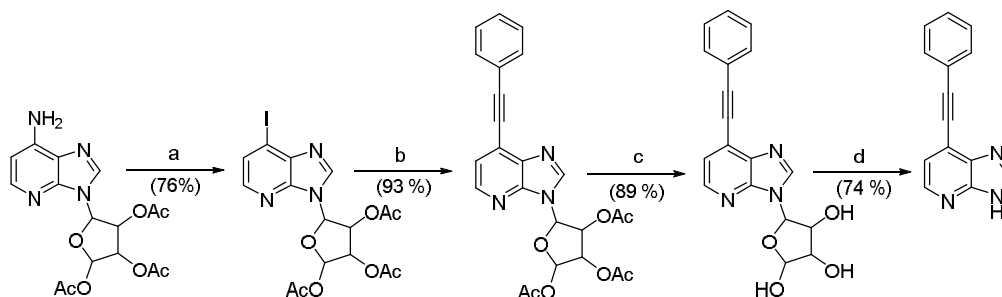
V roce 1979 byla publikována syntéza a biologická aktivita 4-substituovaných 2-methylthiopyrido[2,3-d]pyrimidinů (Iwamura a kol., 1979). Nejúčinnější látkou s anticytokininovou aktivitou z této série byl 4-butylamino-2-methylthiopyrido[2,3-d]pyrimidin (BAMPP), který byl připraven z 2-sulfanylpyrido[2,3-d]pyrimidin-4-olu pomocí methylace  $\text{MeI}$ , následné chlorace intermediátu  $\text{POCl}_3$  za refluxu a reakce s butan-1-aminem (Schéma 8).



**Schéma 8. Syntéza BAMPP.** a – CH<sub>3</sub>I, CH<sub>3</sub>ONa; b – POCl<sub>3</sub>, reflux, butan-1-amin, *n*-butanol.

V následné studii byly u této látky stanoveny spektrální vlastnosti ( $ex_{max}/em_{max} = 338/402$  nm, 9,1 μM ve vodě;  $\Phi = 0,47$ , ve srovnání s chinin sulfátem v 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a byla použita jako sonda při izolaci cytokinin-vazebných proteinů z kalusových buněk tabáku. Pomocí BAMPP byly identifikovány dva druhy proteinů s vysokou afinitou k cytokininům ve frakci rozpustných proteinů a jedno vazebné místo na ribosomech (Hamaguchi a kol., 1985).

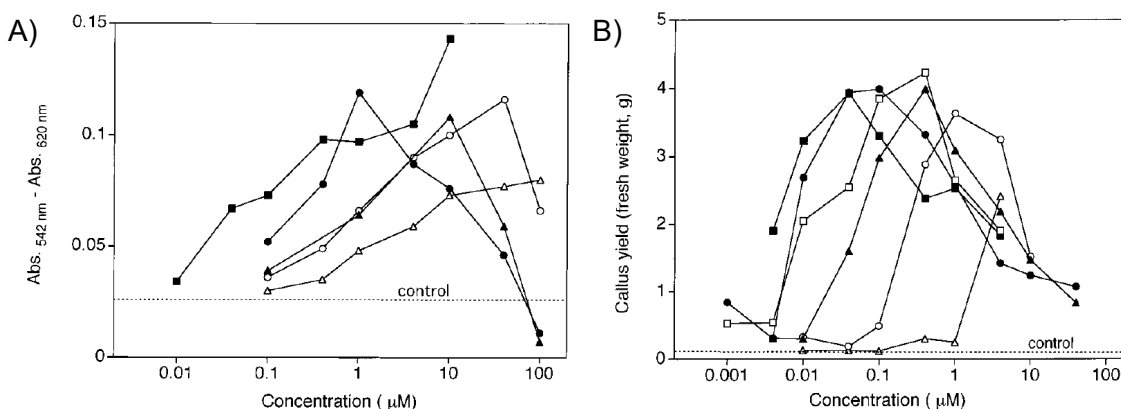
Schopnost silné fluorescence byla také ukázána u 7-fenylethynylimidazo[4,5-b]pyridinu (FEIP) a jeho ribosidu (Nishikawa a kol., 2000). Připraveny byly reakcí peracetylovaného 1-dezaadenosinu s isoamylnitritem a diiodmethanem za vzniku 6-jodderivátu, po níž následovala palladiem katalyzovaná Sonogashira cross-couplingová reakce a ochránění acetylů v bazickém prostředí, čímž prvně vznikl příslušný ribosid. Odstraněním ribosy v kyselém prostředí byla vytvořena volná báze (Schéma 9).



**Schéma 9. Syntéza 7-fenylethynylimidazo[4,5-b]pyridinu.** a – CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub>, isoamylnitrit, MeCN, UV, reflux; b – PhC≡CH, (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N/MeCN, reflux; c – NH<sub>3</sub>/MeOH, d – 0,1M HCl/1,4-dioxan, reflux.

Měření spektrálních vlastností vzniklých sloučenin byla stanovena excitace obou látek na 310 nm, emise volné báze na 363 nm a ribosidu na 373 nm (5 μM ve vodě). Tyto parametry byly studovány rovněž za kyselých a bazických podmínek a srovnávány s 6-fenylethynylpurinem ( $ex_{max}/em_{max} = 330/397$  nm) a jeho ribosidem ( $ex_{max}/em_{max} = 328$  nm/416 nm). V porovnání s vodou došlo k nejvýraznějším změnám v relativní intenzitě fluorescence v přítomnosti 0,1M NaOH. FEIP posílil intenzitu fluorescence z 14,8 na 375 (25x), a současně testovaná purinová báze dokonce až 70x, z 10,2 na 715. Oproti tomu jejich ribosidy vykazovaly nižší intenzitu než ve vodě. Alkynylové deriváty byly taktéž navzájem porovnány ve třech různých

cytokininových biologických testech. V Amaranthovém biotestu byly aktivnější volné báze než odpovídající ribosidy, přičemž nejúčinnější látkou byl FEIP. Obdobné aktivity daných látek bylo dosaženo i v tabákovém kalusovém testu (Graf 1).

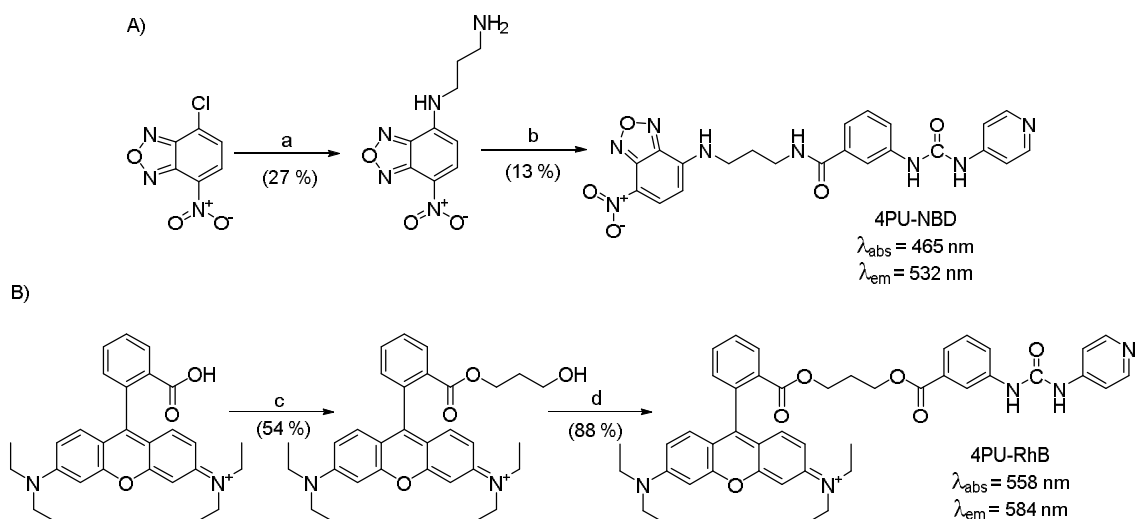


**Graf 1. Biologická aktivita FEIP v A) Amaranthovém a B) tabákovém kalusovém biotestu.** ■ – BAP, □ – kinetin, ▲ – 6-fenylethynylpurin, Δ – 6-fenylethynylpurin ribosid, ● – FEIP, ○ – FEIP ribosid, převzato z Nishikawa a kol., 2000.

### 3.2 Fluorescenčně značené cytokiny

V rámci druhého způsobu spojení fluorescence a cytokininů prostřednictvím externích fluoroforů a oddalovacího řetězce byly publikovány pouze dva fluorescenčně značené deriváty syntetického cytokininu *N*-fenyl-*N'*-(4-pyridyl)močoviny (4PU). Pro minimalizaci stérické zábrany byly vybrány tříuhlíkaté řetězce zakončené v případě NBD primárními aminoskupinami, respektive hydroxyskupinami v případě Rhodaminu B. V rámci syntetického postupu byla oddalovací raménka připojena k fluoroforům a poté k karboxyderivátu 4PU (Schéma 10).

Při značení pomocí NBD-Cl byl na fluorofor nasubstituován 1,3-diaminopropan a poté v přítomnosti *N,N*<sup>θ</sup>-dicyclohexylkarbodiimidu (DCC) a 2,4-dinitrofenolu byla výsledná 3-aminopropyl sloučenina přímo připojena k 4PU za vzniku 4PU-NBD ( $abs_{max}/em_{max} = 465/532$  nm, měřeno v ethanolu). Při použití Rhodaminu B byly jako kondenzační činidla použity 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP) a DCC. Výsledný konjugát 4PU-RhB vykazoval následující vlastnosti  $abs_{max}/em_{max} = 558/584$  nm (měřeno ve vodě).



**Schéma 10. Příprava fluorescenčního značení 4PU pomocí A) NBD-Cl nebo B) Rhodaminu B.** a – 1,3-diaminopropan, EtOH, 75 °C, 1 h; b – 4PU, DCC, 2,4-dinitrofenol, DMF, 45 °C, 3 h; c – DCC, DMAP, 1,3-propandiol, DMF, 45 °C, 4 h; d – DMF, DCC, DMAP, 4PU, 45 °C, 4 h.

Poté byla u vzniklé sloučeniny 4PU-RhB pomocí fluorescenční korelační spektroskopie prokázána silná interakce s VrCSBP, vazebným proteinem pocházejícím z klíčků fazole (*Vigna radiata*), přičemž byla  $K_d$  stanovena na  $629 \pm 64 \text{ nM}$ . Interakce VrCSBP s dalšími ligandy (Z, iP, 4PU či giberelinem GA4) byly dále studovány v kompetičním testu pomocí 4PU-RhB. Ze získaných disociačních konstant (Tabulka 3) vyplynulo, že syntetické cytokininy vykazují vyšší afinitu k VrCSBP než přirozeně se vyskytující cytokininy, z nichž se nejlépe vázal iP. Zjistilo se také, že giberelin GA4 interaguje s VrCSBP 9x silněji než s iP, což prokázalo, že VrCSBP není výlučně cytokinin-vazebný protein (Zawadzki a kol., 2010).

**Tabulka 3. Interakce vybraných ligandů s VrCSBP.**

Ligand	Odhadovaná $K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]
zeatin	$409 \pm 32$
iP	$196 \pm 9$
4PU	$64 \pm 6$
CPPU	$22 \pm 0,8$
GA4	$22,5 \pm 1,3$

# **Experimentální část**

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Chemikálie

Benzylamin, 4-chlor-7-nitrobenzofuran, dansyl chlorid, 1,6-diaminohexan, *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid, 4-diethylaminosalicylaldehyd, 1,2-diaminoethan, furfurylamin, *N*-hydroxysukcinimid, kumarin-3-karboxylová kyselina, piperidin, Rhodamin B, trifluoroctová kyselina a deuterovaný dimethylsulfoxid byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Triethylamin a kyselina chlorovodíková (35%) byly dodány z firmy Penta, 2,6-dichlor-9*H*-purin od firmy Olchemim s.r.o a diethyl-malonát z firmy Arcos Organic. Rozpouštědla jako acetonitril, dichlormethanu, dimethylsulfoxid, chloroform, methanol, absolutní ethanol, *n*-propanol a další chemikálie jako hydrogenuhličitan sodný byly zakoupeny od firmy Lach:Ner. *terc*-Butyl (2-(6-chlor-9*H*-purin-9-yl)ethyl)karbamát byl připraven v oddělení Chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná.

Suchá rozpouštědla (acetonitril a dichlormethan) byla připravena destilací nad hydridem vápenatým a další (dimethylsulfoxid a methanol) byla vysušena stáním nad aktivovaným 3 Å molekulovým sítem (24 hodin – 300 °C) pod chlorkalciovou zátkou po dobu nejméně 72 hodin (Bradley a kol., 2010).

### 4.2 Metody

Ke kontrole průběhu reakcí sloužila tenkovrstevná chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách potažených silikagelem 60 F<sub>254</sub> (Merck). Jako mobilní fáze byly využity chloroform/methanol (9:1 nebo 4:1), *n*-propanol/amoniak/voda (5,5:1:3,5) a chloroform/methanol/amoniak (6:1:0,01). K vizualizaci byla použita UV lampa Camag (254 nm nebo 366 nm) a u některých sloučenin byl využit barvicí roztok 1,5% ninhydrin v *n*-butanolu obsahující 3 % AcOH.

Sloupcová kapalinová chromatografie byla prováděna za účelem purifikace připravených sloučenin na silikagelu DAVISIL LC60A 40-63 Micron (Grace Davison Discovery Sciences, UK) za použití mobilní fáze chloroform/methanol nebo chloroform/methanol/amoniak s gradientem methanolu.

Vysokoúčinným kapalinovým chromatografem (HPLC Alliance 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA, USA) na koloně C18 Symmetry (Waters, UK) o délce 150 mm a průměru 2,1 mm s pórovitostí 5 µm byla ověřena čistota připravených sloučenin. Vzorby byly rozpuštěny v DMSO a naředěny do MeOH na koncentraci 10 µg/ml a v objemu 10 µl nanoseny do počáteční mobilní fáze. Separace probíhala gradientovou elucí (0' – 90% A; 25' – 10% A; 35' – 10% A; 36' – 90% A; 45' – 10% A) o průtoku 0,25 ml/min. Mobilní fázi A tvořil 15mM mravenčan amonný o pH 4,0, mobilní

fázi B MeOH. Analyty byly detekovány UV-VIS detektorem s diodovým polem (PDA 2996, Waters, UK) měřícím v rozmezí vlnových délek 210–400 nm.

Molekulová hmotnost připravených látek byla stanovována na hmotnostním spektrometru s analyzátozem doby letu QqTOF (Waters, UK). Z HPLC byl veden eluent do iontového zdroje (ESI) vyhřívaného na 120 °C. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 3 kV, na vstupní štěrbině 20 V. K desolvataci docházelo při 250 °C. Jako zmlžovací i desolvatační plyn byl použit dusík. Ionizace probíhala v pozitivním (ESI<sup>+</sup>) módu a následující detekce ve FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-1000.

Spektra nukleární magnetické rezonance byla změřena na spektrometru Jeol ECA-500 při frekvencích 500 MHz (<sup>1</sup>H) a 125 MHz (<sup>13</sup>C). Vzorky byly rozpuštěny v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) a chemické posuny byly kalibrovány na signál DMSO-*d*<sub>6</sub>  $\delta$  <sup>1</sup>H = 2,49 ppm,  $\delta$  <sup>13</sup>C = 39,5 ppm.

Absorpční spektra připravovaných látek byla proměřena na spektrometru Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Inc., USA). Vzorky byly rozpuštěny v DMSO a doplněny methanolem na výslednou koncentraci 1mM (1 % DMSO).

Fluorescenční emisní a excitační spektra byla měřena na spektrofluorimetru Hitachi F4500. Vzorky byly rozpuštěny v DMSO a doplněny methanolem na výslednou koncentraci 10 $\mu$ M (1 % DMSO).

## 4.3 Syntéza

### 4.3.1 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylová kyselina (1)

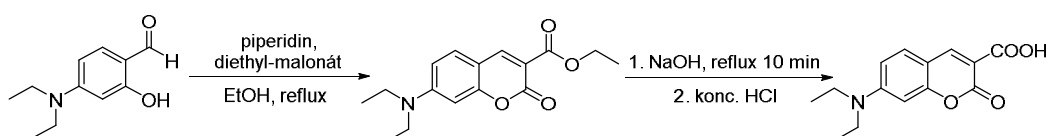


Schéma 11. „One pot“ syntéza DEAC-OH Knoevenagelovou kondenzací s následnou bazickou hydrolýzou ethylesteru.

K suspenzi 4-diethylaminosalicylaldehydu (3,89 g, 20 mmol) v absolutním EtOH (60 ml) byl přidán diethylmalonát (6 ml, 40 mmol) a piperidin (2 ml). Reakční směs byla míchána za refluxu. Po 6 hodinách byl přidán 10% NaOH (60 ml) a míchání za refluxu pokračovalo dalších 15 minut. Po ochlazení a okyselení na pH 2 pomocí koncentrované HCl vznikla oranžová suspenze. Pevný podíl byl zfiltrován, promyt vychlazenou vodou a vysušen v exsikátoru.

### 4.3.2 2-chlor-6-substituované deriváty purinu (2, 3)

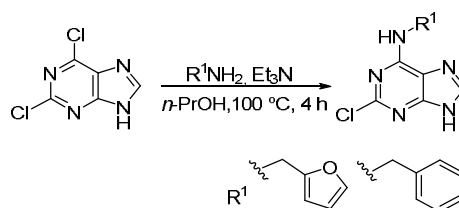


Schéma 12. Obecný postup přípravy 2-chlor-6-substituovaných derivátů cytokininů.

2,6-dichlor-9H-purin byl společně s furfurylaminem nebo benzylaminem (1,2 ekv.), Et<sub>3</sub>N (2,5 ekv.) míchán v *n*-PrOH (40 ml) 4 hodiny za refluxu. Reakční směs byla poté vychlazená při 4 °C přes noc. Vniklá pevná látka byla zfiltrována, promyta *n*-PrOH (15 ml), vychlazenou vodou a vysušena při 50 °C.

### 4.3.3 C2-substituované prekurzory pro fluorescenční značení (4-7)

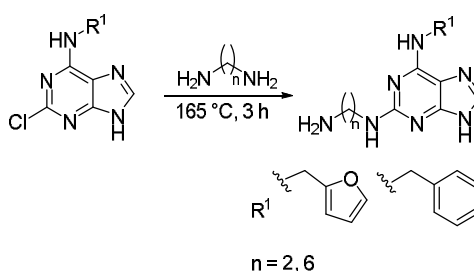


Schéma 13. Obecný postup přípravy C2-substituovaných derivátů cytokininů.

Látka **1** nebo **2** (3,85 mmol) byla zahřívána s nadbytkem příslušného diaminu (20 ekv.) v tlakové ampuli 3 hodiny při 165 °C. Následně byl nadbytek aminu odstraněn za sníženého tlaku. Vzniklý odparek byl rozsuspendován ve vodě (100 ml) a pevný podíl byl zfiltrován, promyt vodou a vysušen při 50 °C. Sloučeniny byly přečištěny pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol/amoniak s gradientem MeOH (19:1:0-8:1:0,01).



#### 4.3.4 N9-substituované prekurzory pro fluorescenční značení (10-11)

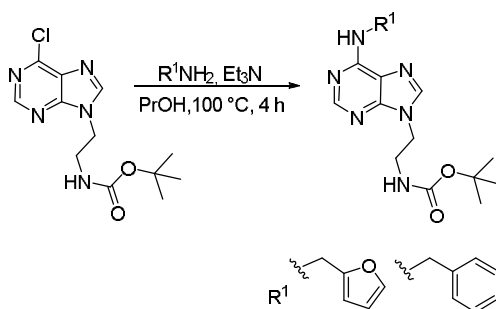


Schéma 14. Obecný postup nukleofilní substituce N9 modifikovaných purinů.

*tert*-Butyl [2-(6-chlor-9*H*-purin-9-yl)ethyl]karbamát byl společně s furfurylaminem nebo benzylaminem (1,2 ekv.), Et<sub>3</sub>N (2,5 ekv.) míchán v *n*-PrOH (17 ml) 4 hodiny za refluxu. Reakční směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce. Vzniklý odparek byl rozsuspendován ve vychlazené vodě a uchován při 4 °C přes noc. Pevný podíl byl zfiltrován, promyt vychlazenou vodou a vysušen v exsikátoru.

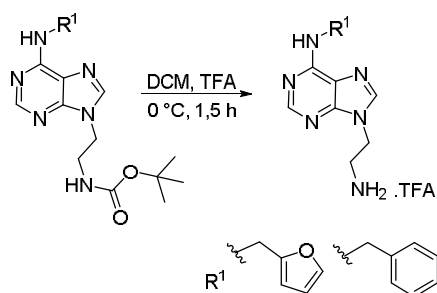


Schéma 15. Deprotekce *Boc*-N9-substituovaných derivátů cytokininů.

Vzniklá sloučenina **8** nebo **9** (0,35 mmol) byla míchána v suchém DCM (2,77 ml) 30 minut při 0 °C za inertní atmosféry. K suspenzi byla přikapána TFA (2,77 ml). Výsledná reakční směs byla míchána 1 hodinu za stejných podmínek a poté zahuštěna vakuovou destilací. Zbytky TFA byly odstraněny několikanásobnou destilací s MeOH (10x 2 ml). Vzniklá sloučenina **10** nebo **11** ve formě gelu byla bez purifikace a bližší charakterizace použita v dalších reakcích.

### 4.3.5 Značení 4-chlor-7-nitrobenzofurazanem (12-15 a 32, 33)

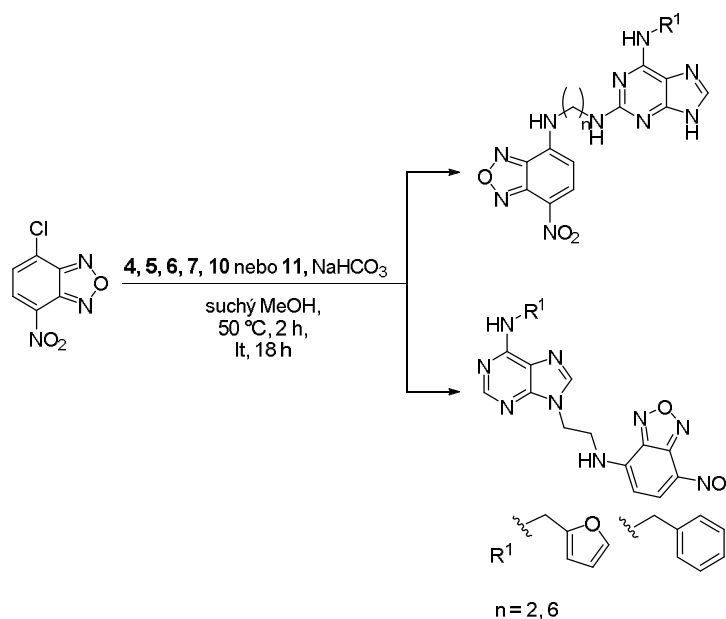


Schéma 16. Obecný postup značení 4-chlor-7-nitrobenzofurazanem.

K suspenzi **4, 5, 6, 7, 10** nebo **11** (0,35 mmol) a  $\text{NaHCO}_3$  (3,5 ekv., 7 ekv. pro **10** a **11**) v suchém MeOH (3 ml) temperované 30 minut při  $50\text{ }^\circ\text{C}$  pod inertní atmosférou byl přidán NBD-Cl (1,2 ekv.) Výsledná reakční směs byla ochráněna před světlem, míchána 2 hodiny při  $50\text{ }^\circ\text{C}$  a poté za laboratorní teploty přes noc. Po zahuštění na rotační vakuové odparce byl tmavě rezavý pevný odparek rozsuspendován ve vychlazené vodě. Vzniklý pevný podíl byl zfiltrován, promyt vychlazenou vodou, vysušen v exsikátoru a přečištěn za pomoci sloupcové kapalinové chromatografie a mobilní fáze chloroform/methanol a gradientem MeOH (100:1-15:1).

### 4.3.6 Značení Rhodaminem B (16-19)

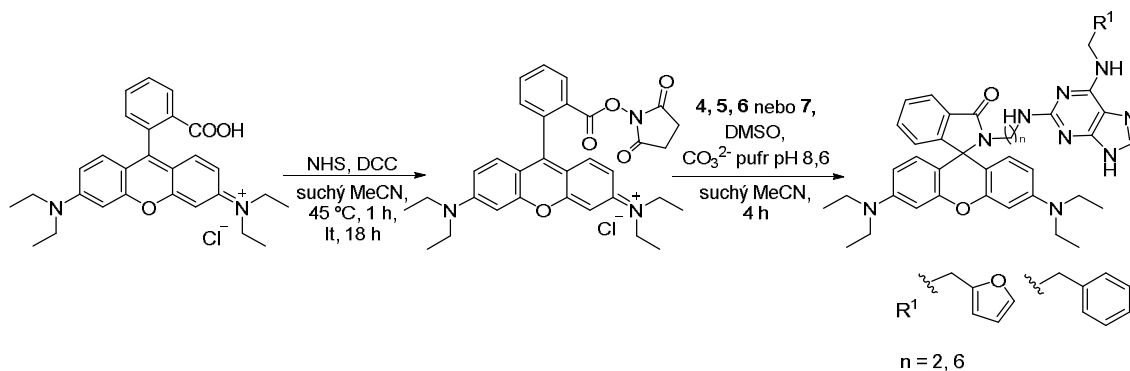


Schéma 17. Obecný postup značení Rhodaminem B.

Rhodamin B (0,208 mmol) byl společně s NHS (1,04 ekv.) při 45 °C a pod inertní atmosférou rozpuštěn v suchém MeCN (6 ml). Následně byl přidán DCC (1,16 ekv.). Reakční směs byla ochráněna před světlem a míchána při 45 °C 1 hodinu a poté za laboratorní teploty přes noc. Vzniklá suspenze byla zfiltrována, přičemž byl pevný podíl promyt suchým MeCN. Filtrát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce.

Vzniklý tmavě zelený odparek s kovovým odleskem byl rozpuštěn v suchém MeCN (4 ml) a přikapán do roztoku aminu **4**, **5**, **6** nebo **7** (1 ekv.) v Na/K uhličitanovém pufru pH 8,6 (2 ml) a DMSO (2 ml). Reakční směs byla za temna míchána 4 hodiny při laboratorní teplotě a poté vychlazena při 4 °C. Vzniklá pevná látka byla zfiltrována, promyta 5% NaHCO<sub>3</sub>, vychlazenou vodou a vysušena v exsikátoru do konstantní hmotnosti.

#### 4.3.7 Značení kumarin-3-karboxylovou kyselinou (20-23)

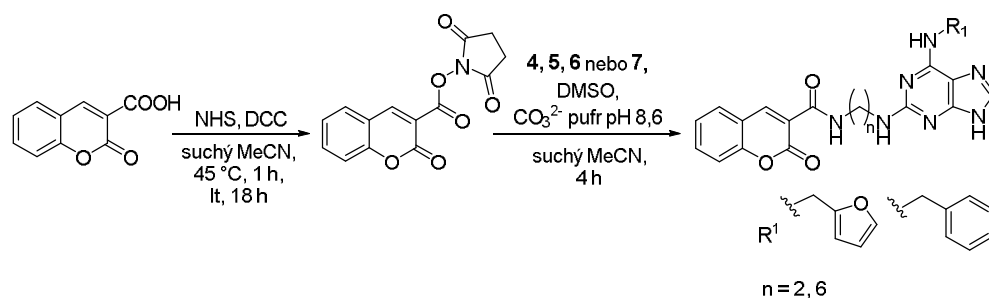


Schéma 18. Obecný postup značení kumarin-3-karboxylovou kyselinou.

Po rozpuštění kumarin-3-karboxylové kyseliny (0,208 mmol) a NHS (1,04 ekv.) v suchém MeCN (6 ml) při 45 °C pod inertní atmosférou byl do vzniklého roztoku přidán DCC (1,16 ekv.). Reakční směs byla za temna míchána při 45 °C 1 hodinu a následně za laboratorní teploty 18 h. Vytvořený pevný podíl byl zfiltrován a promyt suchým MeCN. Poté byl filtrát pomocí vakuové destilace zakoncentrován.

Vzniklý bílý pevný odparek rozpuštěný v suchém MeCN (2 ml) byl přikapáván do roztoku aminu **4**, **5**, **6** nebo **7** (1 ekv.) v Na/K uhličitanovém pufru pH 8,6 (2 ml) s DMSO (1 ml) a ochráněn před světlem byl míchán 4 hodiny za laboratorní teploty. Reakční směs byla následně vychlazena při 4 °C. Pevný podíl byl zfiltrován, promyt 5% NaHCO<sub>3</sub>, vychlazenou vodou, vysušen v exsikátoru a následně byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol a gradientem MeOH (100:1-15:1).

#### 4.3.8 Značení 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylovou kyselinou (24-27)

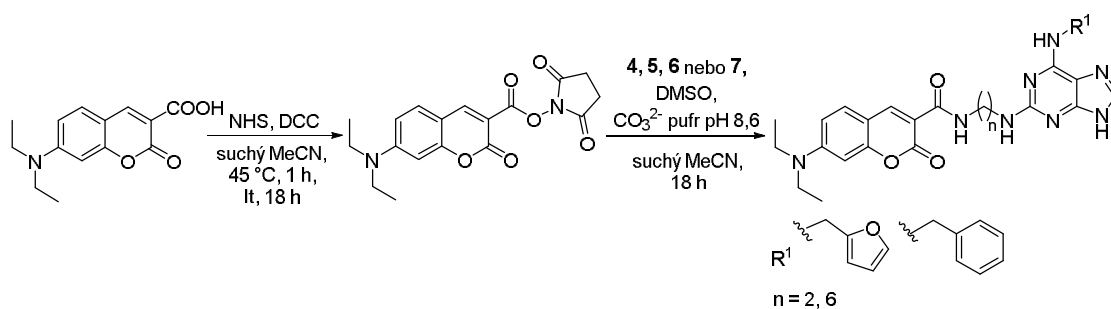


Schéma 19. Obecný postup značení 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylovou kyselinou.

Do roztoku 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylové kyseliny (0,208 mmol) a NHS (1,04 ekv.) v suchého MeCN (6 ml) byl při 45 °C pod inertní atmosférou přidán DCC (1,16 ekv.). Vzniklá reakční směs skryta před světlem byla míchána při 45 °C po dobu 1 hodiny a poté za laboratorní teploty přes noc. Následně byla vzniklá suspenze zfiltrována, promyta suchým MeCN a filtrát byl zakoncentrován na rotační vakuové odparce.

Roztok vzniklého odparku v suchém MeCN (3 ml) byl přikapáván k aminu 4, 5, 6 nebo 7 (1 ekv.) v Na/K uhličitanovém pufru pH 8,6 (2 ml) a DMSO (2ml). Reakční směs byla míchána za temna a laboratorní teploty 18 h. K suspenzi byla přidána voda (1 ml). Poté byla suspenze vychlazena při 4 °C, zfiltrována, promyta 5% NaHCO<sub>3</sub> a vychlazenou vodou. Pevný podíl byl vysušen v exsikátoru a následně byl přečištěn prostřednictvím sloupcové kapalinové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol a gradientem MeOH (100:1-15:1).

#### 4.3.9 Značení dansyl chloridem (28-31)

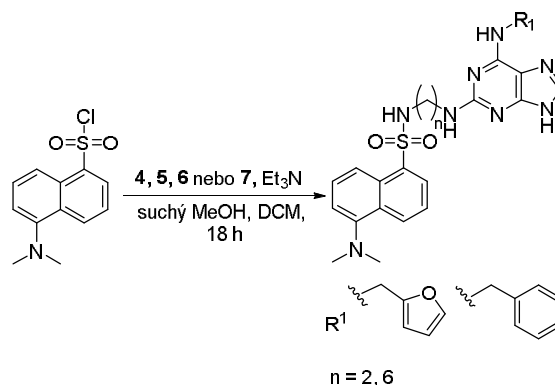


Schéma 6. Obecný postup značení dansyl chloridem.

Suspenze aminu 4, 5, 6 nebo 7 (0,36 mmol) v Et<sub>3</sub>N (2 ekv.), suchém MeOH (0,4 ml) a suchém DCM (3 ml) byla pod inertní atmosférou přikapávána do roztoku dansyl

chloridu (1,5 ekv.) v suchém DCM (2 ml). Před světlem chráněná reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 18 h. Po zakoncentrování na rotační vakuové odparce byl odparek rozsuspendován ve vychlazené vodě. Vzniklý pevný podíl byl zfiltrován a promyt 5% NaHCO<sub>3</sub>, vychlazenou vodou, vysušen v exsikátoru a následně i přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol a gradientem MeOH (100:1-15:1).

#### 4.4 Kompetiční (ligand-vazebný) test

Substrátová specifita cytokininových receptorů na vybrané sloučeniny byla zjištěna pomocí kompetičního (ligand-vazebného) testu podle modifikovaného protokolu dostupného na serveru Aesculab (Aesculab 1). Tento test je založený na kompetici mezi testovanými látkami a radioaktivně značeným tZ ([2-<sup>3</sup>H]-tZ) o vazebná místa na cytokininových receptorech AHK3 nebo CRE1/AHK4 exprimovaných transgenním kmenem *Escherichia coli*.

Při přípravě bakteriální kultury byl za sterilních podmínek ve flowboxu přelit potřebný objem sterilního M9 média a k němu přidán pro kultivaci AHK3 chloramfenikol o výsledné koncentraci 20 µg/ml nebo pro kultivaci AHK4 ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Do média s antibiotikem bylo přidáno malé množství zamražené zásobní kultury *E. coli* KMI001 nesoucí konstrukt s genem pro cytokininový receptor (skladována při -80 °C). Následovala kultivace v inkubované třepačce (150 rpm) při 25 °C přes noc (cca 15 h). Poté bylo změřeno OD600 na destičkovém spektrofotometru, které se pohybovalo od 0,5 do 0,7. Afinita cytokininových receptorů k vybraným cytokininům byla stanovena tak, že se do mikrozkušavek k 1 µl testovaného cytokininu o koncentraci 20 mM rozpuštěného v DMSO napipetoval 1 ml bakteriální kultury a 2 µl [2-<sup>3</sup>H]-tZ o koncentraci 1,5 µmol/l (výsledná koncentrace 3 nmol/l). Jako negativní kontrola byl použit namísto cytokininu 1 µl DMSO. Obsah mikrozkušavky byl zvortexován a inkubován 30 minut při 4 °C. Poté následovala centrifugace (8000 rpm, 4 °C, 6 min). Vzniklý supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován ve 20 µl vody a přidán 1 ml scintilačního roztoku. Po zvortexování mikrozkušavek byl pomocí scintilačního spektrometru Hidex 300 SL změřen DPM vzorků (počet rozpadů [2-<sup>3</sup>H]-tZ za minutu). Test byl vyhodnocen pomocí kompetičních křivek (závislost specifické vazby [2-<sup>3</sup>H]-tZ (%) na koncentraci neznačených cytokininů (µM)) a disociačních konstant (koncentrace cytokininu, při které došlo k nahrazení 50% navázaného [2-<sup>3</sup>H]-tZ). Všechny vzorky byly otestovány v rámci jednoho měření ve dvou opakováních.

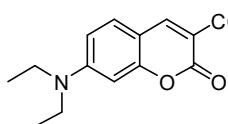
## 5 Výsledky a diskuze

Cílem této bakalářské práce byla příprava knihovny fluorescenčně značených aromatických cytokininů odvozených od Kin a BAP s dvěma typy oddalovacích řetězců zakončených aminoskupinou, ke kterým byly připojeny nejen komerční fluorescenční značky (NBD-Cl, Rhodamin B, kumarin-3-karboxylová kyselina, dansyl chlorid), ale i vlastně připravená značka (DEAC-OH). Na rozdíl od syntézy fluorescenčně značených derivátů 4PU (Zawadzki a kol., 2010), viz kapitola 3.2, byl zvolen jiný syntetický postup, kdy byly nejprve připraveny deriváty cytokininů s oddalovacím řetězcem zakončeným primární aminoskupinou, na kterou byly následně připojeny fluorofory.

### 5.1 Syntéza

#### 5.1.1 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylová kyselina (1)

Vlastní fluorescenční značka DEAC-OH byla připravena dvoukrokovou „one pot“ syntézou podle postupu v článku (Yin a kol., 2013), který sestával z Knoevenagelovy kondenzace a následné bazické hydrolyzy ethylesteru. Dosažený výtěžek 83 % byl oproti publikaci jen nepatrně nižší. Připravená látka byla bez nutnosti purifikace použita v dalších reakcích.



Oranžová pevná látka, výtěžek 83%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,13; 99,9.

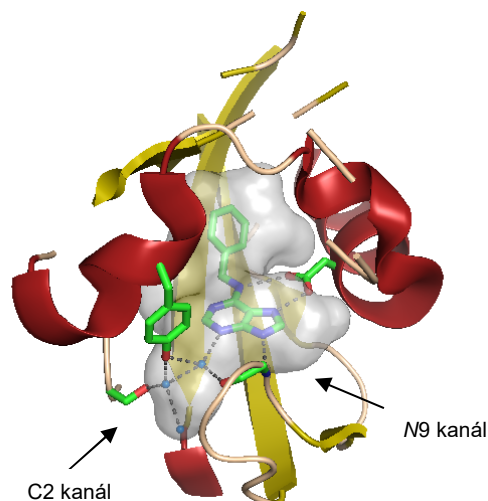
ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 262, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,12 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H); 3,47 (q, *J* = 7,0 Hz, 4H); 6,55 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 6,78 (dd, *J* = 9,2; 2,4 Hz, 1H); 7,62 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 8,57 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2x 12,3; 2x 44,4; 95,9; 107,1; 107,3; 110,0; 131,8; 149,4; 152,9; 157,9; 159,5; 164,5.

#### 5.1.2 Příprava ligandů pro fluorescenční značení

Při studiu krystalových struktur vazebné domény CRE1/AHK4 v komplexu s přírodními cytokininy bylo zjištěno, že cytokininy zapadají do nepolární vazebné kapsy, přičemž postranní řetězec je ponořen hluboko uvnitř dutiny a purinový skelet je orientován u jejího vstupu. Z vnějšího pohledu lze pozorovat dva kanály směřující k C2 a N9 atomům (Obrázek 11). Z těchto důvodů byla zvolena substituce oddalovacího raménka právě do těchto poloh.



**Obrázek 11. Detail vazebného místa AHK4/CRE1 v komplexu s BAP.** aminokyseliny ve vzdálenosti do 12 Å od ligandu – modré kuličky = molekuly vody, přerušovaná šedá čára = vodíkové vazby, přímá interakce - Asp262, nepřímá interakce – postranní řetězec Ser199, Tyr250 a hlavní řetězec Leu284; šedý objekt = vazebná kapsa.

Pro minimalizaci stérické zábrany v poloze C2 byly vybrány dva druhy uhlíkatých oddalovacích řetězců (krátký s dvěma a dlouhý s šesti uhlíky) zakončené primární aminoskupinou, která umožňuje připojení různých funkčních skupin (sekundární aminy, amidická či sulfonamidická vazba). Pro N9 pozici byl použit pouze dvouuhlíkatý řetězec zakončený NH<sub>2</sub>-skupinou (Tabulka 4).

**Tabulka 4. Přehled připravených ligandů pro fluorescenční značení a jejich fyzikálně-chemických vlastností.** 2AmEtAm – 2-aminoethylamino-, 6AmHAM – 2-aminohexylamino-, Kin – kinetin, BAP – N<sup>6</sup>-benzylaminopurin, CK – cytokinin, *N*-Boc-2AmEt - *N*-Boc-2-aminoethyl-

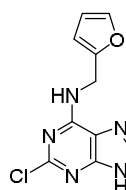
Látka	C2	CK	N9	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI <sup>+</sup> -MS [M+H] <sup>+</sup>
2	Cl-	Kin	H-	93	21,38 / 99,9	249,6
3	Cl-	BAP	H-	91	23,90 / 99,9	259,7
4	2AmEtAm-	Kin	H-	76	9,67 / 99,9	273,3
5	6AmHAM-	Kin	H-	78	14,12 / 99,1	329,4
6	2AmEtAm-	BAP	H-	93	11,23 / 99,9	283,3
7	6AmHAM-	BAP	H-	54	15,07 / 99,6	339,4
8	H-	Kin	<i>N</i> -Boc-2AmEt-	95	22,18 / 99,9	358,9
9	H-	BAP	<i>N</i> -Boc-2AmEt-	85	24,28 / 99,9	369,0

Při syntéze C2 substituovaných derivátů byla výchozí látka 2,6-dichlor-9*H*-purin, ze které ve dvou krocích byly připraveny ligandy pro fluorescenční značení. Prvním krokem byla za mírných podmínek nukleofilní substituce C6 za použití malého nadbytku příslušného aminu a Et<sub>3</sub>N jako báze. Poté byla provedena nukleofilní substituce C2 za vysoké teploty a tzv. „neat“ podmínek s 20 ekv. diaminu. Deriváty BAP byly podobným způsobem připraveny v diplomové práci J. Kani (Kania, 2008),

oproti použité metodologii (40 ekv. diaminu) bylo pro snadnější odstranění zvoleno menší nadbytek diaminu. Výtěžky daných reakcí byly srovnatelné. Kinetinové deriváty byly nasyntetizovány podle metodologie v disertační práci V. Mika (Mik, 2012) s nepatrně nižšími výtěžky, pro krátké 76% (80%) a dlouhé rámenko 78% (83%). Zmíněné deriváty byly na rozdíl od publikovaných postupů přečištěny sloupcovou chromatografií s využitím mobilní fáze chloroform/methanol/amoniak s gradientem methanolu.

N9 substituované deriváty byly připraveny ve dvou krocích podle modifikovaného protokolu v disertační práci V. Mika. Reakcí z předem připraveného 6-chlor-9-(*N*-Boc-2-aminoethyl)purinu za stejných podmínek (1,2 ekv. aminu, 2,5 elv. Et<sub>3</sub>N, *n*-PrOH, reflux, 4 h) vznikl C6 substituovaný intermediát. Na rozdíl od ochránění *N*-Boc skupiny pomocí silného ionexu (Dowex 50W X8) byla použita TFA v DCM (1:1) za chlazení. Vzniklé soli nebyly nijak přečištěny a následně použity v dalších reakcích.

### 2-chlor-*N*-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-6-amin (2)



Bílá pevná látka, výtěžek 93%.

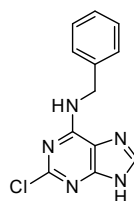
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 21,38; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 249,6 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 4,63 (bs, 2H); 6,26 (s, 1H); 6,37 (s, 1H); 7,55 (s, 1H); 8,13 (s, 1H); 8,57 (vbs, 1H); 13,09 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 36,6; 107,0; 110,4; 117,8; 139,5; 141,9; 150,6; 152,1; 152,6; 154,5.

### *N*-benzyl-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (3)



Bílá pevná látka, výtěžek 91%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,90; 99,9.

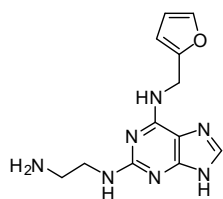
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 259,7, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 4,64 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 7,22 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H); 7,29-7,34 (m, 4H); 8,14 (s, 1H); 8,55-8,70 (m, 1H); 13,04 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 42,3; 120,6; 126,7; 2x 127,8; 2x 128,5; 135,7; 141,3; 153,2; 154,8; 160,0.



***N*<sup>2</sup>-(2-aminoethyl)-*N*<sup>6</sup>-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (4);**



Bílá pevná látka, výtěžek 76%

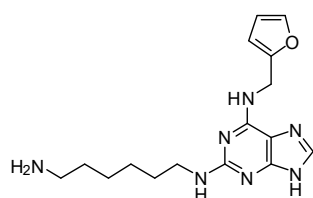
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 9,67; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 273,3, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,66 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,21 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H); 4,60 (s, 2H); 6,23 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 6,35 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,52 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H); 7,56 (s, 1H); 7,65 (s, 1H); -NH<sub>2</sub> a -N9 nepozorovány.

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 36,4; 41,4; 44,7; 106,4; 110,3; 112,6; 135,4; 141,5; 152,4; 153,5; 153,9; 159,4.

***N*<sup>2</sup>-(6-aminohexyl)-*N*<sup>6</sup>-(furan-2-ylmethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (5)**



Bílá pevná látka, výtěžek 78%.

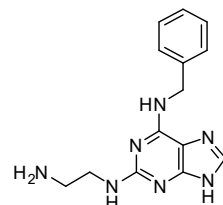
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 14,12; 99,1.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 329,4, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,30 (m, 7H); 1,49 (m, 2H); 3,19 (q, *J* = 6,7; 13,5 Hz, 4H); 4,61 (bs, 2H); 6,21 (d, *J* = 2,8 Hz, 2H); 6,34-6,35 (m, 1H); 7,52 (d, *J* = 0,9 Hz, 2H); 7,64 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 26,3; 26,6; 29,4; 33,4; 41,1; 41,6; 106,4; 110,3; 135,3; 141,5; 153,6; 153,9; 159,3.

***N*<sup>2</sup>-(2-aminoethyl)-*N*<sup>6</sup>-benzyl-9*H*-purin-2,6-diamin (6)**



Bílá pevná látka, výtěžek 93%.

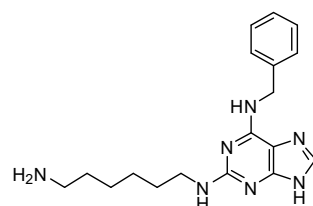
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 11,23; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 283,3, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,58 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,14 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H); 4,57 (bs, 2H); 6,12 (s, 1H); 7,15 (dd, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,24 (dd, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,30 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 7,60 (s, 1H); 7,65 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 41,4; 42,0; 45,3; 127,0; 2x 127,8; 2x 128,6; 135,7; 141,3; 153,77; 154,22; 159,44.

***N*<sup>2</sup>-(6-aminohexyl)-*N*<sup>6</sup>-benzyl-9*H*-purin-2,6-diamin (7)**



Bílá pevná látka, výtěžek 54%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 15,07; 99,6.

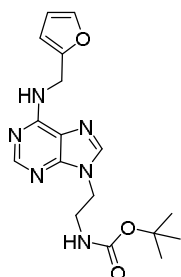
ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 339,4, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,31 (m, 6H); 1,49 (s, 2H); 2,92 (q, *J* = 6,1; 12,7 Hz, 2H); 3,19 (q, *J* = 6,4; 13,7 Hz,

2H); 4,65 (bs, 2H); 6,19 (s, 1H); 7,22 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H); 7,30 (t,  $J = 7,49$  Hz, 2H); 7,34 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 7,66 (s, 1H); 7,73 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 26,3; 26,6; 29,4; 33,4; 41,1; 41,6; 42,6; 112,6; 126,3; 2x 127,2; 2x 128,0; 135,1; 140,8; 152,3; 154,2; 159,4.

### **tert-butyl(2-(6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9H-purin-9-yl)ethyl)karbamát (8)**



Bílá pevná látka, výtěžek 95%.

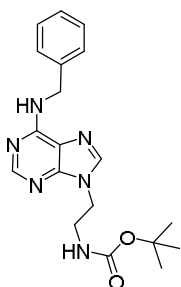
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 22,18; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS  $m/z$ : 358,9, [M+H]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,07 (s, 2H); 1,29 (s, 9H); 4,18 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 4,67 (bs, 2H), 6,20 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H), 6,34 (q,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 6,96 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 7,52 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,13 (vbs, 1H), 8,21 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3x 28,1; 36,4; 39,8; 42,8; 77,8; 106,6; 110,4; 119,0; 140,9; 141,8; 149,1; 152,1; 153,1; 154,1; 155,5.

### **tert-butyl(2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)ethyl)karbamát (9)**



Bílá pevná látka, výtěžek 85%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 24,28; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS  $m/z$ : 369,0, [M+H]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,29 (s, 9H), 3,30-3,33 (m, 2H); 4,17 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H); 4,69 (bs, 2H); 6,96 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 7,19 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H); 7,28 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 7,32 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 8,02 (s, 1H); 8,17 (s, 1H); 8,27 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3x 28,1; 40,2; 42,8; 77,7; 119,2; 126,5; 2x 127,1; 2x 128,1; 140,2; 140,8; 149,0; 152,1; 154,2; 155,5; -CH<sub>2</sub>- z benzylu nedetekována.

## **5.1.3 Příprava fluorescenčně značených aromatických cytokininů**

Tato bakalářská práce navazuje na bakalářskou práci K. Kubiasové (Kubiasová, 2012) a disertační práci V. Mika, které byly zaměřeny na přípravu fluorescenčně značených derivátů *N*<sup>6</sup>-isopentenyladeninu. Knihovna těchto látek byla doplněna o aromatické deriváty cytokininů, BAP a Kin, přičemž bylo celkem připraveno 20 látek C2-substituovaných (Tabulka 5) a 2 *N*<sub>9</sub>-substituované (Tabulka 6). Deriváty BAP byly vybrány z důvodu vyšší metabolické stability, jelikož samotný BAP je obtížně, ne-li vůbec, degradovatelný cytokinindehydrogenasami z *A. thaliana* (Galuszka a kol.,

2007). Bylo zjištěno, že kinetin ovlivňuje kromě rostlinných buněk i buňky živočišné, zejména jejich senescenci. U hmyzu *Zaprionus parvettiger*, jejichž strava obsahovala přídatek kinetinu, bylo pozorováno prodloužení délky života doprovázené zvýšenou specifickou aktivitou katalasy a snížením schopnosti reprodukce (Sharma a kol., 1997). Kinetin také oddaluje nástup projevů stárnutí lidských fibroblastů, jako jsou morfologické změny, buněčná velikost, rychlost růstu, uspořádání cytoskeletu a další (Rattan a Clark, 1994).

**Tabulka 5. Přehled připravených C2-substituovaných fluorescenčně značených cytokininů a jejich fyzikálně-chemických vlastností.** K – 2-aminoethylamino-, D – 2-aminoxylylamino-, CK – cytokinin, Kin – kinetin, BAP – *N*<sup>6</sup>-benzylaminopurin, NBD – 7-nitrobenzofurazan-4-yl, Rhodamin – Rhodamin B karboxylát, Kumarin-K – kumarin-3-karboxylát, DEAC – 7-(diethylamino)kumarin-3-karboxylát.

Látka	C2	CK	F	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI <sup>+</sup> -MS [M+H] <sup>+</sup>	Spektrální vlastnosti		
							UV <sub>max</sub> [nm]	λ <sub>em</sub> <sub>max</sub> [nm]	λ <sub>ex</sub> <sub>max</sub> [nm]
12	K			61	21,47 / 99,0	436,4	465, 335, 287	516	463
13	D	Kin	NBD	80	24,22 / 97,3	492,5	464, 335, 290	526	466, 333, 288
14	K	BAP		56	23,35 / 95,5	446,4	473, 335, 288	517	464
15	D	BAP		66	25,42 / 99,7	502,5	465, 334, 291	526	464
16	K	Kin	Rhodamin	67	32,20 / 98,0	697,8	547	566	545
17	D	Kin		67	34,58 / 96,4	753,9	547	566	545
18	K	BAP		74	33,33 / 99,1	707,9	547	566	544
19	D	BAP		71	36,10 / 98,6	764,0	545	566	545
20	K	Kin	Kumarin-K	85	21,45 / 98,7	445,4	291	-	-
21	D	Kin		83	25,32 / 96,0	501,5	292	405	290
22	K	BAP		88	23,28 / 99,7	455,5	291	-	-
23	D	BAP		90	26,63 / 98,2	511,6	291	406	291
24	K	Kin	DEAC	70	25,25 / 99,9	516,6	419, 288, 256	464	416, 285, 259
25	D	Kin		85	28,03 / 99,9	572,7	420, 288, 256	465	416, 285, 259
26	K	BAP		65	26,50 / 99,9	526,6	421, 287, 255	464	417, 284, 261
27	D	BAP		64	28,85 / 99,9	582,7	421, 287, 255	464	416, 284, 261
28	K	Kin	Dansyl	65	23,30 / 99,7	506,6	334, 289	509	336, 287, 253
29	D	Kin		74	26,52 / 99,7	562,7	331, 291	507	334, 287, 254
30	K	BAP		85	24,82 / 99,2	516,6	335, 291	509	336, 288, 254
31	D	BAP		74	27,40 / 99,8	572,7	335, 292	506	336, 288, 254

**Tabulka 6. Přehled připravených N9-substituovaných fluorescenčně značených cytokininů a jejich fyzikálně-chemických vlastností.** K – 2-aminoethyl-, CK- cytokinin, Kin – kinetin, BAP – *N*<sup>6</sup>-benzylaminopurin, NBD – 7-nitrobenzofurazan-4-yl.

Látka	N9	CK	F	Výtěžek [%]	HPLC [min / %]	ESI <sup>+</sup> -MS [M+H] <sup>+</sup>	Spektrální vlastnosti		
							UV <sub>max</sub> [nm]	λ <sub>em</sub> <sub>max</sub> [nm]	λ <sub>ex</sub> <sub>max</sub> [nm]
32	K	Kin	NBD	61	21,47 / 99,0	436,4	458, 329	521	456, 326, 269
33	K	BAP	NBD	74	27,40 / 99,8	572,7	457, 331	520	457, 330, 271

Syntetické postupy při fluorescenčním značení aromatických cytokininů vychází z metodologie použité pro značení derivátů iP - Rhodamin B, kumarin-3-karboxylová kyselina, DEAC-OH (Meng a kol., 2007). Pro zlepšení rozpustnosti výchozích ligandů byl do reakční směsi přidán DMSO. Karboxyskupina fluoroforů byla aktivována NHS v přítomnosti DCC. Vzniklý N-hydroxysukcinimidový ester byl v bazickém prostředí připojen k cytokininovým ligandům. Při porovnání výtěžků bylo dosaženo nižších výtěžků u rhodaminových derivátů v průměru 70% (téměř kvantitativních), zatímco u kumarinových derivátů kolem 90 % (krátký „linker“ 92%, dlouhý 43%). Navíc byly syntetizovány deriváty s DEAC fluoroforem, přičemž se výtěžky reakcí pohybovaly v rozmezí od 65 do 85 %.

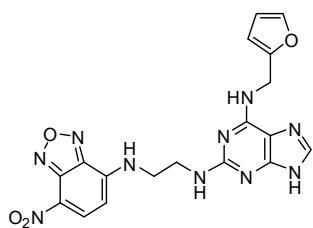
Při značení NBD-Cl bylo použito oproti publikovaným postupům větší množství reakčních činidel, byla prodloužena reakční doba (míchání za laboratorní teploty přes noc) a upraveno zpracování reakční směsi, což vedlo k výtěžkům 60-80%. Látka **12** byla pravděpodobně připravena v diplomové práci M. Tkáče (Tkáč, 2014), ale z důvodu nedostatečné charakterizace a interpretace dat (pouze  $^1\text{H}$  NMR spektrum) nelze jednoznačně říci, že se jedná o stejnou látku. V případě N9 isomerů bylo použito dvojnásobné množství  $\text{NaHCO}_3$ , jelikož byly výchozí aminy ve formě TFA solí.

Deriváty označené dansylem byly nasyntetizovány podle zcela jiného protokolu. Zatímco iP deriváty byly připravovány v DMSO a  $\text{NaHCO}_3$  (3 ekv.) jako bází, pomocí nové metodologie využívající organickou bázi  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 ekv.) v nepolárním DCM byly získány látky s relativně vysokým výtěžkem 65-85 %.

Vzniklé látky byly zcharakterizovány pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod: spektroskopická čistota - HPLC-UV/VIS, molekulová hmotnost – QqTOF, struktura látek –  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR (popřípadě 2D experimenty – HMQC, HMBC) a spektrální vlastnosti - absorpční i fluorescenční spektra. U rhodaminových derivátů nebyla vyhodnocena uhlíková spektra, jelikož sloučeniny obsahují více než 40 uhlíků a při použití standardní metody pro měření  $^{13}\text{C}$  spekter nebyly všechny uhlíky detekovány. Pro jejich vyhodnocení bude nutno zoptimalizovat relaxační časy.

Při měření fluorescenčních spekter bylo zjištěno, že připravené fluorescenční látky s krátkým oddalovacím raménkem vykazovaly nižší relativní intenzitu fluorescence. Látky **12** a **14** měly velmi nízkou intenzitu fluorescence a **20** a **22** nebyly fluorescenční vůbec, tento jev je pravděpodobně způsoben krátkým oddalovacím řetězcem a blízkostí purinového skeletu, což má pravděpodobně za následek eliminaci energie excitovaného elektronu prostřednictvím nezářivého přechodu.

***N*<sup>6</sup>-(furan-2-ylmethyl)-*N*<sup>2</sup>-(2-((7-nitroisobenzofuran-4-yl)amino)ethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (12)**



Hnědá pevná látka, výtěžek 61%.

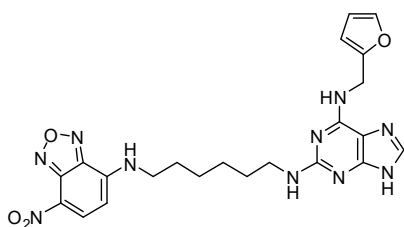
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 21,47; 99,0.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 436,4, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,53 (s, 2H); 3,61-3,62 (m, 2H); 4,60 (bs, 2H); 6,22 (s, 1H); 6,34 (s, 1H); 6,62 (bs, 2H); 7,51 (s, 1H); 7,73 (bs, 2H); 8,61 (vbs, 1H); 9,62 (bs, 1H), 12,27 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 36,1; 40,1; 43,5; 99,47; 106,5; 110,4; 113,4; 120,7; 135,5; 138,2; 141,7; 144,2; 144,5; 145,5; 151,7; 153,4; 154,3; 159,1.

***N*<sup>6</sup>-(furan-2-ylmethyl)-*N*<sup>2</sup>-(6-((7-nitroisobenzofuran-4-yl)amino)hexyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (13)**



Hnědá pevná látka, výtěžek: 80%.

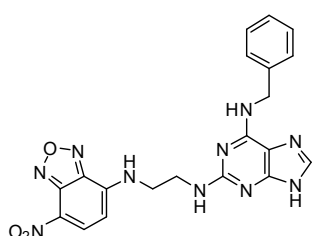
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 24,22; 97,3.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 492,5, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,32-1,37 (m, 4H); 1,48-1,53 (m, 2H); 1,63-1,69 (m, 2H); 3,20 (q, *J* = 6,4; 13,1 Hz, 2H); 3,43 (bs, 2H); 4,59 (vbs, 2H); 6,20 (s, 1H); 6,24 (bs, 1H); 6,33 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H); 6,36 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 7,50 (s, 2H); 7,63 (s, 1H); 8,48 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 9,55 (s, 1H); 12,14 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2x 26,3; 27,6; 29,3; 36,2; 41,0; 43,3; 99,0; 106,4; 110,3; 113,0; 120,4; 135,1; 137,9; 141,5; 144,1; 144,4; 145,1; 152,2; 153,5; 154,0; 159,3.

***N*<sup>6</sup>-benzyl-*N*<sup>2</sup>-(2-((7-nitroisobenzofuran-4-yl)amino)ethyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (14)**



Oranžová pevná látka, výtěžek 56%.

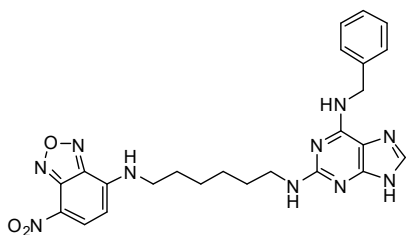
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,35; 95,5.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 446,4, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,45-3,51 (m, 2H); 3,56 (s, 2H); 4,61 (bs, 2H); 6,55 (bs, 1H); 7,17 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,26 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,32 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,72 (s, 2H); 7,85 (vbs, 1H); 8,61 (vbs, 1H); 9,60 (bs, 1H); 12,27 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 38,9; 42,6; 43,4; 99,4; 113,5; 120,7; 126,4; 2x 127,2; 2x 128,1; 135,3; 138,1; 140,6; 144,1; 144,4; 145,4; 151,7; 154,4; 159,1.

***N*<sup>6</sup>-benzyl-*N*<sup>2</sup>-(2-((7-nitroisobenzofuran-4-yl)amino)hexyl)-9*H*-purin-2,6-diamin (15)**



Hnědá pevná látka, výtěžek 66%.

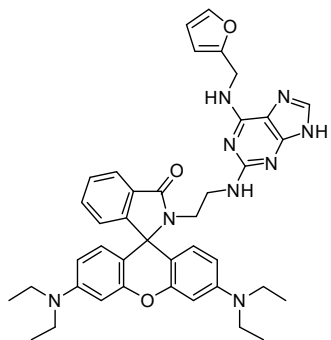
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 25,42; 99,7.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 502,5, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,30-1,34 (m, 4H); 1,46-1,49 (m, 2H); 1,62-1,68 (m, 2H); 3,18 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 3,42 (s, 2H); 4,60 (bs, 2H); 6,19 (s, 1H); 6,35 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 7,15 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,24 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,31 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 7,63 (s, 1H); 7,68 (vbs, 1H); 8,47 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 9,54 (s, 1H); 12,12 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2x 26,3; 27,6; 29,3; 41,0; 42,6; 43,3; 99,0; 112,8; 120,4; 126,3; 2x 127,2; 2x 128,0; 135,1; 137,9; 140,7; 144,1; 144,3; 145,1; 151,9; 154,2; 159,3.

**3',6'-bis(diethylamino)-2-(2-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9*H*-purin-2-yl)amino)ethyl)spiro[isoindolin-1,9'-xanthen]-3-on (16)**



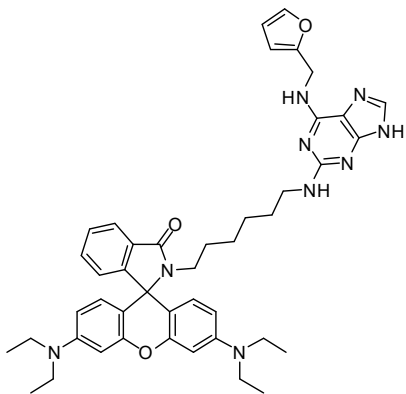
Růžová pevná látka, výtěžek 67%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 32,20; 98,0.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 697,8, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,04 (t, *J* = 6,7 Hz, 12H); 2,97 (s, 2H); 3,27 (d, *J* = 6,7 Hz, 10H); 4,51 (bs, 2H); 6,09 (vbs, 1H); 6,19 (s, 1H); 6,29-6,35 (m, 7H); 6,97-6,98 (m, 1H); 7,48-7,49 (m, 4H); 7,61 (s, 1H); 7,79-7,80 (m, 1H); 12,09 (bs, 1H).

**3',6'-bis(diethylamino)-2-(6-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9*H*-purin-2-yl)amino)hexyl)spiro[isoindolin-1,9'-xanthen]-3-on (17)**



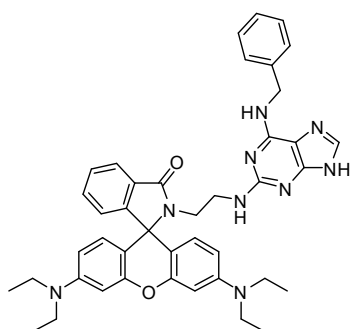
Růžová pevná látka, výtěžek 67%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 34,58; 96,4.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 753,9, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 0,98 (s, 6H); 1,04 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); 1,24-1,29 (m, 2H); 2,92-2,93 (m, 2H); 3,06 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 3,27 (q, *J* = 6,9 Hz, 8H); 4,58 (bs, 2H); 6,07 (s, 1H); 6,18 (s, 1H); 6,26 (s, 1H); 6,28 (s, 1H); 6,32 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 6,33 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 6,35 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 7,02-7,03 (m, 1H); 7,47-7,51 (m, 4H); 7,61 (s, 1H); 7,75-7,77 (m, 1H); 12,14 (bs, 1H).

**2-(6-((6-(benzylamino)-9H-purin-2-yl)amino)ethyl)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[isoindolin-1,9'-xanthen]-3-on (18)**



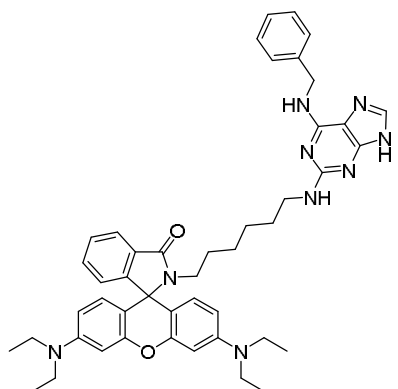
Růžová pevná látka, výtěžek 74%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 33,33; 99,1.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 707,9, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,03 (t, *J* = 6,7 Hz, 12H); 2,96 (s, 2H); 3,24-3,26 (m, 10H); 4,50 (bs, 2H); 6,02 (s, 1H); 6,29-6,33 (m, 6H); 6,97-6,978 (m, 1H); 7,15-7,16 (m, 1H); 7,21-7,22 (m, 2H); 7,31 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 7,47-7,48 (m, 2H); 7,60 (s, 1H); 7,64 (s, 1H); 7,79 (t, *J* = 3,4 Hz, 1H); 12,06 (bs, 1H).

**2-(6-((6-(benzylamino)-9H-purin-2-yl)amino)hexyl)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[isoindolin-1,9'-xanthen]-3-on (19)**



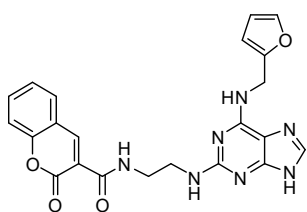
Růžová pevná látka, výtěžek 71%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 36,10, 98,6.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 764,0 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 0,95 (s, 6H); 1,03 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); 1,22-1,24 (m, 2H); 2,91 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,03 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,26 (q, *J* = 6,8 Hz, 8H); 4,58 (bs, 2H); 6,01 (s, 1H); 6,26 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H); 6,32 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H); 6,35 (s, 2H); 7,01-7,03 (m, 1H); 7,13-7,14 (m, 1H); 7,21-7,24 (m, 2H); 7,29 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,47-7,51 (m, 2H); 7,61 (s, 1H); 7,68 (s, 1H); 7,75-7,77 (m, 1H); 12,12 (bs, 1H).

**N-(2-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9H-purin-2-yl)amino)ethyl)-2-oxo-2H-chromen-3-karboxamid (20)**



Světle oranžová pevná látka, výtěžek 85%.

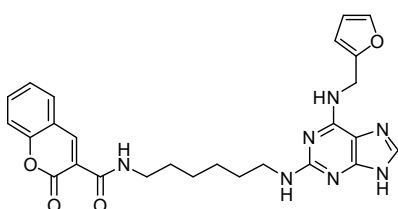
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 21,45; 98,7.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 445,4, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,42 (q, *J* = 5,5 Hz, 2H); 3,52 (q, *J* = 5,5 Hz, 2H); 4,61 (bs, 2H); 6,23 (s, 1H); 6,33 (s, 1H); 6,48 (bs, 1H); 7,42 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,48-7,50 (m, 2H); 7,59 (vbs, 1H); 7,65 (s, 1H); 7,73 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,97 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 8,85 (s, 2H); 12,20 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 33,3; 35,9; 40,8; 106,5; 110,4; 113,2; 116,1; 118,4; 119,0; 125,1; 130,2; 134,0; 135,3; 141,5; 147,4; 151,7; 153,5; 153,8; 156,42; 159,2; 160,3; 161,3.

***N*-(6-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9*H*-purin-2-yl)amino)hexyl)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (21)**



Světle oranžová pevná látka, výtěžek 83%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 25,32; 96,0.

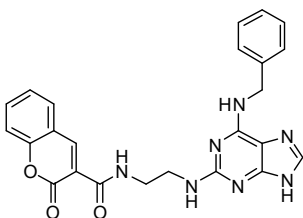
ESI<sup>+</sup>-MS m/z, iont: 501,5, [M+H]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,31 (s, 4H); 1,51 (d,  $J = 5,8$  Hz, 4H); 3,19 (q,  $J = 6,1$  Hz, 2H); 3,30

(q,  $J = 6,2$  Hz, 2H); 4,61 (bs, 2H); 6,21 (s, 2H); 6,33 (s, 1H); 7,42 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H); 7,47-7,49 (m, 3H); 7,62 (s, 1H); 7,72 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H); 7,95 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H); 8,67 (t,  $J = 5,0$  Hz, 1H); 8,82 (s, 1H); 12,16 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2x 26,4; 29,0; 29,3; 36,2; 41,1; 106,5; 110,4; 113,0; 116,1; 118,5; 119,1; 125,2; 130,2; 134,0; 135,2; 141,6; 147,3; 151,9; 153,6; 153,8; 154,1; 159,4; 160,5; 161,0;  $-\text{CH}_2-$  z oddalovacího raménka nedetekována (DMSO).

***N*-(2-((6-(benzylamino)-9*H*-purin-2-yl)amino)ethyl)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (22)**



Oranžová pevná látka, výtěžek 88%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,28; 99,7.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 455,5, [M+H]<sup>+</sup>.

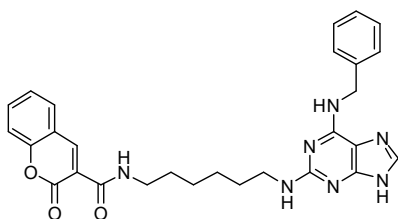
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,38-3,40 (m, 2H); 3,48-3,50 (m, 2H); 4,62 (bs, 2H); 6,42 (s, 1H); 7,16 (t,

$J = 7,2$  Hz, 1H); 7,26 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H); 7,34 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H); 7,41-7,44 (m, 1H); 7,49 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 7,64 (s, 1H); 7,71-7,75 (m, 2H); 7,96 (dd,  $J = 7,8; 1,4$  Hz, 1H); 8,82 (bs, 1H); 8,85 (s, 1H); 12,18 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 39,4; 40,8; 42,6; 113,2; 116,1; 118,4; 119,0; 125,1; 126,4; 2x 127,3; 2x 128,0; 130,2; 134,0; 135,2; 140,7; 147,4; 151,7; 153,8; 154,4; 159,3; 160,3; 161,3.



***N*-(6-((6-(benzylamino)-9*H*-purin-2-yl)amino)hexyl)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (23)**



Světle oranžová pevná látka, výtěžek 90%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 26,63; 98,2.

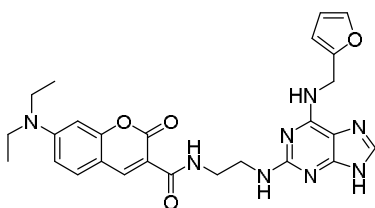
ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 511,6, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,29 (s, 4H); 1,47-1,50 (m, 4H); 3,17 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 3,29 (q,

*J* = 6,5 Hz, 2H); 4,61 (bs, 2H); 6,18 (bs, 1H); 7,16 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,26 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,32 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,41-7,44 (m, 1H); 7,49 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,62 (s, 1H); 7,71-7,75 (m, 2H); 7,96 (dd, *J* = 7,8; 1,4 Hz, 1H); 8,67 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 8,84 (s, 1H); 12,14 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2x 26,3; 29,0; 29,3; 39,2; 41,1; 42,6; 112,8; 116,1; 118,5; 119,1; 125,1; 126,3; 2x 127,2; 2x 128,0; 130,2; 134,0; 134,9; 140,8; 147,2; 151,9; 153,8; 154,3; 159,4; 160,4; 161,0.

***N*-(2-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9*H*-purin-2-yl)amino)ethyl)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (24)**



Žlutá pevná látka, výtěžek 70%.

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

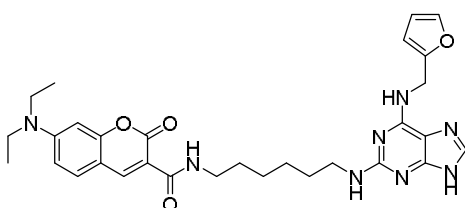
ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 516,6, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,12 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H); 3,37-3,40 (m, 2H); 3,44-3,49 (m, 6H);

4,61 (bs, 2H); 6,23 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 6,33 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H); 6,47 (bs, 1H); 6,59 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 6,78 (dd, *J* = 8,9; 2,4 Hz, 1H); 7,51 (s, 1H); 7,59 (vbs, 1H); 7,65 (s, 1H); 7,67 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 8,65 (s, 1H); 8,78 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 12,20 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2x 12,3; 41,1; 2x 44,3; 95,8; 106,5; 107,6; 109,4; 110,0; 110,4; 113,2; 131,5; 135,2; 141,5; 147,6; 152,3; 153,5; 154,1; 157,2; 159,2; 161,6; 162,4; 1 kvartémí uhlík, -CH<sub>2</sub>- z furfurylu a -CH<sub>2</sub>- z oddalovacího raménka nedetekována (DMSO).

***N*-(6-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9*H*-purin-2-yl)amino)hexyl)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (25)**



Žlutá pevná látka, výtěžek 85%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 28,03; 99,9.

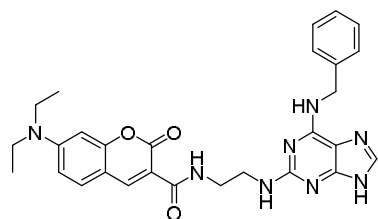
ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 572,7 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,16

(t,  $J = 7,0$  Hz, 6H); 1,34-1,36 (m, 4H); 1,52-1,54 (m, 4H); 3,23 (q,  $J = 6,5$  Hz, 2H); 3,32 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H); 3,50 (q,  $J = 7,0$  Hz, 4H); 4,64 (bs, 2H); 6,24 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H); 6,27 (bs, 1H); 6,37-6,38 (m, 1H); 6,64 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H); 6,82 (dd,  $J = 9,2; 2,4$  Hz, 1H); 7,54 (s, 1H); 7,57 (vbs, 1H); 7,66 (s, 1H); 7,70 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H); 8,64-8,68 (m, 2H); 12,20 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2x 12,3; 2x 26,3; 29,2; 29,3; 36,2; 41,0; 2x 44,3; 95,8; 106,4; 107,6; 109,4; 110,0; 110,3; 113,0; 131,5; 135,0; 141,5; 147,6; 152,3; 153,6; 154,1; 157,1; 159,3; 161,8; 162,0; 1 kvartérní uhlík a  $-\text{CH}_2-$  z oddalovacího raménka nedetekována (DMSO).

### ***N*-(2-((6-(benzylamino)-9*H*-purin-2-yl)amino)ethyl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (26)**



Žlutá pevná látka, výtěžek 65%.

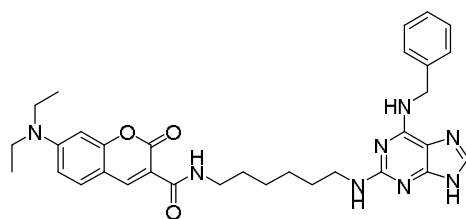
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 26,50; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS  $m/z$ : 526,6,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,12 (t,  $J = 6,9$  Hz, 6H); 3,35-3,36 (m, 2H); 3,46 (q,  $J = 6,8$  Hz, 6H); 4,61 (bs, 2H); 6,41 (bs, 1H); 6,59 (s, 1H); 6,78 (dd,  $J = 9,0; 1,4$  Hz, 1H); 7,16 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H); 7,26 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 7,34 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 7,64 (s, 1H); 7,66 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H); 7,75 (vbs, 1H); 8,64 (s, 1H); 8,76 (bs, 1H); 12,18 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2x 12,3; 41,1; 42,7; 2x 44,3; 95,8; 107,6; 109,4; 110,1; 113,1; 126,4; 2x 127,3; 2x 128,0; 131,5; 135,2; 140,7; 147,6; 151,7; 152,3; 154,5; 157,2; 159,4; 161,6; 162,3;  $-\text{CH}_2-$  z oddalovacího raménka nedetekována (DMSO).

### ***N*-(6-((6-(benzylamino)-9*H*-purin-2-yl)amino)hexyl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-karboxamid (27)**



Žlutá pevná látka, výtěžek 64%.

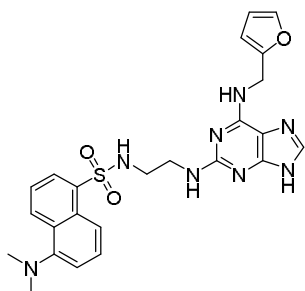
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 28,85; 99,9.

ESI<sup>+</sup>-MS  $m/z$ : 582,7,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,12 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H); 1,28 (s, 4H); 1,78-1,48 (m, 4H); 3,16 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H); 3,27 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H); 3,47 (t,  $J = 7,0$  Hz, 4H); 4,60 (bs, 2H); 6,17 (bs, 1H); 6,60 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H); 6,78 (dd,  $J = 9,2; 2,4$  Hz, 1H); 7,16 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H); 7,25 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H); 7,32 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 7,62 (s, 1H); 7,66 (d,  $J = 9,2$  Hz, 2H); 8,61-8,64 (m, 2H); 12,14 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2x 12,3; 2x 26,3; 29,2; 29,3; 41,1; 42,7; 2x 44,3; 95,8; 107,6; 109,4; 110,0; 112,9; 126,3; 2x 127,2; 2x 128,0; 131,5; 134,9; 141,0; 147,6; 151,8; 152,3; 154,34; 157,1; 159,4; 161,8; 162,0;  $-\text{CH}_2-$  z oddalovacího raménka nedetekována (DMSO).

**5-(dimethylamino)-N-(2-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9H-purin-2-yl)amino)ethyl)naftalen-1-sulfonamid (28)**



Světle žlutá pevná látka, výtěžek 65%.

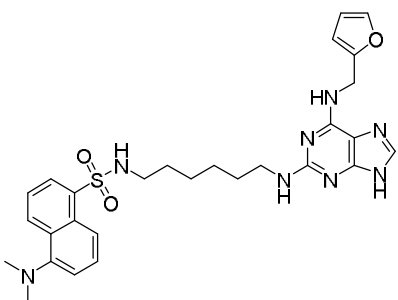
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,30; 99,7.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 506,6, [M+H]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,79 (s, 6H); 2,92 (q,  $J = 6,4$  Hz, 2H); 3,24 (q,  $J = 6,4$  Hz, 2H); 4,53 (bs, 2H); 6,17 (s, 2H); 6,30 (s, 1H); 7,20 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,51 (dd,  $J = 8,6; 7,6$  Hz, 1H); 7,56 (dd,  $J = 8,6; 7,3$  Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 8,02 (s, 1H); 8,08 (dd,  $J = 7,3; 0,9$  Hz, 1H); 8,25 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H); 8,41 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 12,17 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 36,1; 40,9; 42,4; 2x 45,0; 106,5; 110,3; 113,2; 115,0; 119,0; 123,5; 127,7; 128,3; 2x 129,0; 129,3; 135,3; 135,8; 141,5; 151,3; 153,4; 154,1; 158,8; 1 kvartérní uhlík nedetekován.

**5-(dimethylamino)-N-(6-((6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9H-purin-2-yl)amino)hexyl)naftalen-1-sulfonamid (29)**



Světle žlutá pevná látka, výtěžek 74%.

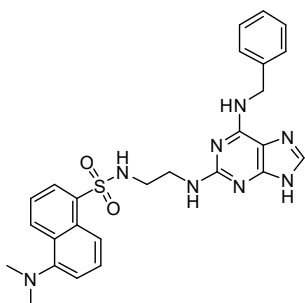
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 26,52; 99,7.

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: 562,7, [M+H]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,05-1,08 (m, 4H); 1,22-1,31 (m, 4H); 2,75 (q,  $J = 6,5$  Hz, 2H); 2,79 (s, 6H); 3,07 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H); 4,59 (bs, 2H); 6,14 (s, 1H); 6,19 (bs, 1H); 6,33 (s, 1H); 7,21 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H); 7,50 (bs, 2H); 7,55-7,57 (m, 1H); 7,58-7,60 (m, 1H); 7,63 (s, 1H); 7,85 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 8,07 (dd,  $J = 7,3; 1,2$  Hz, 1H); 8,29 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 8,42 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 12,15 (bs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 25,8; 26,0; 29,0; 29,1; 36,1; 40,9; 42,3; 2x 45,0; 106,4; 110,4; 112,9; 115,0; 119,1; 123,5; 127,7; 128,2; 129,0; 129,1; 129,3; 135,1; 136,1; 141,5; 151,3; 152,1; 153,6; 154,1; 159,3.

***N*-2-((6-(benzylamino)-9*H*-purin-2-yl)amino)ethyl)-5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonamid (30)**



Světle žlutá pevná látka, výtěžek 85%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 24,82; 99,2.

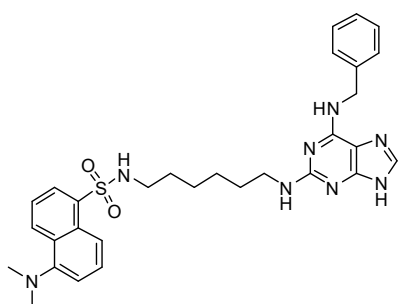
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 516,6, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,79 (s, 6H); 2,90 (q, *J* = 6,2 Hz, 2H); 3,22 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 4,53 (s, 2H); 6,15 (s, 1H); 7,14 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H); 7,22-7,19 (m, 3H); 7,28 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,51 (dd, *J* = 8,6; 7,3 Hz, 1H); 7,55

(dd, *J* = 8,6; 7,3 Hz, 1H); 7,64 (s, 1H); 7,76 (vbs, 1H); 8,01 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 8,07 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 8,25 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 8,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 12,16 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 40,9; 42,4; 2x 45,0; 113,0; 115,0; 119,0; 123,5; 126,3; 2x127,3; 127,7; 2x 128,0; 128,2; 2x 129,0; 129,3; 135,2; 135,8; 140,7; 151,3; 151,5; 154,3; 158,9; -CH<sub>2</sub>- z oddalovacího raménka nedetekována (DMSO).

***N*-6-((6-(benzylamino)-9*H*-purin-2-yl)amino)hexyl)-5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonamid (31)**



Světle žlutá pevná látka, výtěžek 74%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 27,40; 99,8.

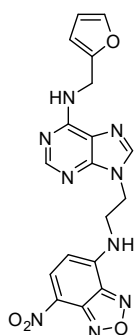
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 572,7, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,02-1,07 (m, 4H); 1,20-1,26 (m, 4H); 2,74 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H); 2,78 (s, 6H); 3,04 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 4,59 (bs, 2H); 6,08 (bs, 1H); 7,15 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,20-7,25

(m, 3H); 7,31 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,55-7,57 (m, 1H); 7,58-7,60 (m, 1H); 7,62 (s, 1H); 7,69 (s, 1H); 7,85 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 8,07 (dd, *J* = 7,3; 1,2 Hz, 1H); 8,29 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 8,42 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 12,13 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 25,8; 26,0; 29,0; 29,1; 40,9; 42,3; 42,6; 2x 45,0; 112,8; 115,0; 119,1; 123,5; 126,3; 2x 127,2; 127,7; 2x 128,0; 128,2; 129,0; 129,1; 129,3; 134,9; 136,1; 140,8; 151,3; 151,9; 154,3; 159,3.

***N*-(2-(6-((furan-2-ylmethyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)ethyl)-7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-amin (32)**



Oranžová pevná látka, výtěžek 78%.

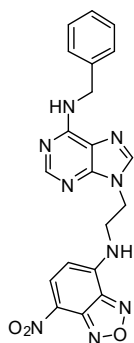
HPLC retenční čas, čistota (min; %): 21,78; 97,5.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 421,4, [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,92 (s, 2H); 4,48 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); 4,65 (s, 2H); 6,17 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 6,33-6,34 (m, 1H); 6,43 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 7,51-7,52 (m, 1H); 8,12 (s, 2H); 8,17 (vbs, 1H); 8,46 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 9,48 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 36,4; 41,3; 42,8; 99,3; 106,5; 110,4; 119,1; 121,3; 137,7; 141,5; 141,7; 143,9; 144,5; 145,0; 149,2; 152,1; 153,0; 154,0.

***N*-(2-(6-(benzylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethyl)-7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-amin (33)**



Oranžová pevná látka, výtěžek 68%.

HPLC retenční čas, čistota (min; %): 23,88; 98,7.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z*: 431,4, [M+H]<sup>+</sup>.

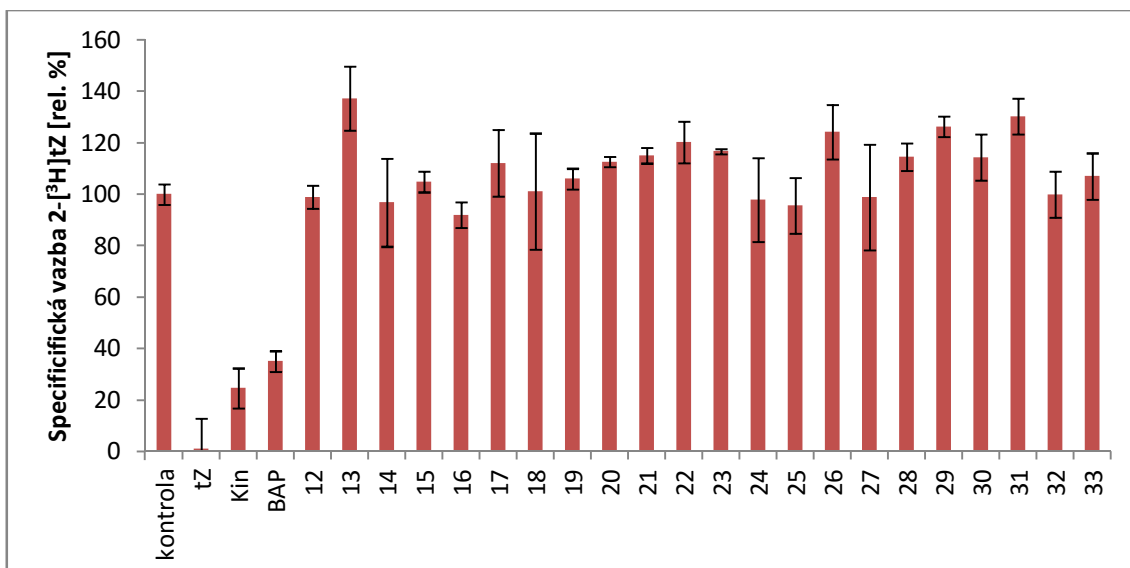
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,92 (s, 2H); 4,47 (s, 2H); 4,66 (s, 2H); 6,42 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,17-7,20 (m, 1H); 7,25-7,30 (m, 4H); 8,11 (s, 2H); 8,31 (bs, 1H); 8,45 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 9,49 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 41,4; 2x 42,8; 99,3; 119,0; 121,3; 126,5; 2x 127,5; 2x 128,1; 137,7; 140,1; 141,0; 144,0; 144,5; 145,0; 149,1; 152,2; 154,2.

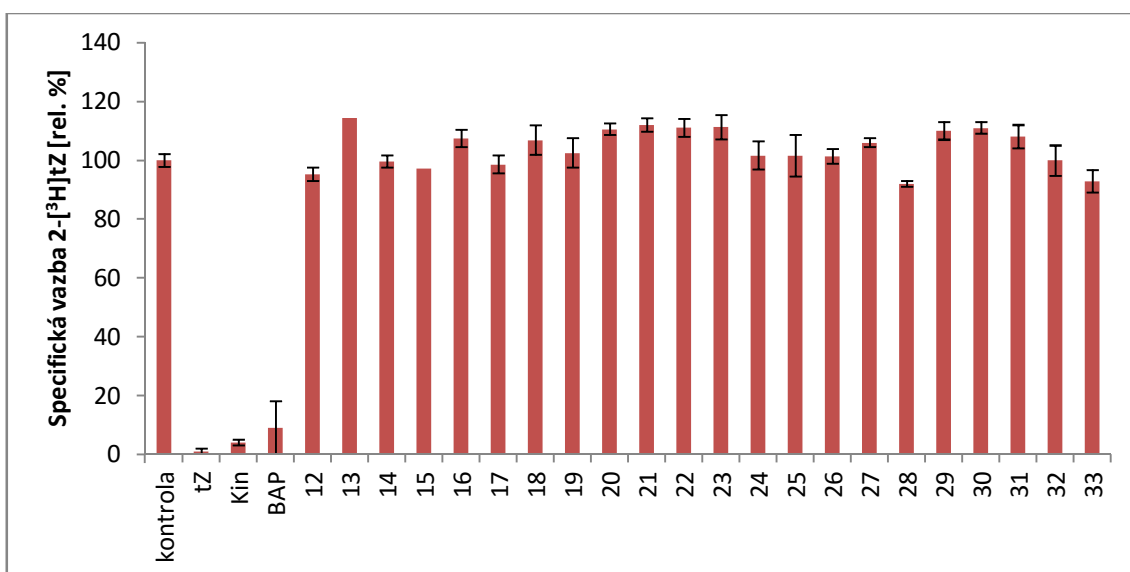
## 5.2 Kompetiční (ligand-vazebný) test

Biologická aktivita připravených fluorescenčně značených sloučenin **12-33** byla testována v kompetičním receptorovém testu na cytokininových receptorech z *A. thaliana*, konkrétně AHK3 a CRE1/AHK4. Tato bioassay je založena na soupeření mezi testovanou látkou o fixní koncentraci 20 μM a radioaktivně značeným tZ ([2-<sup>3</sup>H]-tZ) o vazebné místo receptoru, přičemž se měří zbytková radioaktivita.

Z výsledků testování na receptorech AHK3 (Graf 2) a CRE1/AHK4 (Graf 3) vyplývá, že **12-33** nevykazovaly bohužel žádnou afinitu k vazebnému místu receptoru (≥100 %), zatímco v případě pozitivních kontrol došlo k vytěsnění [2-<sup>3</sup>H]-tZ z aktivního místa (AHK3 – Kin 25 %, BAP 35 %, CRE1/AHK4 – Kin 4 %, BAP 9 %).



Graf 2. Vliv testovaných látek 12-33 (20 $\mu$ M) na specifickou vazbu [2-<sup>3</sup>H]-tZ v kompetičním ligand-vazebném testu na cytokininovém receptoru AHK3 exprimovaném transformovaným kmenem *E. coli*. Koncentrace použitých standardů Kin a BAP byla 20 $\mu$ M a pozitivní kontrola tZ 10 $\mu$ M.



Graf 3. Vliv testovaných látek 12-33 (20 $\mu$ M) na specifickou vazbu [2-<sup>3</sup>H]-tZ v kompetičním ligand-vazebném testu na cytokininovém receptoru CRE1/AHK4 exprimovaném transformovaným kmenem *E. coli*. Koncentrace použitých standardů Kin a BAP byla 20 $\mu$ M a pozitivní kontrola tZ 10 $\mu$ M.

Na rozdíl od připravených látek **12-33** interagují některá iP analoga s vazebnou doménou receptoru CRE1/AHK4, například rhodaminem, FITC a kumarinem značené deriváty (osobní sdělení – dosud nepublikovaná data).

## 6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala syntézou fluorescenčně značených derivátů aromatických cytokininů a jejich biologickou aktivitou v ligand-vazebném testu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z *A. thaliana*. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na cytokininy a jejich signální dráhu, malé organické fluorofory a spojení cytokininů s fluorescencí. V experimentální části byla připravena fluorescenční značka DEAC-OH a 20 C2-substituovaných a 2 N9-substituované deriváty aromatických cytokininů (BAP a Kin). U připravených látek byla kromě základních fyzikálně-chemických vlastností změřena také absorpční a fluorescenční spektra. Z hlediska struktury je vhodnější variantou použití delšího oddalovacího řetězce, protože v případě krátkého raménka došlo k poklesu relativní intenzity fluorescence a vyzářením energie excitovaného elektronu prostřednictvím nezářivého přechodu.

Z výsledků receptorových testů vyplývá, že připravené látky **12-33** se nejsou schopny vázat do aktivního místa cytokininových receptorů z *A. thaliana*. Ačkoliv neinteragují s cytokininovými receptory, mohou být použity ke sledování transportu uvnitř organismu (buněk), studiu interakcí s cytokinin-specifickými vazebnými proteiny či s jinými molekulárními cíli, a to jak v rostlinných, tak i živočišných buňkách.

## 7 Seznam použité literatury

- Aesculab 1 – Vazebný test ligand-receptor s živými buňkami – vsádková metoda.  
<http://www.aesculab.upol.cz/MobileModuleView.aspx?Id=634326849994459119P>  
(staženo 30. 6. 2016)
- Adronov A., Gilat S.L., Frechet J.M.J., Ohta K., Neuwahl F.V.R., Fleming G.R. (2000) Light harvesting and energy transfer in laser-dye-labeled poly(aryl ether) dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1175-1185.
- Anantharaman V., Aravind L. (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 579-582.
- Asami T., Tao L., Yamamoto S., Robertson M., Min Y.K., Murofushi N., Yoshida S. (1997) Fluorescence-labeled abscisic acid possessing abscisic acid-like activity in barley aleurone protoplasts. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **61**, 1198-1199.
- Beija M., Afonso C.A.M., Martinho J.M.G. (2009) Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2410-2433.
- Berthelot T., Lain G., Latxague L., Deleris G. (2004) Synthesis of novel fluorogenic L-Fmoc lysine derivatives as potential tools for imaging cells. *Journal of Fluorescence* **14**, 671-675.
- Bradley D., Williams G., Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.
- Caesar K., Thamm A.M.K., Witthoeft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **62**, 5571-5580.
- Capobianco M.L., Naldi M., Zambianchi M., Barbarella G. (2005) Oligothiophene phosphoramidites for oligonucleotide labelling. *Tetrahedron Lett.* **46**, 8181-8184.
- Fayed T.A. (2009) Extension of fluorescence response to the near-IR region. In *Reviews in fluorescence 2009, Vol. 6* (Geddes C.D.), 75-111, Springer-Verlag, New York, USA.
- Frébort I., Kowalská M., Hluška T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Kollmer I., Schmölling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255-267.



- Goncalves T. (2009) Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem. Rev.* **109**, 190-212.
- Gray W.R. (1972) [26a] Sequence analysis with dansyl chloride. In *Methods Enzymol.*, Vol. 25 (Hirs C.H.W., Timasheff S.N.), 333-344, Academic Press, New York, USA.
- Hamaguchi N., Iwamura H., Fujita T. (1985) Fluorescent anticytokinins as a probe for binding - isolation of cytokinin-binding proteins from the soluble fraction and identification of a cytokinin-binding site on ribosomes of tobacco callus cells. *Eur. J. Biochem.* **153**, 565-572.
- Heyl A., Schmülling T. (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 480-488.
- Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8821-8826.
- Hothorn M., Dabi T., Chory J. (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 766-768.
- Hwang I., Sheen J. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Hwang I., Sheen J., Muller B. (2012) Cytokinin signaling networks. In *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63, Vol. 63 (Merchant S.S.), 353-380,
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Ishida K., Yamashino T., Mizuno T. (2008) Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene ARR9 is regulated by the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **72**, 3025-3029.
- Iwamura H., Murakami S., Koga J.-I., Matsubara S., Koshimizu K. (1979) Quantitative analysis of anticytokinin activity of 4-substituted-2-methylthiopyrido[2,3-d]pyrimidines. *Phytochemistry* **18**, 1265-1268.
- Kania J. (2008) Syntéza a studium biologické aktivity nových substituovaných 6-benzylaminopurinů. Diplomová práce. UP v Olomouci, Česká republika.
- Keshishian E.A., Rashotte A.M. (2015) Plant cytokinin signalling. In *Plant Hormone Signalling*, Vol. 58 (Guilfoyle T., Hagen G.), 13-27,
- Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 814-819.

- Kubiasová K. (2012) Příprava a charakterizace fluorescenčně značených cytokininových derivátů. Bakalářská práce. UP v Olomouci, Česká republika.
- Meng Q., Yu M., Zhang H., Ren J., Huang D. (2007) Synthesis and application of N-hydroxysuccinimidyl rhodamine B ester as an amine-reactive fluorescent probe. *Dyes and Pigments* **73**, 254-260.
- Mik V. (2012) Synthesis and characterization of novel compounds interacting with metabolic pathways of plant hormones cytokinins. Structure-activity relationship. Disertační práce. UP v Olomouci, Česká republika.
- Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Vonsaltza M.H., Strong F.M. (1955a) Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2662-2663.
- Miller C.O., Skoog F., Vonsaltza M.H., Strong F.M. (1955b) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1392.
- Miller C.O. (1961) Kinetin-like compound in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 170-&.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89-118.
- Nishikawa S., Kurono M., Shibayama K., Okuno S., Inagaki M., Kashimura N. (2000) Synthesis and cytokinin activity of fluorescent 7-phenylethynylimidazo 4,5-b pyridine and its riboside. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2559-2564.
- Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Rashotte A.M., Mason M.G., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E., Kieber J.J. (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11081-11085.
- Rattan S.I.S., Clark B.F.C. (1994) Kinetin delays the onset of aging characteristics in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 665-672.
- Ricci A., Bertolotti C. (2009) Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. *Plant Biol.* **11**, 262-272.
- Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* **57**, 4051-4058.
- Sharma S.P., Kaur J., Rattan S.I.S. (1997) Increased longevity of kinetin-fed *Zaprionus fruitflies* is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 869-875.

- Shi X.L., Rashotte A.M. (2012) Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphotransfer proteins. *Plant Cell Rep.* **31**, 789-799.
- Spíchal L., Raková N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmülling T. (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299-1305.
- Sprecker M.A., Morrice A.G., Gruber B.A., Leonard N.J., Schmitz R.Y., Skoog F. (1976) Fluorescent cytokinins: stretched-out analogs of *N*<sup>6</sup>-benzyladenine and *N*<sup>6</sup>-(delta-2-isopentenyl)adenide. *Phytochemistry* **15**, 609-613.
- Strnad M., Peters W., Hanuš J., Beck E. (1994) *Ortho*-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from populus x canadensis cv robusta leaves. *Phytochemistry* **37**, 1059-1062.
- Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**, 674-688.
- Summerer D., Chen S., Wu N., Deiters A., Chin J.W., Schultz P.G. (2006) A genetically encoded fluorescent amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9785-9789.
- Sun W.C., Gee K.R., Klaubert D.H., Haugland R.P. (1997) Synthesis of fluorinated fluoresceins. *J. Org. Chem.* **62**, 6469-6475.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.
- Szjijarto C., Pershagen E., Ilchenko N.O., Borbas K.E. (2013) A versatile long-wavelength-absorbing scaffold for eu-based responsive probes. *Chemistry-a European Journal* **19**, 3099-3109.
- Tatkolov A.S. (2012) Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **13**, 55-90.
- Terai T., Nagano T. (2013) Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **465**, 347-359.
- Tkáč M. (2014) Příprava a charakterizace fluorescenčně značených derivátů aromatických cytokininů, zejména kinetinu, a jejich biologická aktivita. Diplomová práce. UP v Olomouci, Česká republika.
- To J.P.C., Kieber J.J. (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci.* **13**, 85-92.
- Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 231-235.

- Wagner B.D. (2009) The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems. *Molecules* **14**, 210-237.
- Werner T., Schmölling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.
- Yin Q., Huang C.S., Zhang C., Zhu W.P., Xu Y.F., Qian X.H., Yang Y. (2013) In situ visualization and detection of protein sulfenylation responses in living cells through a dimedone-based fluorescent probe. *Organic & Biomolecular Chemistry* **11**, 7566-7573.
- Zawadzki P., Slosarek G., Boryski J., Wojtaszek P. (2010) A fluorescence correlation spectroscopy study of ligand interaction with cytokinin-specific binding protein from mung bean. *Biol. Chem.* **391**, 43-53.
- Zürcher E., Müller B. (2016) Cytokinin synthesis, signaling, and function - advances and new insights. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 324 (Kwang W.J.), 1-38, Academic Press, New York, USA.