

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava a biologická aktivita nových purinových  
derivátů s protinádorovým účinkem**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Šárka Slamencová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.</b>
Rok:	2018

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

V Olomouci dne 11. 5. 2018

.....

Děkuji Mgr. Karlu Doležalovi, Dr., DSc. za odborné vedení mé bakalářské práce a za hodnotné připomínky, trpělivost a čas, který mi věnoval. Mé poděkování patří taktéž Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za věcné podněty a komentáře týkající se zadané problematiky. Moje bakalářská práce by nevznikla ani bez přispění Mgr. Magdalény Bryksové, která mi poskytla cenné rady, praktickou výpomoc a byla mi celou dobu morální podporou. Dále bych ráda poděkovala Bc. Janě Kočířové, doc. Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D., Ing. Jarmile Greplové, Jarmile Balonové, Kateřině Fakové, Janě Hudcové, Mgr. Zuzaně Pěkné a celému Oddělení buněčné biologie a genetiky CRH za praktickou pomoc s výzkumem.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Šárka Slamencová
Název práce	Příprava a biologická aktivita nových purinových derivátů s protinádorovým účinkem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie a genetiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>V teoretické části se bakalářská práce zabývá purinovými deriváty rostlinných hormonů, zejména cytokininů. Popisuje jejich vlastnosti a vliv na buňky jak rostlinné, tak i živočišné a konkrétně se hlouběji zabývá cytotoxickým efektem purinových derivátů vůči nádorovým buněčným liniím.</p> <p>V experimentální části byly připraveny čtyři ribosidové deriváty cytokininů a charakterizovány podle vybraných fyzikálně-chemických metod (HPLC/MS, NMR, EA, atd.) Dále byla testována jejich biologická aktivita a to jak v rostlinných cytokininových biotestech, ale především jejich cytotoxicita vůči nádorovým a nenádorovým buněčným liniím.</p>
Klíčová slova	cytokininů, cytokininové ribosidy, cytotoxicita, nádorové buňky
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Šárka Slamencová
Title	Preparation and biological activity of novel purine derivatives with antitumor effect
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>In the theoretical part of my bachelor thesis I deal with the purine derivatives of plant hormones, especially cytokinins. I describe their properties and effects on both plant and animal cells and I deal with the cytotoxic effect of purine derivatives on tumor cell lines.</p> <p>In the experimental part four riboside derivatives of cytokinins were prepared and characterized by selected physicochemical methods (HPLC/MS, NMR, EA, etc.). Their biological activity was tested in plant cytokinin bioassays, but especially their cytotoxicity against tumor and non-tumor cell lines was tested there.</p>
Keywords	cytokinins, cytokinin ribosides, cytotoxicity, tumor cells
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>10</b>
2.1	Rostlinné hormony .....	10
2.1.1	Dělení rostlinných hormonů.....	10
2.1.1.1	Auxiny .....	11
2.1.1.2	Cytokininy .....	11
2.1.1.3	Gibereliny .....	11
2.1.1.4	Kyselina abscisová.....	11
2.1.1.5	Ethylen.....	11
2.1.1.6	Další.....	12
2.2	Cytokininy .....	13
2.2.1	Rozdělení.....	13
2.2.2	Vlastnosti cytokininů .....	15
2.2.2.1	Biosyntéza.....	16
2.2.2.2	Degradace .....	17
2.2.2.3	Senescence.....	17
2.2.3	Cytokininové testy .....	18
2.2.3.1	Kalusový biotest .....	18
2.2.3.2	Senescenční biotest.....	18
2.2.3.3	<i>Amaranthový</i> biotest .....	19
2.2.3.4	Receptorový test .....	19
2.2.4	Buněčný cyklus .....	20
2.2.4.1	Na cyklinech závislé proteinkinasy .....	21
2.2.4.2	Inhibitory CDK.....	23
2.2.5	Cytokininové ribosidy.....	24
2.3	Protinádorová aktivita dalších rostlinných hormonů.....	27
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>28</b>
3.1	Materiál.....	28
3.1.1	Chemikálie .....	28
3.1.2	Přístroje .....	28
3.1.3	Buněčné linie.....	29
3.2	Metody.....	29
3.2.1	Syntéza látek .....	29

3.2.1.1	Příprava látky (2R,3R,4S,5R)-2-{6-[(4-bromo-2-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (1).....	29
3.2.1.2	Příprava látky (2R,3S,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-{[1-(2-hydroxyphenyl)ethyl]amino})-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diol (2) .....	30
3.2.1.3	Příprava látky (2R,3R,4S,5R)-2-{6-[(5-chloro-2-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (3).....	30
3.2.1.4	Příprava látky (2R,3R,4S,5R)-2-{6-[(5-fluoro-2-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (4).....	31
3.2.2	Analytické metody .....	32
3.2.3	Cytotoxicita látek na buněčné linie .....	33
3.2.4	Cytokininové testy .....	34
3.2.4.1	Kalusový biotest .....	34
3.2.4.2	Senescenční biotest .....	35
3.2.4.3	<i>Amaranthový</i> biotest .....	35
3.2.4.4	Receptorový test .....	35
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
4.1	Analýza připravených látek.....	37
4.1.1	Látka 1.....	37
4.1.2	Látka 2.....	37
4.1.3	Látka 3.....	37
4.1.4	Látka 4.....	38
4.2	Cytotoxicita látek – IC <sub>50</sub> .....	39
4.3	Cytokininové biotesty.....	39
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>49</b>

## **CÍLE PRÁCE**

1. Vypracování literární rešerše na téma protinádorové a biologické aktivity purinových derivátů
2. Syntéza nových purinových derivátů – deriváty benzylaminopurin ribosidu
3. Testování připravených látek – fyzikálně-chemická analýza látek a testování jejich biologické aktivity (cytokininové testy, testy cytotoxicity na nádorových a nenádorových buněčných liniích)
4. Interpretace získaných dat



# 1 ÚVOD

Rostlinné hormony, jejichž základní chemickou strukturu tvoří purin, se nazývají cytokininy. Tradiční přirozeně se vyskytující rostlinné cytokininy jsou N<sup>6</sup> substituované deriváty adeninu a řadí se mezi ně například isopentenyladenin či *trans*-zeatin. V současné době jsou však objevovány další deriváty substituované zejména v polohách N9 a C2, a to jak přírodního, tak syntetického původu.

Cytokininy ovlivňují v rostlinných buňkách řadu procesů, podporují dělení a diferenciaci buněk, jsou zodpovědné, za větvení stonku a tvorbu postranních pupenů, dále také oddalují stárnutí buněk (senescenci) a napomáhají k tvorbě chlorofylu.

Bylo zjištěno, že určité deriváty cytokininů jsou schopny působit cytotoxicky vůči nádorovým buňkám, avšak neovlivňovat buňky nenádorové. Jedna skupina purinových derivátů působí jako inhibitory na cyklinech závislých proteinkinasy, což jsou látky hrající důležitou roli v regulaci buněčného cyklu. Jejich aktivita je zvýšená v nádorové tkáni – inhibitory se proto testují jako antineoplastika.

Dalšími cytokinovými deriváty fungujícími ovšem na odlišném principu jsou sloučeniny, které mají na N9 pozici navázanou ribosu, tedy cytokininové ribosidy. Některé z těchto látek jsou velmi cytotoxické pro nádorové buňky, kde způsobují pokles množství ATP a navozují ztrátu permeability buněčné membrány. I nadále jsou zkoumány další látky z této skupiny a zjišťuje se také na jakém dalším principu mohou fungovat. Zdá se, že i malá modifikace v substituentech navázaných na purinové jádro, může způsobit velké změny v jejich biologické aktivitě.

V této práci byly připraveny čtyři sloučeniny jejichž základem je benzylaminopurin ribosid (BAPR), syntetický cytokinin, na němž byly provedeny drobné strukturní změny, jejichž výsledný vliv na buňky byl dále zkoumán. Byla provedena fyzikálně-chemická analýza připravených látek a jejich biologická aktivita byla otestována pomocí rostlinných cytokininových testů. Výsledná cytotoxicita připravených derivátů byla testována jak na nenádorových, tak i na nádorových buněčných liniích.

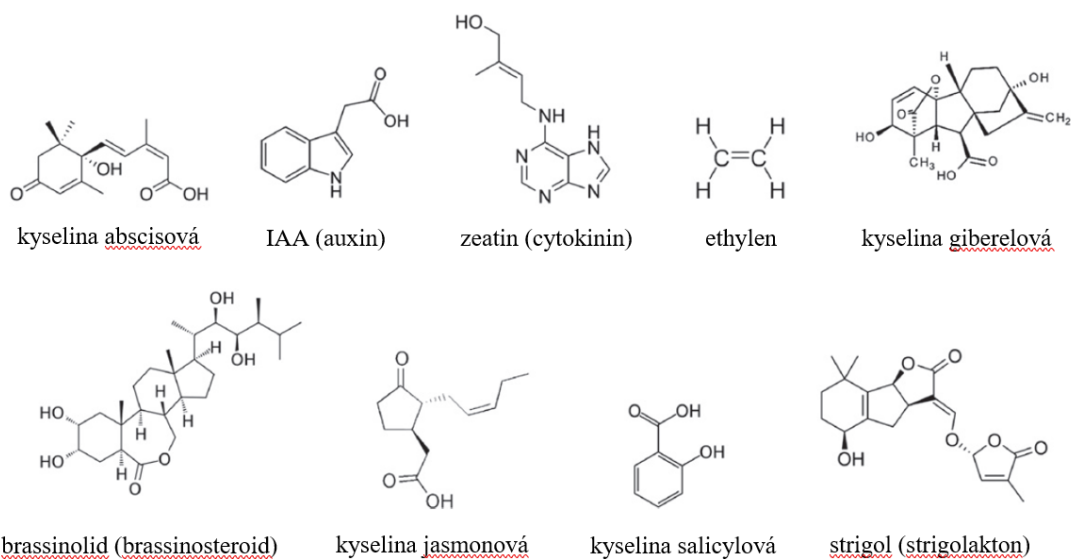
## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou skupina přirozeně se vyskytujících organických látek, jež jsou i při velmi nízkých koncentracích schopny ovlivňovat fyziologické pochody v buňkách (Davies, 2010). Obecný model působení hormonů je, že se vážou na membránový receptor a signál pak dále putuje do buňky pomocí systému druhých posílů anebo hormon sám přímo proniká do buňky a v cytoplazmě se váže na rozpustný receptor, v obou případech se signál dostává do jádra, kde způsobuje změnu v expresi genů. Ačkoliv se rostlinné hormony od živočišných v mnoha ohledech liší (rostliny nemají žlázy s vnitřní sekrecí a jejich hormony jsou méně specifické), mechanismus jejich působení je velmi podobný, a proto se i u rostlin používá pojem hormony (Procházka *et al.*, 1998).

#### 2.1.1 Dělení rostlinných hormonů

Látky regulující růstové a vývojové procesy v rostlinách se obecně nazývají růstové regulátory a dělí se na fytohormony a další látky s růstově-regulační aktivitou. Mezi fytohormony řadíme auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou, ethylen, brasinosteroidy a strigolaktony (Obr. 1). Mezi další skupiny látek s růstově-regulační aktivitou můžeme zařadit i polyaminy, kyselinu jasmonovou, salicylovou, oligosachariny a některé fenolické látky, tyto látky však z různých důvodů nelze zařadit mezi hormony (Procházka *et al.*, 1998).



Obr. 1 Základní struktury rostlinných růstových regulátorů (převzato z: Wani *et al.*, 2016).

### **2.1.1.1 Auxiny**

Auxiny se řadí mezi hlavní z rostlinných hormonů. Podílejí se zejména na dlouhivém růstu (stimulace apikální dominance), stimulaci buněčného dělení a diferenciaci buněk. Velmi často spolupracují s cytokininy, jejich vzájemný poměr má za následek růst různých částí rostlinného těla. Hlavním přirozeně se vyskytujícím se auxinem je indol-3-octová kyselina (IAA, indole-3-acetic acid) (Obr. 1) (Lack a Evans, 2005).

### **2.1.1.2 Cytokininy**

Cytokininy podporují buněčné dělení a diferenciaci buněk. Při aplikaci na rostlinné tkáňové kultury jsou schopny společně s auxiny navodit buněčné dělení či morfogenezi. V tkáňových kulturách indukují růst nadzemní části – prýtlů. V rostlinách jsou cytokininy zodpovědné za tvorbu pupenů a růst postranních výhonů, tedy za větvení stonku. Podporou dělení buněk pomáhají také zvětšovat celkový povrch listů, tak aby byl odpovídající velikosti kořenového systému. Z dalších vlastností jsou cytokininy schopny oddalovat senescenci, napomáhají k dozrávání a vývoji chloroplastů či u některých druhů přispívají k otevírání průduchů (Davies, 2010).

### **2.1.1.3 Gibereliny**

Gibereliny stimulují prodlužovací růst a v závislosti na teplotě a délce dne indukují kvetení. Ovlivňují také procesy zahrnuté v dormanci semen a pupenů (Lack a Evans, 2005).

### **2.1.1.4 Kyselina abscisová**

Kyselina abscisová kontroluje klíčení semen, navozením dormance zabraňuje jejich předčasnému vyklíčení (např. při nevhodných podmínkách). Také urychluje proces stárnutí. Na rozdíl od giberelinů a auxinů inhibuje růst do délky (Procházka *et al.*, 1998).

### **2.1.1.5 Ethylen**

Ethylen je plynný hormon regulující dozrávání plodů. V semenáčcích iniciuje tzv. trojnou odezvu (triple response): epinastii, laterální růst a inhibici elongace. Taktéž podporuje senescenci a opad plodů (Lack a Evans, 2005).

### 2.1.1.6 Další

Mezi *polyaminy* řadíme například putrescin a spermidin. Tyto látky ovlivňují dělení a vývoj buněk a také jsou zahrnuty v odpovědích na stres (Lack a Evans, 2005).

*Brassinosteroidy* se v rostlinách vyskytují ve velmi malých koncentracích, ale současně s dalšími hormony se účastní regulace růstu a diferenciaci buněk (Lack a Evans, 2005).

*Jasmonáty* se řadí mezi rostlinné stresové hormony. Poprvé byly izolovány z rostliny jasmínu (odtud název). Konkrétní přirozené látky spadající mezi jasmonáty jsou: kyselina jasmonová, methyl jasmonát a *cis*-jasmon (Raviv *et al.*, 2013). Tyto látky hrají důležitou roli v obraně rostliny, mohou také inhibovat klíčení a růst buněk nebo podporovat senescenci a zrání plodů (Davies, 2010).

*Kyselina salicylová* je sekundárním metabolitem, jež v rostlinách funguje jako růstová regulační substance. Pomáhá ochraňovat nukleové kyseliny a předchází degradaci proteinů (Amanullah *et al.*, 2010). Stejně jako jasmonáty působí v rostlinách jakožto stresový hormon, který aktivuje buněčnou odpověď na různé stresové faktory (Fingrut a Flescher, 2002).

*Strigolaktony* jsou látky relativně nově identifikované jako rostlinné hormony. Jejich název vznikl spojením slov „*Striga*“, protože podporují klíčení kořenových parazitických rostlin, jako je například *Striga* spp., a „lakton“, neboť ve své struktuře obsahují laktonové skupiny. Jsou produkovány v kořenech a inhibují větvení stonku. Strigolaktony jsou považovány za výhodný rostlinný metabolit, jelikož hrají významnou roli v regulaci arbuskulární mykorrhizy (podporují růst symbiotických hub). Je možné, že mají i další funkci v komunikaci v rhizosféře a ovlivňují také růst a vývoj rostlin (Xie *et al.*, 2010; Pollock *et al.*, 2012).

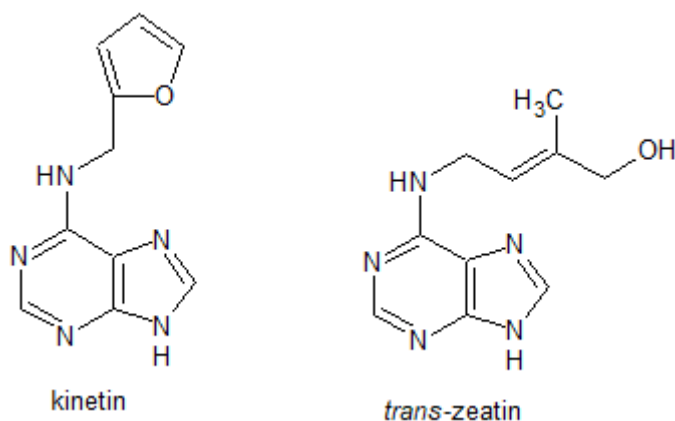
## 2.2 Cytokininy

### 2.2.1 Rozdělení

První objevenou látkou řadící se mezi cytokininy byl v 50. letech 20. století 6-furfurylaminopurin označovaný triviálním názvem kinetin (Obr. 2), který byl izolovaný z autoklávované DNA ze sledího spermatu. Tato látka se sice řadí mezi cytokininy, nicméně nevyskytuje se přirozeně v rostlinách. Takovou látkou byl až *trans*-zeatin (tZ) (Obr. 2, Tab. 1), který byl v 60. letech 20. století izolován z nezralého endospermu kukuřice (Davies, 2010).

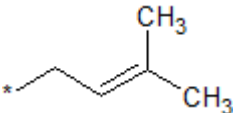
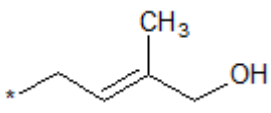
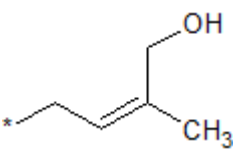
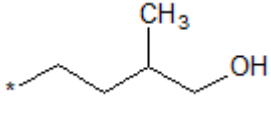
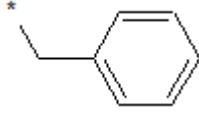
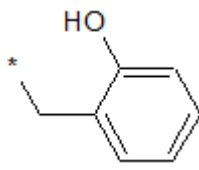
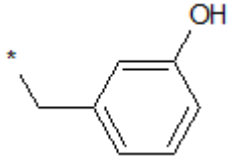
Postupně bylo zjištěno, že rostlinné cytokininy jsou deriváty adeninu, substituované v poloze N<sup>6</sup>. Substituentem může být buď isoprenoidní řetězec (mluvíme pak o **isoprenoidních cytokininech**) nebo aromatická skupina (**aromatické cytokininy**) (Davies, 2010). V rostlinách se cytokininy vyskytují ve velmi malých koncentracích nejčastěji ve formě volných bází, nukleotidů, nukleosidů nebo glukosidů (Doležal *et al.*, 2007).

Při *in vitro* kultivaci rostlin se v médiích často používá kinetin nebo benzylaminopurin (BAP). Benzylaminopurin byl původně považován za syntetickou látku, ale později byl jeho derivát *o*-hydroxybenzyladenin (*o*-topolin) (Tab. 1) objeven v listech topolu. Vykazoval však pouze nízkou cytokininovou aktivitu, tudíž mu nebyla věnována velká pozornost. Podle místa nálezu se hydroxy-deriváty benzylaminopurinu nazývají *topoliny* a řadí se mezi aromatické cytokininy. Dnes již víme, že se tyto látky vyskytují v rostlinách běžně a *m*-topolin (Tab. 1) dokonce vykazuje jednu z nejvyšších aktivit v biotestech (Procházka *et al.*, 1998).



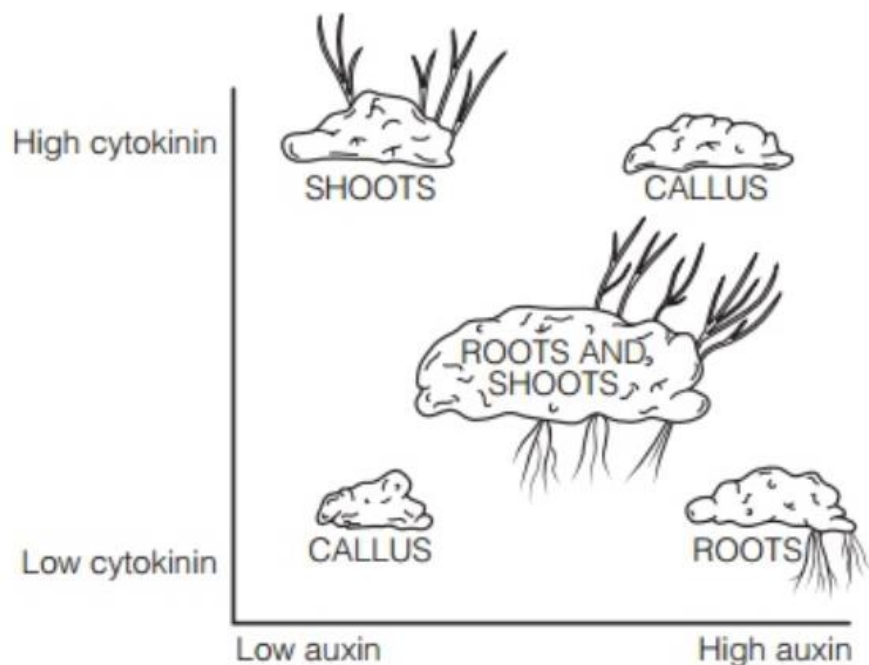
Obr. 2 Struktury látek kinetin a *trans*-zeatin

Tab. 1 Struktury a názvy přirozeně se vyskytujících cytokininů (převzato z Davies, 2010)

R <sub>1</sub>	báze	nukleosid	nukleotid
	isopentenyladenin (iP)	isopentenyladenin ribosid (iPR)	isopentenyladenin ribosid 5'-(mono, di, tri) fosfát (IPRMP, IPRDP, IP RTP)
	<i>trans</i> -zeatin (tZ)	<i>trans</i> -zeatin ribosid (tZR)	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-(mono, di, tri) fosfát (tZRMP, tZRDP, tZRTP)
	<i>cis</i> -zeatin (cZ)	<i>cis</i> -zeatin ribosid (cZR)	<i>cis</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát (cZRMP)
	dihydrozeatin (DZ)	dihydrozeatin ribosid (DZR)	dihydrozeatin ribosid 5'-monofosfát (DZRMP)
	benzyladenin (BAP)	benzyladenin ribosid (BAPR)	benzyladenin ribosid 5'-monofosfát (BAPRMP)
	<i>ortho</i> -topolin (oT)	<i>ortho</i> -topolin ribosid (oTR)	
	<i>meta</i> -topolin (mT)	<i>meta</i> -topolin ribosid (mTR)	

## 2.2.2 Vlastnosti cytokininů

Cytokiny se účastní mnoha růstových a vývojových procesů v rostlinách, zejména buněčného dělení. Dohromady s auxiny se mohou podílet na regeneraci rostlinných orgánů v případě poškození nebo při *in vitro* kultivaci. V závislosti na jejich poměru aplikovaném na rostlinný materiál se vyvíjí kalus, kořeny nebo nadzemní část. Při vyšší koncentraci cytokininů a nižší koncentraci auxinů dochází k podpoře růstu nadzemní části, naopak při větším množství auxinů a nižším množství cytokininů se formují spíše kořeny. Při vyrovnaném a dostatečně vysokém množství obou hormonů dochází ke vzniku kalusu (Obr. 3) (Lack a Evans, 2005). Během růstu a vývoje rostlin potlačují cytokiny apikální dominanci (jsou tedy antagonisty auxinů) a podporují spíše větvení stonku. Dalšími významnými vlastnostmi je stimulace růstu a zakládání pupenů, oddalování senescence či podpora tvorby chlorofylu (Davies, 2010).



Obr. 3 Indukce růstu kalusu, stonku nebo kořenů na médiích s různým poměrem auxinů a cytokininů (převzato z Lack a Evans, 2005)

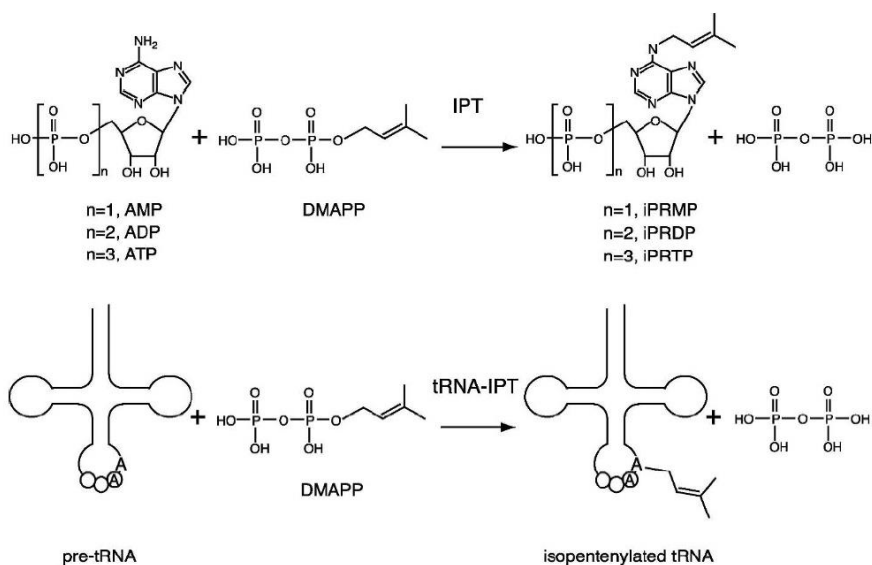
### 2.2.2.1 Biosyntéza

Cytokiny jsou nejčastěji syntetizovány v kořeni a poté transportovány xylémem do dalších částí rostliny, avšak i jiné části rostliny jsou za určitých podmínek schopny syntetizovat cytokiny samy. Nejvíce cytokininů bývá nalezeno v rychle se dělicích částech rostlin (Procházka *et al.*, 1998).

Biosyntéza cytokininů se dá rozdělit zvlášť na biosyntézu isoprenoidních a aromatických cytokininů. **Isprenoidní cytokiny** mohou být syntetizovány dvojitou cestou, a to buď isopentenylací volných adeninových nukleotidů nebo přes degradaci tRNA (Obr. 4). Cytokiny isopentenyladenin (iP) a isopentenyladenin ribosid (iPR) jsou syntetizovány reakcí dimethylallyldifosfátu (DMAPP) a AMP (možným substrátem je i ADP či ATP) za katalýzy isopentenyltransferasou (IPT), kdy jako primární produkt vznikne isopentenyladenin ribosid monofosfát (iPRMP) (případně di-/tri-fosfát) (Davies, 2010).

Další možná cesta je biosyntéza pomocí tRNA. Některé tRNA molekuly mohou obsahovat iPR na straně připojení k antikodonu. Biosyntéza pak probíhá pomocí tRNA-IPT, která katalyzuje první krok v isopentenylaci adeninových residuů. Následná degradace tRNA pak produkuje aktivní cytokiny, jako například: iPR, methylthio-iPR, tZR, *cis*- a *trans*-methylthio-ZR (Davies, 2010).

Část biosyntetické dráhy u **aromatických cytokininů** je nejspíše podobná jako u isoprenoidních cytokininů. Přesná dráha ani následná přeměna na aromatické cytokiny není ovšem zatím přesně známa (Davies, 2010).



Obr. 4 Schéma biosyntézy isoprenoidních cytokininů katalyzované IPT nebo tRNA-IPT (převzato z Davies, 2010)



### 2.2.2.2 Degradace

Pro udržení homeostázy v rostlinách je pro rostlinnou buňku důležité kontrolovat množství aktivních cytokininů a jejich přebytek případně odbourat. Za degradaci cytokininů je zodpovědný enzym cytokinin oxidasa/dehydrogenasa CKX (EC 1.5.99.12). Princip degradace spočívá v odštěpení postranního řetězce. Tento enzym je schopen degradovat pouze báze a nukleosidové formy isoprenoidních cytokininů s nenasyceným postranním řetězcem – např. isopentenyl adenin a *trans*-zeatin a jejich ribosidy. Tento proces je nevratný. Způsob degradace aromatických cytokininů zůstává stále neznámý (Davies, 2010).

Další možný způsob inaktivace cytokininů je konjugací. Cytokininy jsou v pozicích N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> glukosylované enzymem N-glukosyltransferasou. Tímto způsobem dochází k produkci neaktivních N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> glukosidů. N-glukosyltransferasa dosahuje nejvyšší aktivity s isoprenoidními cytokininy (Frébort *et al.*, 2011).

### 2.2.2.3 Senescence

Jednou z vlastností cytokininů je jejich schopnost oddalovat senescenci rostlinných buněk. Senescenci jako takovou je možné rozdělit na mitotickou senescenci a post-mitotickou senescenci. Mitotická senescence nastává v okamžiku, kdy se buňka přestává dělit. Tato buňka se již dále sice dělit nemůže, avšak může ještě určitou dobu žít. V případě, že však dochází k buněčné smrti a v buňce již nastávají degenerační procesy, jedná se o post-mitotickou senescenci. (Davies, 2010).

Senescence u rostlin nastává následkem stresových podmínek prostředí (vysoká/nízká teplota, sucho, nedostatek výživy, ...) nebo je ovlivněna vnitřními faktory (stáří a stav rostliny, růstové regulátory). Mezi látky podporující navození senescence se řadí ethylen, kyselina abscisová, salicylová, jasmonáty či brassinosteroidy. Naopak senescenci oddalujícími látkami jsou cytokininy, auxiny, gibereliny a polyaminy (Davies, 2010).

Je známo, že cytokininy jsou v rostlinách schopny inhibice mitotické senescence, avšak bylo také zjištěno, že kinetin oddaluje mitotickou senescenci i v lidských buňkách. Cytokininy jsou výraznými inhibitory listové senescence. Při jejich aplikaci na oddělené a žloutnoucí listy způsobují jejich opětovné omlazení či dokonce zezelenání. Toto se děje jak u jednoděložných, tak u dvouděložných rostlin. V různých druzích rostlin a jejich pletiv – byl potvrzen obrácený vztah mezi množstvím cytokininů a stádiem senescence,

tedy čím pokročilejší stádium senescence, tím méně cytokininů se v rostlině nachází. Díky genetickým manipulacím a transgenním rostlinám můžeme v současné době získat stále více důkazů o inhibičním účinku cytokininů na listovou senescenci (Davies, 2010).

### **2.2.3 Cytokininové testy**

Pro hodnocení vlivu cytokininů na různé biologické procesy je používáno několik testů (kalusový, senescenční, *Amaranthový* a receptorový). Získané hodnoty jsou vztahovány k aktivitě vysoce aktivních cytokininů (např. BAP). V jednotlivých testech mohou různé typy a formy cytokininů vykazovat odlišnou aktivitu. I malé změny ve struktuře látek mohou mít na jejich aktivitu velký vliv (Tarkowski *et al.*, 2004).

#### **2.2.3.1 Kalusový biotest**

Kalusový biotest stanovuje schopnost dané testované látky přítomné v médiu indukovat nárůst tabákového kalusu. Používá se kalus rostlin *Nicotiana tabacum*, jež je pěstován po dobu čtyř týdnů. Poté je změřen přírůstek čisté váhy kalusu. Vzhledem k tomu, že cytokininy podporují dělení buněk, je u látek s cytokininovou aktivitou patrný přírůstek na váze kalusu. Jestliže látka nepůsobí jako cytokinin, k nárůstu kalusu nedochází (Holub *et al.*, 1998).

Hydroxylace v *meta* pozici na benzenovém kruhu zvyšuje aktivitu látek v kalusovém biotestu. Aktivita ribosidů ovšem obvykle nepřesáhne aktivitu jejich volných bazí (Holub *et al.*, 1998).

#### **2.2.3.2 Senescenční biotest**

Senescenční test měří množství chlorofylu obvykle v listech obilnin. Po vývinu prvního listu a počátku růstu druhého se oddělí vrcholová část prvního listu nechá se 96 hodin inkubovat ve tmě v přítomnosti testované látky. Poté je chlorofyl extrahován a je změřena absorbance extraktu při 665 nm. V porovnání s extrakty z čerstvých listů se dá zjistit jaké množství chlorofylu bylo degradováno. Jak známo cytokininy zpomalují stárnutí (senescenci) a tedy i degradaci chlorofylu, tedy čím vyšší cytokininovou aktivitu daná látka vykazuje, tím méně chlorofylu je degradováno (Holub *et al.*, 1998).

Ribosidy jsou v tomto testu obvykle výrazně aktivnější než BAP. Určité deriváty benzyl adenosinu překračují aktivitu BAP i dvakrát. Jejich aktivitu zvyšuje zejména začlenění atomu fluoru na benzenový kruh či methoxy deriváty (Doležal *et al.*, 2007).

### 2.2.3.3 *Amaranthový* biotest

Bamberger a Mayer (1960) zjistili, že ve tmě a v přítomnosti kinetinu dochází v semenáčcích rostliny *Amaranthus retroflexus* ke tvorbě červeného pigmentu. Při klíčení semen ve vodě a ve tmě bez přítomnosti kinetinu se vytvořili bezbarvé semenáčky, za stejných podmínek ale v roztoku kinetinu obsahovaly semenáčky červený pigment, jež byl soustředován v kotyledonech.

Později bylo zjištěno, že dané barvivo se nazývá betacyanin. Test probíhá tak, že se měří množství vzniklého betacyaninu v hypokotylu a kotyledonech rostliny *Amaranthus caudatus* pěstované ve tmě (Biddington a Thomas, 1973). Barvivo betacyanin je z rostlin extrahováno a jeho koncentrace je určena porovnáním hodnot absorbancí při 537 nm a 620 nm (Holub *et al.*, 1998).

Cytokininové volné báze v tomto testu obvykle dosahují o něco vyšších hodnot než jejich odpovídající ribosidy (potvrzeno u BAP, tZ, oT, mT). (Holub *et al.*, 1998) Ovšem halogenové a zejména fluoro-deriváty na benzenovém kruhu ribosidů vykazují v tomto testu vyšší aktivitu i než BAP (Doležal *et al.*, 2007). V případě, že se atom halogenu nachází na pozici C2 dochází taktéž ke zvýšení cytokininové aktivity v tomto biotestu (a obvykle i v receptorovém) (Savelieva *et al.*, 2018).

### 2.2.3.4 Receptorový test

V genomu rostliny *Arabidopsis thaliana* se nachází šest receptorových histidinových kinas: CRE1/WOL/AHK4, AHK2, AHK3, AtHK1, CKI1 a CKI2/AHK5, z nichž tři vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci, a to: AHK2, AHK3 a AHK4. Tyto receptorové geny jsou exprimovány v kořenech, stoncích, listech i květech rostlin (Higuchi *et al.*, 2004).

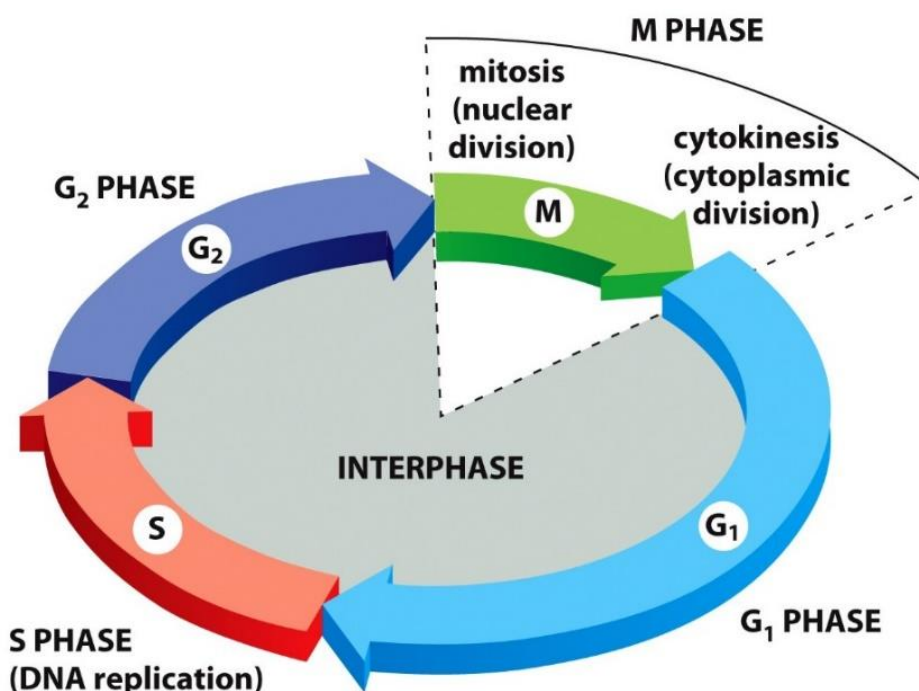
Pro relativně rychlé testování cytokininové aktivity byl vyvinut bakteriální test, kde v bakterii *E. coli* jsou funkčně exprimovány cytokininové receptory AHK3 a AHK4. Během testu jsou bakterie kultivovány na médiích obsahujících zkoumanou látku. Jestliže látka vykazuje cytokininovou aktivitu dochází k tvorbě modrých bakteriálních kolonií, v opačném případě se tvoří kolonie bílé (Suzuki *et al.*, 2001).

Oproti volným bázím vykazují ribosidy nižší míru aktivace cytokininových receptorů AHK3 a AHK4. Neaktivnější v tomto testu bývají isoprenoidní cytokininy – nejvyšší míry aktivace u obou receptorů dosahuje *trans*-zeatin (100 %), jeho ribosid *tZR* však dosahuje pouhých 10 % aktivace AHK4 a 93 % u AHK3. Další z isoprenoidních

cytokininů – iP dosahuje u obou receptorů aktivity vyšší než 70 % (v porovnání s *tZ*), jeho ribosid ale pouze 10 %. Aromatické cytokininy nemívají obvykle příliš vysoké výsledky – BAP aktivuje AHK4 ze 7 % a AHK3 z 24 %, ribosid BAPR neaktivuje AHK4 vůbec a AHK3 jen ze 4 % (Spíchal *et al.*, 2004).

## 2.2.4 Buněčný cyklus

Cílem buněčného dělení je rozdělení genetické informace mateřské buňky do dalších generací. Buněčný cyklus se skládá z několika fází: G<sub>1</sub> fáze, S fáze, G<sub>2</sub> fáze a M fáze (Obr. 5). V **S fázi** (syntéza DNA) dochází ke zdvojení množství DNA v buňce. V **M fázi** probíhá mitóza a následně i samotná cytokinese, tj. rozdělení buňky. S a M fázi oddělují tzv. gap fáze (G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>), v nichž se buňka na základě vnějších podmínek a signálů z dalších buněk rozhoduje, zda postoupí do další fáze nebo ještě setrvá v současné fázi. Před začátkem S fáze se nachází **G<sub>1</sub> fáze**, během této fáze může buňka na základě určitých podmínek přejít do klidové (nedělící se) fáze **G<sub>0</sub>**, ve které může zůstat libovolně dlouhou dobu (Alberts *et al.*, 2008). Do klidové fáze mohou přejít všechny buňky a mohou z ní také vystoupit, avšak kromě buněk, které již dosáhly terminálního stádia diferenciaci, ty v G<sub>0</sub> fázi již zůstávají (Malumbres a Barbacid, 2001). Po S fázi a před začátkem M fáze se nalézá druhá z gap fází – **G<sub>2</sub> fáze** (Alberts *et al.*, 2008).



Obr. 5 Schéma buněčného cyklu (převzato z Alberts *et al.*, 2008)

Aby všechny fáze proběhly správně, je potřeba různých regulačních a kontrolních mechanismů. Musí být zkontrolováno například, zda buňky dosáhly správné velikosti nebo zda je správný počet buněk v každém orgánu daného organismu. Rakovinné buňky mají obvykle změny v regulačních mechanismech, jež vedou k neustálému dělení (Malumbres a Barbacid, 2001). V regulaci buněčného cyklu hrají důležitou roli proteinkinasy a proteinfosfatasy. Proteinkinasy jsou enzymy jež katalyzují fosforylaci, tedy přenos fosfátové skupiny z ATP na postranní řetězec aminokyseliny. Naopak proteinfosfatasy katalyzují defosforylaci. Oba druhy enzymů se v buňce vyskytují po čas celého buněčného cyklu, avšak jsou cyklicky zapínány a vypínány – pomocí proteinů cyklinů. Cykliny samy o sobě nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu, ale jejich navázání na kinasy způsobuje aktivaci těchto enzymů (odtud název na cyklinech závislé proteinkinasy – CDK – z anglického „cyklin dependent proteinkinases“) (Alberts *et al.*, 2008).

#### 2.2.4.1 Na cyklinech závislé proteinkinasy

Koncentrace cyklinů se během buněčného cyklu cyklicky mění a dochází k tvorbě cyklin-CDK komplexů. Cykliny můžeme rozdělit do čtyř tříd podle funkce a fáze buněčného cyklu, ve které se vážou na CDK. **G<sub>1</sub>/S-cykliny** aktivují CDK v pozdní G<sub>1</sub> fázi a jejich hladina klesá v S fázi, **S-cykliny** se váží na CDK během S fáze a jejich množství zůstává zvýšené až do M fáze. **M-cykliny** aktivují CDK, jež stimulují vstup do mitózy po G<sub>2</sub>/M kontrolním bodu. Čtvrtá třída cyklinů – **G<sub>1</sub>-cykliny** obvykle řídí aktivity G<sub>1</sub>/S cyklinů (Alberts *et al.*, 2008).

Bylo popsáno 11 typů lidských CDK a 9 proteinů podobných CDK. Buněčného cyklu se účastní CDK1-4, CDK6, CDK10 a CDK11 (Malumbres a Barbacid, 2005). Jak již bylo zmíněno cykliny tvoří s CDK komplexy (Tab. 2).

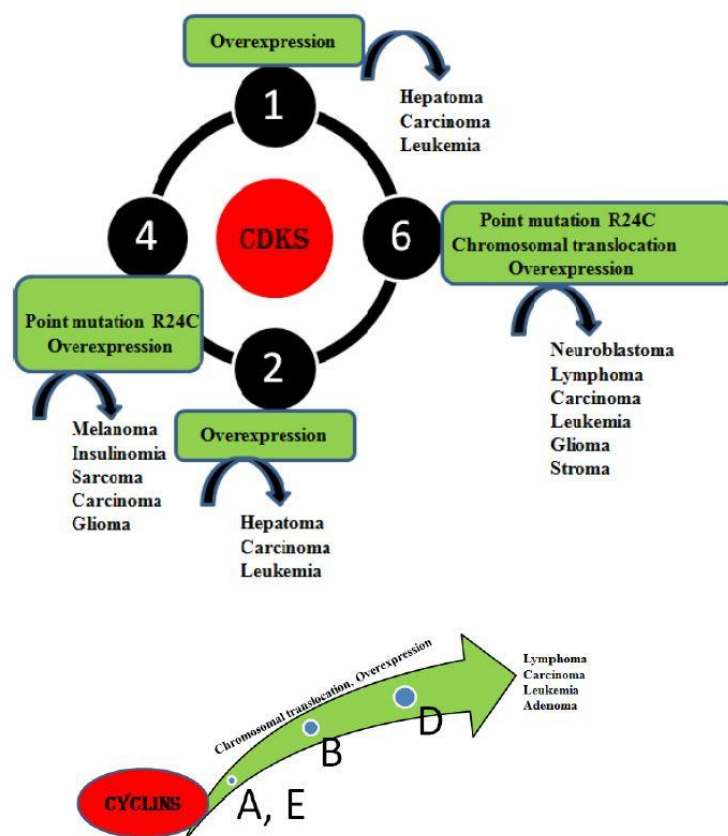
Tab. 2 Tvorba komplexů cyklin-CDK (převzato z Alberts *et al.*, 2008)

CYKLIN-CDK KOMPLEX	CYKLIN	CDK
<i>G<sub>1</sub> – CDK</i>	Cyklin D1, D2, D3	CDK 4, CDK6
<i>G<sub>1</sub>/S-CDK</i>	Cyklin E	CDK 2
<i>S-CDK</i>	Cyklin A	CDK 1, CDK2
<i>M-CDK</i>	Cyklin B	CDK1

CDK4 a CDK6 tvoří aktivní komplexy s cykliny D a účastní se G<sub>1</sub> fáze buněčného cyklu. Dokončení G<sub>1</sub>-fáze a počátek S fáze kontroluje CDK2, jež je aktivovaná cyklinem E. Samotnou S fázi pak reguluje CDK1 s cyklinem A. Během M fáze působí CDK1 a cyklin B (Malumbres a Barbacid, 2001, Alberts *et al.*, 2008).

Na cyklinech závislé proteinkinasy hrají významnou roli i při vzniku rakoviny. Při zvýšené expresi CDK nebo naopak inaktivaci určitých inhibitorů CDK nedochází ke správné kontrole a následnému zastavení buněčného dělení či navození apoptosy ve vhodnou chvíli, čímž může dojít ke vzniku nádorového bujení. Zaměření se na zastavení buněčného cyklu inhibicí CDK je jedním z cílů v léčbě rakoviny (Chashoo a Saxena, 2014).

Bylo zjištěno, že například u určitých druhů leukemií, prsních nádorů, sarkomů či gliomů dochází k nadexpresi CDK4 a CDK6 (Obr. 6). Při vzniku rakoviny má určitou roli i CDK2, jelikož bylo zjištěno, že během vývoje nádorů dochází k umlčení proteinů p21 a p27, jež jsou inhibitory CDK2. Protein p21 je pod kontrolou p53 – tumor supresorového genu, který je důležitý v kontrole poškození DNA. Také nadexprese CDK1 byla pozorována při rakovině vaječníků, naopak ztráta její funkce je spojena s rakovinou plic (Malumbres a Barbacid, 2001; Chashoo a Saxena, 2014).

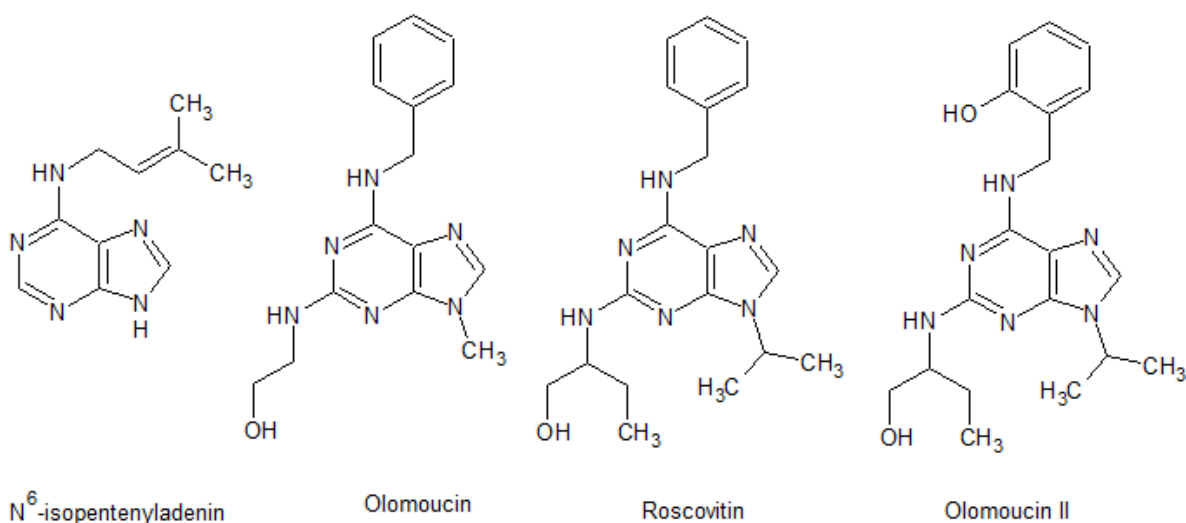


Obr. 6 Deregulace CDK a cyklinů a její následky (převzato z Chashoo a Saxena, 2014)

## 2.2.4.2 Inhibitory CDK

Jako prvotní významná skupina inhibitorů CDK byla objevena purinová analoga. Jako první látka zjištěná jako nespecifický inhibitor CDK1 je **N<sup>6</sup>-isopentenyladenin** (Obr. 7) (přirozený rostlinný cytokinin), díky kterému dochází k inhibici histon H1 kinasové aktivity (Rialet a Meijer, 1991). Dalším význačným objevem byla látka s názvem 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin neboli **olomoucín** (Obr. 7). Kinetická analýza ukázala, že olomoucín funguje jako kompetitivní inhibitor v místě pro navázání ATP a již specificky působí inhibičním efektem vůči CDC2 (protein v *Schizosaccharomyces pombe* homologní lidské CDK1), CDK2 a CDK5 (na CDK4 a 6 inhibičně nepůsobí). Konkrétní inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) pro CDC2 je 7 μM, pro CDK5 jsou to 3 μM. Díky jeho selektivitě může být použit jako anti-mitotické činidlo, jež by mohlo inhibovat určité fáze buněčného cyklu, a tedy najít uplatnění i při léčbě rakoviny. V důsledku těchto poznatků byly vyvíjeny další inhibitory CDK vycházející právě ze struktury olomoucínu (Veselý *et al.*, 1994).

Strukturní modifikace olomoucínu v polohách C2 a N9 vedla k objevu **roscovitinu**, systematicky 2-[[1-(1-hydroxymethyl)propyl]amino]-6-benzylamino-9-isopropylpurin (Obr. 7). IC<sub>50</sub> pro CDC2 u této látky je 0,45 μM. Roscovitin stejně jako olomoucín inhibuje komplex CDC2/cyklin B taktéž kompetitivní inhibicí pro vazbu s ATP (de Azevedo *et al.*, 1997).



Obr. 7 Struktury látek N<sup>6</sup>-isopentenyladenin, Olomoucín, Roscovitin a Olomoucín II

Bylo připraveno několik dalších látek (bohemín, olomoucín II, purvalanol A), z nichž nejnižší  $IC_{50}$  pro inhibici CDK1/cyklin B má **olomoucín II**, a to  $0,02 \mu\text{M}$ . Systematicky se olomoucín II nazývá 6-[(2-hydroxybenzyl)amino]-2-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurin (Obr. 7), oproti roscovitinu se na C6 uhlíku nachází 2-hydroxybenzylamino skupina. V porovnání s roscovitinem vykazuje tato látka desetkrát vyšší inhibiční aktivitu. Zároveň se zvyšujícím se inhibičním efektem souvisí i antiproliferativní aktivita vůči různým nádorovým liniím. Ve srovnání olomoucínu a olomoucínu II, je u olomoucínu II  $IC_{50}$  výrazně nižší (i více než 20x) (Kryštof *et al.*, 2002).

Bylo potvrzeno, že benzylaminoskupina na C6 je zodpovědná za specifickou inhibici vůči CDK, navíc bylo zjištěno, že přidání hydroxy skupiny na benzylamino substituent tento efekt ještě zvyšuje. Ve většině případů hydroxybenzylamino substituovaná cytokininová analoga silně zvyšují inhibiční efekt vůči CDK1 a CDK2. Dále také přidání substituce v poloze N9 přispívá k síle a specifitě inhibice (Malumbres a Barbacid, 2001; Vermeulen *et al.*, 2002).

Inhibitory CDK nemusí strukturně vycházet pouze z cytokininů. Byly objeveny i další látky inhibující CDK. Některé z těchto látek jsou již dokonce schválené pro klinické testování a používané v medicíně, patří mezi ně například palbociclib či abemaciclib. Tyto látky fungují jako specifické inhibitory CDK4/6 a jsou úspěšně používány při léčbě rakoviny prsu (Mayer, 2015).

### 2.2.5 Cytokininové ribosidy

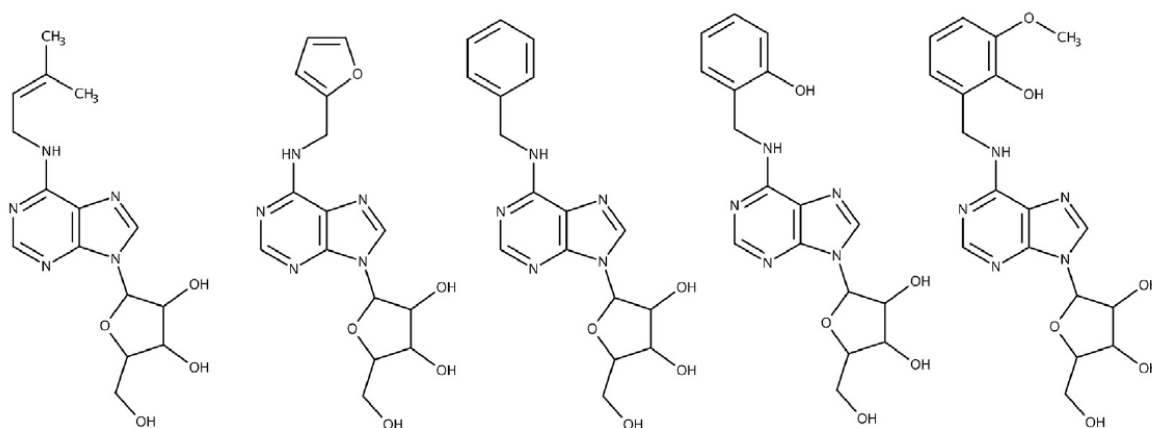
V rostlinných buňkách (kalusu) jsou cytokininy schopny indukovat jejich diferenciaci, tento efekt mají i u živočišných tkání (například nádorových). Cytokininové báze jsou tedy schopny vyvolat diferenciaci lidských buněčných linií (keratinocytů či některých leukemických buněčných linií). Bylo ale zjištěno, že cytokininy substituované v poloze N<sup>9</sup> ribosou – cytokininové ribosidy – před samotnou diferenciací navozují apoptosu, tedy programovanou buněčnou smrt. Indukce diferenciace je u cytokininových ribosidů výrazně slabší v porovnání s volnými bázemi. Některé ribosidy jsou pro určité buněčné linie silně cytotoxické, zatímco báze vyvolávají jejich diferenciaci (Ishii *et al.*, 2002).

Buněčnou smrt je možné rozdělit na apoptosu a nekrosu. Zatímco k nekrose dochází vlivem extrémních podmínek (např.: přehřátí, nadměrné množství cytotoxických látek), apoptosa často nastává během diferenciace a vývoje buněk, při vývoji imunitního systému či při poranění buněk, je tedy způsobována fyziologickými podmínkami (Mlejnek



a Kuglík, 2000). K apoptose dochází vlivem aktivace kaspas, což jsou savčí cysteinové proteasy. Kaspasy se dělí do tří skupin: první skupina – kaspasy 1, 4, 5, druhá skupina – kaspasy 2, 3, 7 a třetí skupina – kaspasy 6, 8, 9, 10. Apoptosy se obvykle účastní kaspasy z druhé a třetí skupiny (Mlejnek, 2001).

Základní strukturu olomoucínu, roskovitinu i olomoucínu II tvoří 6-benzylaminopurin (BAP), jak již bylo zmíněno BAP je jedním z nejefektivnějších a nejdostupnějších cytokininů používaných v rostlinných biotechnologiích. Ribosid BAP – BAPR je schopen v buňkách HL-60 (buňky akutní promyelocytické leukemie) vyvolat apoptosu. Bylo zjištěno, že při koncentraci 50  $\mu\text{M}$  BAPR stačí pouze 1,5 – 2 hodiny inkubace buněk pro plný rozvoj apoptosy. Dochází při tom k depleci ATP, formování apoptických tělísek a štěpení DNA. Tento proces je nevratný. Avšak kratší inkubační doba inkubace buněk v přítomnosti BAPR by mohla mít terapeutické využití při léčbě leukemie (Mlejnek a Kuglík, 2000). V apoptose vlivem BAPR hrají důležitou roli zejména kaspasy 3 a 9. K indukci apoptosy může docházet dvěma různými cestami, první je pomocí receptorů, druhá cesta zahrnuje mitochondrie. V případě cytokininových derivátů je využívána mitochondriální cesta indukce apoptosy způsobená snížením membránového potenciálu mitochondrií (Mlejnek, 2001).



Obr. 8 Struktury látek iPR, KR, BAPR, oTR a 2OH3MeOBAPR (převzato z Voller *et al.*, 2017)

Byly připraveny další deriváty BAPR a bylo provedeno testování biologické aktivity. Mimo jiné byla zkoumána i jejich cytotoxicita, během níž bylo zjištěno, že nejvíce toxicky na buňky lidské leukemie a MCF7 působí *ortho*-hydroxylace a fluorinace benzyladenosinu, fluoro-deriváty jsou však poměrně toxické i pro normální myší fibroblasty (Doležal *et al.*, 2007). Cytokininové báze a glukosidy vykazují pouze nízkou cytotoxickou aktivitu, naopak je podporována hypotéza, že substituce ribosovým zbytkem v N9 poloze purinového kruhu je nezbytná pro protinádorové účinky cytokininových derivátů. Důležitou podmínkou pro cytotoxicitu ribosidů je ovšem jejich fosforylace, u nefosforylovaných ribosidů nedochází k indukci apoptosy. (Mlejnek a Doležal, 2005; Voller *et al.*, 2010).

Díky své schopnosti indukovat apoptosu v různých nádorových liniích jsou cytokininy potenciálními kandidáty na léčiva při léčbě různých rakovinných onemocnění. Byla potvrzena protinádorová aktivita iPR, KR i BAPR (Obr. 8), z nichž jako nejaktivnější vůči různým nádorovým liniím (CEM, HL-60, HeLa, HOS, MCF7, K-562) se prokázal být oTR –  $IC_{50} = 0,5 - 11,6 \mu\text{M}$  (Voller *et al.*, 2010).

*Ortho*-topolin ribosid vykazuje silné cytotoxické účinky. Stejně jako BAPR a další způsobuje snížení membránového potenciálu mitochondrií, dále pak uvolnění cytochromu c do cytosolu a taktéž aktivuje kaspasy 3 a 9. Jedná se tedy o mitochondriální cestu navození apoptosy (Wang *et al.*, 2012).

Byla však objevena látka ze skupiny cytokininových ribosidů, jež způsobuje apoptosu na odlišném principu než všechny dosud zmíněné látky. Methoxyderivát látky oTR s názvem N<sup>6</sup>-(2-hydroxy-3-methoxybenzyl)adenosin (zkráceně 2OH3MeOBAPR) (Obr. 8) indukuje buněčnou smrt bez způsobování ATP deplece. V testování na 59 druzích různých lidských nádorových liniích je medián koncentrací pro 50% inhibici buněčného dělení ( $GI_{50}$ ) menší než  $0,2 \mu\text{M}$ . Přesný molekulární mechanismus cytotoxické aktivity 2OH3MeOBAPR je stále blíže zkoumán. Ukazuje se, že i malá změna ve struktuře látek na bázi cytokininů může způsobovat velké změny v jejím chování, proto se stále zkoumají další deriváty cytokininových ribosidů (Voller *et al.*, 2017).

### 2.3 Protinádorová aktivita dalších rostlinných hormonů

Protinádorové vlastnosti jsou u látek izolovaných z rostlin poměrně časté. Z ostatních rostlinných hormonů již byly popsány u strigolaktonů, brassinosteroidů, jasmonátů, kyseliny salicylové, gibberelinů i indolů.

**Strigolaktony** jsou silnými inhibitory regenerace a životaschopnosti buněk rakoviny prsu. V současné době je známo více syntetických analog strigolaktonů než těch přirozeně se vyskytujících, a i tyto syntetické látky vykazují silnou schopnost indukce apoptosy a inhibice nádorového buněčného dělení (Pollock *et al.*, 2012).

Bylo dokázáno, že **brassinosteroidy** jsou schopné inhibovat růst několika nádorových buněčných linií, a naopak výrazně neovlivňovat růst nenádorových buněčných linií. Tyto látky zadržují buňky rakoviny prsu v G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu a dále způsobují jejich apoptosu (Malíková *et al.*, 2008).

**Kyselina jasmonová** indukuje buněčnou smrt v buňkách lymfoblastické leukemie a potlačuje dělení buněk i v dalších nádorových buněčných liniích. **Methyl jasmonát** indukuje buněčnou smrt jak v buňkách lymfoblastické leukemie, tak i u rakoviny prostaty, prsu i u melanomu. U posledních tří zmíněných kyselina jasmonová pouze potlačuje jejich růst. Methyl jasmonát je tedy více efektivní v indukci apoptosy v lidských nádorových liniích než jeho nemethylovaná forma. Obě látky mají silný efekt vůči buňkám lymfoblastické leukemie, avšak neovlivňují normální lidské lymfocyty (Fingrut a Flescher, 2002).

**Salicylát sodný** je schopen potlačit dělení buněk nebo dokonce navodit apoptosu u několika lidských nádorových linií. Po ošetření buněk lymfoblastické leukemie, rakoviny prostaty a prsu a melanomu salicylátem sodným došlo k potlačení jejich dělení (Fingrut a Flescher, 2002).

Derivát **gibberelinů** – methylester kyseliny gibberelinové vykazuje *in vitro* a *in vivo* protinádorovou aktivitu. Mezi 12 různými nádorovými liniemi dosahuje IC<sub>50</sub> hodnot mezi 0,13 a 30,28 μg/ml (Zhang *et al.*, 2012).

Základní strukturou **auxinů** je indol. Určité deriváty indolů prokazují vynikající protinádorovou aktivitu například proti HeLa buňkám rakoviny děložního čípku. Hodnoty IC<sub>50</sub> zhruba odpovídají výsledkům *cis*-platiny (Prakash *et al.*, 2018).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

2-(1-aminoethyl)fenol– Fluorochem Ltd. (čistota min. 95 %)

2-(aminomethyl)-4-fluorfenol– Sigma Aldrich s.r.o. (čistota min. 99 %)

2-(aminomethyl)-4-chlorfenol – Sigma Aldrich s.r.o. (čistota min. 96 %)

2-(aminomethyl)-5-bromfenol – Fluorochem Ltd. (čistota min. 95 %)

6-chlorpurin ribosid – OIChemIm s.r.o. (čistota min. 95 %)

aceton p. a. – Lach-ner, s.r.o.

NH<sub>4</sub>OH (vod. roztok 20-25%)– Lach-ner, s.r.o.

benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát (BOP) – Sigma Aldrich s.r.o. (čistota min. 97 %)

diethylether p. a. – VWR s.r.o.

DIPEA – Sigma Aldrich s.r.o. (čistota min. 99 %)

DMF p. a. – Lach-ner, s.r.o.

ethanol p. a. – VWR s.r.o.

chloroform p. a. – PENTA s.r.o.

inosin – Fluka<sup>TM</sup>. (čistota min. 99 %)

methanol p. a. – PENTA s.r.o.

*n*-buthanol p. a. – Lach-ner, s.r.o.

trimethylamin – Sigma Aldrich s.r.o. (čistota min. 99 %)

Všechny ostatní použité chemikálie byly minimálně v čistotě p. a.

#### 3.1.2 Přístroje

Bod tání – Büchi Melting Point B-540

Elementární analýza – EA 1112 CHN analyzátor (Thermo Finnigan)

HPLC – HPLC Beckman Gold System

MS – Tandem Mass Spectrometer Q-ToF Micro<sup>TM</sup> (Waters)

LC-HRMS systém Synapt G2-Si

NMR – JEOL 500 ECA v DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS použit jako interní standard

TLC – silikagel destičky 60 WF<sub>254</sub> (Merck)

Analytické váhy, vakuová rotační odparka Heidolph

### 3.1.3 Buněčné linie

Nádorové buněčné linie K-562 (buňky lidské chronické myeloidní leukemie) a MCF7 (lidský karcinom prsu) pochází z ATCC, Rockvill, Maryland, USA.

Nenádorové buněčné linie ARPE-19 (buňky lidské sítnice), HaCaT (lidské keratinocyty) a BJ (lidské fibroblasty) pocházejí z American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Syntéza látek

#### 3.2.1.1 Příprava látky (2R,3R,4S,5R)-2-{6-[(4-bromo-2-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (**1**)

6-Chlorpurin ribosid (457 mg, 1,6 mmol), byl v Erlenmayerově baňce zahříván na 90 °C společně s 2-(aminomethyl)-5-bromfenolem (404 mg, 2 mmol) v *n*-buthanolu (7,5 ml), za přítomnosti triethylaminu (TEA) (348 µl, 2,5 mmol). Reakční směs byla za stálého míchání refluxována po dobu 4 hodin pod atmosférou argonu. Reakce probíhala dle schématu 1. Po uplynutí reakční doby bylo provedeno kontrolní TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 8:2:0,1). Reakční směs byla následně částečně odpařena na vakuové rotační odparce (VRO). Po ochlazení byl vysrážený produkt zfiltrován na fritě a promyt ledovou vodou a diethyletherem. Produkt byl následně vysušen a rekrystalizován v methanolu, kde se zahřátím a následným ochlazením směsi, začaly srážet drobné krystalky. Pro zvýšení čistoty produktu byla rekrystalizace opakována.

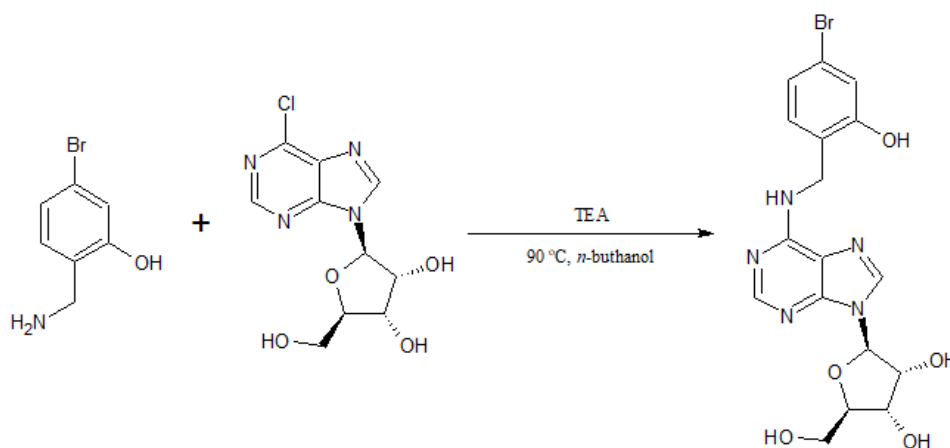


Schéma 1: Reakční schéma přípravy látky **1**

### 3.2.1.2 Příprava látky (2R,3S,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-[[1-(2-hydroxyphenyl)ethyl]amino]-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diol (2)

Inosin (500 mg, 1,9 mmol) a BOP (975 mg, 2,2 mmol) byly vloženy do baňky společně s DMF (10 ml), DIPEA (484  $\mu$ l, 2,78 mmol) a 2-(1-aminoethyl)fenolem (306 mg, 2,2 mmol). Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 55 °C po dobu 24 hodin. Reakce probíhala dle schématu 2. Následně bylo provedeno kontrolní TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1). Produkt byl dvakrát přečištěn pomocí gradientové preparativní chromatografie s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>:MeOH s gradientem od 99:1 po 9:1. Frakce obsahující produkt byly zkontrolovány pomocí TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 8:2:0,1), spojeny a odpařeny na VRO za vzniku krystalického produktu.

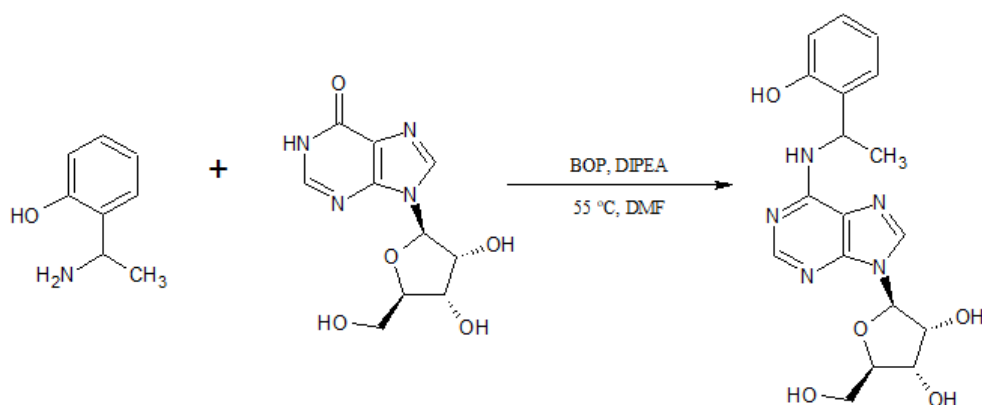


Schéma 2: Reakční schéma přípravy látky 2

### 3.2.1.3 Příprava látky (2R,3R,4S,5R)-2-{6-[(5-chloro-2-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (3)

V Erlenmeyerově baňce byl na 90 °C zahříván 6-chlorpurin ribosid (290 mg, 1 mmol) společně s 2-(aminomethyl)-4-chlorfenolem (200 mg, 1,3 mmol) v 5 ml *n*-butanolu za přítomnosti TEA (220  $\mu$ l, 1,6 mmol). Reakční směs byla v atmosféře argonu refluxována po dobu 4 hodin. Reakce probíhala dle schématu 3. Po kontrolním TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH: NH<sub>4</sub>OH 8:2:0,1) byla polovina směsi odpařena na VRO a zbylá část byla následně přenesena do lednice. Vysrážený produkt byl zfiltrován na fritě, promyt ledovou vodou a diethyletherem. Po usušení surového produktu byla pro zvýšení jeho čistoty provedena rekrystalizace v ethanolu.

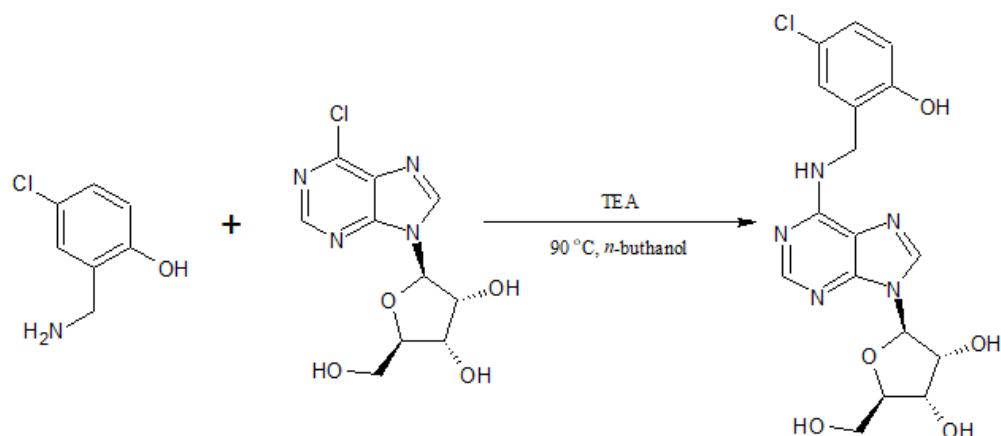


Schéma 3: Reakční schéma přípravy látky 3

### 3.2.1.4 Příprava látky (2R,3R,4S,5R)-2-{6-[(5-fluoro-2-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (4)

Byl smíchán 6-chlorpurin ribosid (324 mg, 1,1 mmol) a 2-(aminomethyl)-4-fluorfenol (200 mg, 1,4 mmol) společně s a TEA (247  $\mu$ l, 1,8 mmol) v *n*-butanolu (5,3 ml). Reakční směs byla míchána a zahřívána po dobu 4 hodin na 90 °C pod refluxem v atmosféře argonu. Reakce probíhala dle schématu 4. Následně bylo provedeno kontrolní TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH: NH<sub>4</sub>OH 8:2:0,1). Směs byla zahuštěna na VRO a ponechána přes noc v lednici krystalizovat. Vzniklé krystaly byly zfiltrány na fritě a promyty ledovou vodou a diethyletherem. Pro zvýšení čistoty byl získaný produkt rekrystalizován v ethanolu.

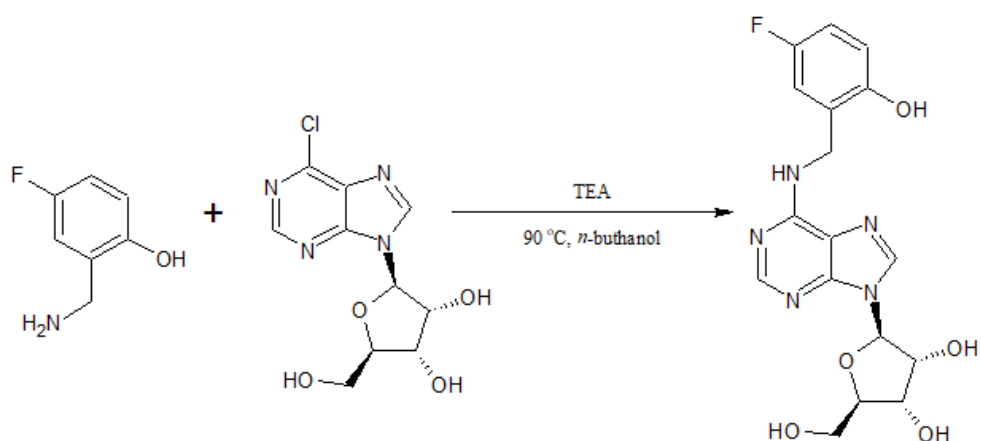


Schéma 4: Reakční schéma přípravy látky 4

### 3.2.2 Analytické metody

Čistota získaných produktů byla nejprve potvrzena pomocí tenkovrstevné chromatografie na plátcích silikagelu 60 WF<sub>254</sub> firmy Merck v mobilní fázi CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> 8:2:0,1. Chromatogram byl vizualizován pod UV lampou a následně vyvolán v roztoku vanilínu.

Bod tání byl změřen pomocí bodotávku Büchi Melting Point B-540, do kterého byly zasunuty kapiláry obsahující zkoumaný vzorek.

Změření chromatografické čistoty a hmotnostního spektra látky bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vzorky byly rozpuštěny v MeOH (1 mg/ml), z toho bylo odebráno 10 µl, které byly nastříknuty na termostatovanou (25 °C) kolonu C18 Symmetry o délce 150 mm, průměru 2,1 mm a pórovitosti 5 µm značky Waters (mobilní fáze HCOONH<sub>4</sub>:MeOH s gradientním poměrem od 9:1 po 1:9). Vzorky byly analyzovány pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Alliance 2695 Separations Module připojeného k PDA2996 detektoru (Waters). Detekce probíhala při vlnové délce 210-400 nm.

Eluát z HPLC kolony byl následně kapilárou přiveden do hmotnostního spektrometru Q-TOF Micro (Waters). Průtok byl 0,3 ml/min a jako iontový zdroj byl použit elektrosprej. MS spektra byla měřena v pozitivním módu (ESI+) a vyhodnocena v programu MassLynx 4.1 Data System.

Elementární analýza (stanovení procentuálního obsahu C, H a N) byla určena spalováním látek na přístroji EA 1112 CHN analyzér (Thermo Finnigan). Zkoumaná látka byla navážena v Sn kelímku a následně byla v atmosféře kyslíku při teplotě 950 °C spálena. Plynné produkty se zachytily ve spalovacím katalyzátoru s absorpčními činidly, přebytečný kyslík se zachytil ve vrstvě mědi, zde se také oxidy dusíku zredukovaly na elementární dusík. V proudu helia dále postupovaly již jen N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, které se následně rozdělily frontální chromatografií a detekovaly se měřením tepelné vodivosti.

Pro stanovení elementárního složení vybraných připravených látek byla využita hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS). Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Acquity UPLC<sup>®</sup> H-Class system (Waters, Milford, MA, USA) spojeném s hybridním tandemovým hmotnostním spektrometrem Q-TOF Synapt G2-Si vybaveném ionizací typu electrosprej (ESI) (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Data byla zpracována pomocí programu MassLynx v4.1. Připravené látky (1 mg) byly rozpuštěny v 1 ml 100% methanolu, následně zředěné (1:100) v 10% methanolu a 5 µl výsledného roztoku bylo nastříknuto na kolonu s reverzní fází (Acquity



UPLC<sup>®</sup> BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1  $\times$  50 mm; Waters, Milford, MA, USA) při 40°C. V lineárním gradientu (0 min, 10% B; 0-10 min, 90% B) byly při průtoku 0,5 ml/min použity jako mobilní fáze 15mM mravenčan amonný (pH 4,0; A) a methanol (B). Smíchané mobilní fáze byly zavedeny do detektoru diodového pole (rozsah 210-400 nm s rozlišením 1,2 nm) a následně do iontového zdroje (teplota zdroje 150 °C, desolvatační teplota 550 °C, kapilární napětí 1 kV, napětí na vstupním kuželu 25 V). Dusík byl použit jako desolvatační plyn (1000 l/h) i plyn na vstupním kuželu (50 l/h) a argon byl využit jako kolizní plyn (při optimalizovaném tlaku 5  $\times$  10<sup>-3</sup> mbar). Analýzy byly prováděny v pozitivním modu (ESI<sup>+</sup>) a sběr dat proběhl v módu plného skenu v rozsahu 40-1200 Da (při skenovacím čase 0,5 s a kolizní energii 4 eV). Pro měření přesné hmoty byla provedena externí kalibrace s využitím lock spray technologie a referenční směsi leucin/enkefalin (50 pg/ $\mu\text{l}$ ) ve směsi acetonitril:voda (1:1) obsahující 0,1% kys. mravenčí. Pro protonizované ionty [M+H]<sup>+</sup> byla vypočtena přesná hmota a ta byla následně využita pro stanovení elementárního složení analyzovaných sloučenin s přesností vyšší než 1,5 ppm.

<sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL 500 ECA při frekvenci 500 MHz. Vzorokly byly přichystány rozpuštěním připravených sloučenin v deuterovaném DMSO (DMSO-*d*<sub>6</sub>), jako interní standard byl použit tetramethylsilan (TMS).

### 3.2.3 Cytotoxicita látek na buněčné linie

Cytotoxicita látek byla zkoumána na nenádorových a nádorových buněčných liniích. Jako nenádorové buněčné linie byly použity primární lidské fibroblasty (BJ) a imortalizované lidské keratinocyty (HaCaT) a buňky z lidské sítnice (ARPE-19). Cytotoxicita na nádorových liniích byla zjišťována na buněčných liniích lidské myeloidní leukemie (K-562) a lidského karcinomu prsu (MCF7). Cílem tohoto testu je redukce barviva resazurin na fluorescenční barvivo resorufin způsobená metabolickou aktivitou buněk.

Buňky byly uchovávány v kultivačních lahvích s DMEM médiem při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> a 100% vlhkosti. Pro další práci s buňkami bylo potřeba nejprve buňky uvolnit. Médium bylo odsáto a byl přidán trypsin (0,5 g prasečího proteinu na 1 l) a EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), během působení trypsinu byly buňky přeneseny do inkubátoru. Pomocí světelného mikroskopu bylo kontrolováno uvolňování buněk. Uvolněné buňky byly poté přeneseny do zkumavky a zcentrifugovány (5 min, 1000 g). Médium s trypsinem bylo odsáto a bylo přidáno čerstvé kultivační médium, ve kterém

byly buňky rozsuspendovány. V Bürkerově komůrce byla spočítána koncentrace buněk a dle výsledku byla buněčná suspenze příslušně naředěna.

Následně byly dané buněčné linie vysazeny do 96 jamkové mikrotitrační destičky v objemu 80  $\mu\text{l}$  (3 000 buněk). Druhý den byly přidány testované látky (20  $\mu\text{l}$ ) o různé výsledné koncentraci, přičemž maximální koncentrace byla 50  $\mu\text{mol/l}$ . Všechny látky byly testovány v triplicátu. Buňky byly inkubovány dalších 72 hodin. Po skončení inkubační doby byl přidán roztok resazurinu (4 mg v 16 ml 10% DMEM), tento roztok byl zfiltrován na 0,22  $\mu\text{l}$  filtru a 10  $\mu\text{l}$  bylo přidáno do jamek. Dále byly destičky s buňkami inkubovány po dobu 3 hodin a poté byla změřena fluorescence při excitační vlnové délce 544 nm a emisní vlnové délce 590 nm.

### 3.2.4 Cytokininové testy

Cytokininová aktivita byla testována pomocí cytokininových biotestů (kalusového, senescenčního a *Amaranthového*) a navíc byl přidán i receptorový test. Relativní aktivita zkoumaných látek byla vždy vztahována k BAP, jehož aktivita je počítána jako 100 %.

Biotesty byly provedeny dle postupu popsaného Holubem *et al.* (1998). Ve všech biotestech byly zkoumané látky nejprve rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), následně byl roztok zředěn destilovanou vodou na výslednou koncentraci  $10^{-3}$  mol/l tak aby finální koncentrace DMSO v testovaném roztoku nepřesáhla 0,5 procent. Pro jednotlivé biotesty byly připraveny koncentrace roztoků od  $10^{-8}$  mol/l až po  $10^{-4}$  mol/l. Pro každou koncentraci bylo provedeno pět opakování a celý biotest byl vždy opakován dvakrát.

#### 3.2.4.1 Kalusový biotest

Pro kalusový biotest byl použit kalus *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38. Kalus byl pěstován při 25 °C ve tmě na modifikovaném MS médiu (v 1 litru: 4  $\mu\text{mol}$  kyseliny nikotinové, 2,4  $\mu\text{mol}$  pyridoxin hydrochloridu, 1,2  $\mu\text{mol}$  thiaminu, 26,6  $\mu\text{mol}$  glycinu, 1,37  $\mu\text{mol}$  glutaminu, 1,8  $\mu\text{mol}$  myo-inositolu, 30 g sacharosy, 8 g agaru, 5,37  $\mu\text{mol}$  kyseliny naftyloctové (NAA) a 0,5  $\mu\text{mol}$  BAP). Každé tři týdny byl kalus pasážován.

Dva týdny před samotným biotestem byl kalus přenesen na médium neobsahující BAP. Biologická aktivita byla měřena jako přírůstek čisté hmotnosti kalusu po čtyřech týdnech kultivace v přítomnosti zkoumané látky.

### 3.2.4.2 Senescenční biotest

Semena pšenice *Triticum aestivum* L. cv. Aranka byla promyta pod tekoucí vodou po dobu 24 hodin. Následně byla vyseta na vermikulit nasáknutý Knopovým roztokem a pěstována při 25 °C s fotoperiodou 16/8. Po sedmi dnech, kdy první list byl již plně vyvinut a druhý začínal růst, byly u pěti semenáčků ustřiženy špičky prvních listů (cca 35 mm) a byly přeneseny do mikrotitrační destičky, v níž každá jamka obsahovala 150 µl roztoku zkoumané látky. Inkubace probíhala 96 hodin ve tmě při 25 °C. Následně byly listy vytaženy a chlorofyl z nich byl extrahován zahříváním na 80 °C po dobu 10 min v 5 ml 80% EtOH (v/v). Před samotným měřením byl objem zkoumaných vzorků doplněn 80% EtOH na 5 ml. Absorbance byla změřena při 665 nm.

### 3.2.4.3 Amaranthový biotest

Semena *Amaranthus caudatus* var. *atropurpurea* byla povrchově sterilizována po dobu 10 min v 10% N-chlorbenzensulfonamidu (w/v) a následně byla pětkrát promyta v deionizované vodě. Vysterilizovaná semena byla umístěna na Petriho misky s buničinou nasáklou vodou. Kultivace probíhala 72 hodin ve tmě při teplotě 25 °C. Po uplynutí kultivační doby byly odstraněny kořínky semenáčků a explantáty byly umístěny do Petriho misky obsahující dvě vrstvy filtračního papíru nasáklého 1 ml inkubačního média obsahujícího 10 µmol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8, 5 µmol tyrosinu a testovanou látku. Procedura probíhala pod zeleným světlem v temné komoře. Následovala 48hod kultivace při 25 °C ve tmě. Poté byl ze vzorků extrahován betacyanin (zmrazením explantátů ve 4 ml 3,33 µmol/l kyseliny octové). Koncentrace betacyaninu byla určena jako rozdíl absorbancí při 537 nm a 620 nm ( $\Delta A = A_{537\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$ ).

### 3.2.4.4 Receptorový test

Pro testování aktivace receptoru AHK3 a AHK4 byl použit bakteriální systém *E. coli* s měřením  $\beta$ -galaktosidasové aktivity, který byl popsán Spíchalem *et al.* (2004). Buňky bakterie *E. coli* kmene KMI001 obsahující plasmid pIN-III-AHK4 nebo pSTV28-AHK3 byly kultivovány přes noc při 25 °C na M9 médiu obohaceném 0,1% kasaminovou kyselinou až do doby než optická hustota média (OD<sub>600</sub>) odpovídala hodnotě 1. Následně byla prekultura naředěna v poměru 1:50 ve 400 µl M9 média s 0,1% kasaminovou kyselinou a 4 µl roztoku testované látky. Kultura byla následně kultivována při 25 °C, na konci inkubační doby bylo 200 µl kultury zcentrifugováno a 100 µl supernatantu bylo

přeneseno do testovací zkumavky obsahující 2  $\mu$ l 50 mmol/l 4-methylumbelliferyl galaktosidu a bylo inkubováno 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 100  $\mu$ l 0,2 mol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Následně byla změřena fluorescence při excitační vlnové délce 365 nm a emisní 460 nm. Byla určena OD<sub>600</sub> zbývající kultury a  $\beta$ -galaktosidasová aktivita byla spočítána jako nmol 4-methylumbelliferonu  $\times$  OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>. Vypočtená  $\beta$ -galaktosidasová aktivita odpovídá cytokininové aktivitě.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Analýza připravených látek

#### 4.1.1 Látka 1

Výtěžek (teoretický/reálný): 721 mg/202 mg (28,1 %)

HPLC čistota: 99,7 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{18}BrN_5O_5$

$M_r$ : 452,3

MS (ESI<sup>+</sup>, m/z): 453

Bod tání: 177,3 °C – 180,1 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.44 – 3.66 (m, 4H); 3.92 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H); 4.10 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H); 4.50 – 4.59 (m, 2H); 5.19 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.36 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.44 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H); 5.85 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H); 6.86 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H); 6.92 – 7.0 (m, 2H); 8.16 (s, 1H); 8.29 (bs, 1H); 8.36 (s, 1H)

#### 4.1.2 Látka 2

Výtěžek (teoretický/reálný): 722 mg/38 mg (5,2 %)

HPLC čistota: 95,5 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{18}H_{21}N_5O_5$

$M_r$ : 387,4

MS (ESI<sup>+</sup>, m/z): 388

Bod tání: 110,4 °C – 113,2 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.46 – 3.65 (m, 6H); 3.91 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H); 4.10 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H); 4.55 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H); 5.17 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.37 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.43 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H); 5.62 (bs, 1H); 5.81 – 5.87 (m, 1H); 6.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H); 6.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H); 6.97 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H); 7.23 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H); 8.08 (bs, 1H); 8.12 (s, 1H); 8.35 (s, 1H)

#### 4.1.3 Látka 3

Výtěžek (teoretický/reálný): 413 mg/107 mg (25,9 %)

HPLC čistota: 99,1 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{18}ClN_5O_5$

$M_r$ : 407,8

MS (ESI<sup>+</sup>, m/z): 409

Bod tání: 191,5 °C – 192,9 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.47 – 3.67 (m, 3H); 3.93 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H); 4.11 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H); 4.53 – 4.61 (m, 3H); 5.18 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.36 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H); 5.45 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H); 5.86 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H); 6.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H); 6.99 – 7.08 (m, 2H); 8.18 (s, 1H); 8.33 (bs, 1H); 8.38 (s, 1H)

#### 4.1.4 Látka 4

Výtěžek (teoretický/reálný): 442 mg/103 mg (23,3 %)

HPLC čistota: 100 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>

M<sub>r</sub>: 391,4

MS (ESI<sup>+</sup>, m/z): 392

Bod tání: 172,2 °C – 175,2 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.46 – 3.67 (m, 3H); 3.93 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H); 4.11 (q, *J* = 3.0 Hz, 1H); 4.51 – 4.62 (m, 3H); 5.19 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.36 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H); 5.45 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H); 5.86 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H); 6.73 – 6.87 (m, 3H); 8.18 (s, 1H); 8.32 (bs, 1H); 8.37 (s, 1H)

Tab. 3 Elementární složení syntetizovaných látek **2** a **4** zjištěné HRMS

Látka	Přesná hmota	Teoretická monoisotopická hmota	mDa	Přesnost stanovení (ppm)	Elementární složení [M+H] <sup>+</sup>
<b>2</b>	388,1627	388,1621	0,6	1,5	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
<b>4</b>	392,1375	392,1370	0,5	1,3	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> F

Tab. 4 Elementární analýza (C, H, N) látek **1** a **3**

Látka	% C (teoretická/zjištěná)	% H (teoretická/zjištěná)	% N (teoretická/zjištěná)
<b>1</b>	45,2 % /44,4 %	4,0 %/4,0 %	15,5%/15,2%
<b>3</b>	50,0 % /49,4 %	4,5 %/4,5 %	17,1 %/16,8

## 4.2 Cytotoxicita látek – IC<sub>50</sub>

Tab. 5 Cytotoxicita připravených látek

Látka	Buněčná linie/IC <sub>50</sub> (μmol/L)				
	ARPE-19	HaCaT	BJ	K-562	MCF7
<b>1</b>	>100	12,2	0,2	5,0	25,8
<b>2</b>	>100	>50	7,3	>100	19,6
<b>3</b>	>100	6,1	0,32	4,8	34,7
<b>4</b>	>100	18,6	0,52	7,5	34,0

## 4.3 Cytokininové biotesty

Tab. 6 Cytokininová aktivita připravených látek

Látka	<i>Amaranthový</i> biotest		Senescenční biotest		Kalusový biotest	
	Optimální koncentrace (mol/L)	Relativní aktivita (%)	Optimální koncentrace (mol/L)	Relativní aktivita (%)	Optimální koncentrace (mol/L)	Relativní aktivita (%)
<b>1</b>	10 <sup>-8</sup>	13 (±3)	10 <sup>-6</sup>	70 (±5)	10 <sup>-8</sup>	30 (±1)
<b>3</b>	10 <sup>-4</sup>	46 (±9)	10 <sup>-4</sup>	93 (±7)	10 <sup>-4</sup>	63 (±3)
<b>4</b>	10 <sup>-4</sup>	75 (±8)	10 <sup>-4</sup>	99 (±5)	10 <sup>-6</sup>	23 (±3)

## 5 DISKUZE

Látky 1, 3 a 4 byly připraveny reakcí 6-chlorpurin ribosidu a příslušného aminu v přítomnosti triethylaminu a v n-buthanolu, jež byly následně zahřívány na 90 °C (4 hod) v přítomnosti argonu, tento základní postup přípravy cytokininových ribosidů byl popsán Tarkowskou *et al.* (2003). Látku 2 se touto metodou nepodařilo vůbec připravit, byla tedy syntetizována novějším způsobem popsaným Wanem *et al.* (2005). V tomto případě reagoval inosin s BOP, DIPEA a příslušným aminem v DMF a reakční směs byla zahřívána na 55 °C (24 hod). Výtěžek látky **1** byl 28 %, u látky **2** to bylo 5 %, u látky **3** byl výtěžek 26 % a u látky **4** byl 23 %. Naopak Wan *et al.* (2005) dokázal syntetizovat BAPR o výtěžku vyšším než 99 %. Je možné, že dalšími případnými optimalizacemi reakčních podmínek pro jednotlivé látky na základě navázaných substituentů by se dalo procentuální výtěžky látek zvýšit, avšak to nebylo primárním cílem této bakalářské práce.

V testech cytotoxicity na buněčné linie (Tab. 5) bylo zjištěno, že všechny zkoumané látky jsou netoxické pro ARPE-19, avšak jsou dosti toxické pro primární lidské fibroblasty (BJ). Pro HaCaT buňky je nejméně toxická látka **2** a nejvíce toxická látka **3**. Z nádorových linií jsou látky **1**, **3** a **4** více toxické pro K-562 než pro MCF7, látka **2** není pro K-562 toxická vůbec, pro MCF7 ale ano. Z testovaných buněčných linií jsou všechny látky bohužel nejvíce toxické pro BJ buňky. Doležal *et al.* (2007) uvádí, že *ortho*-hydroxylované a fluorované deriváty bezyladenosinu jsou pro buňky toxické. Tato teorie se potvrdila i v mé bakalářské práci, látka **4** obsahuje jak OH skupinu navázanou na benzenovém jádře, tak atom F, látky **1** a **3** obsahují sice jiný atom halogenu (Br, Cl) avšak jsou taktéž toxické. Látka **2** obsahuje navázaný methylový můstek, který by mohl být zodpovědný za její poněkud odlišnou míru cytotoxicity pro jednotlivé buněčné linie. Ve srovnání látek s oTR (Voller *et al.*, 2010) je oTR více toxický jak pro MCF7, tak pro K-562, pro BJ buňky je stejně jako připravené látky taktéž cytotoxický. Zatím byla tedy potvrzena teorie vycházející z prací Doležala *et al.* (2007) a Vollera *et al.* (2010), že cytokininové ribosidy jsou toxické i pro lidské nenádorové buňky, avšak cílem dalšího snažení by mohlo být testování připravených látek na dalších nádorových liniích, případně příprava dalších derivátů toxických pouze pro nádorové buněčné linie.

V cytokininových biotestech (Tab. 6) nedosahuje žádná z látek aktivity BAP. Cytokininové ribosidy obvykle dosahují nejlepších výsledků v senescenčním biotestu (Holub *et al.*, 1998; Doležal *et al.*, 2007), což se u zkoumaných látek také potvrdilo, avšak žádná z látek nepřekročila relativní aktivitu 100 %. Nejvyšších aktivit je dosahováno



v senescenčním biotestu, kde se látky **3** a **4** dosahují 93 % a 99 % relativní aktivity, látka **1** dosahuje o něco nižší aktivity, a to 70 %. Z důvodu nedostatku látky **2** nebyla tato látka v cytokininových biotestech vůbec testována.

Aromatické cytokininové ribosidy (deriváty BAPR) zpravidla nejsou schopny aktivovat cytokininové receptory AHK3 a AHK4, v určitých případech může docházet k mírné aktivaci AHK3 (Spíchal *et al.*, 2004; Doležal *et al.*, 2007). Neschopnost aktivace cytokininových receptorů aromatickými cytokininovými ribosidy byla prokázána a bylo naměřeno, že žádná z připravených látek nevykazuje cytokininovou aktivitu v AHK3 ani AHK4 receptorovém testu.

## 6 ZÁVĚR

Byly syntetizovány čtyři nové purinové deriváty řadící se mezi aromatické cytokininové ribosidy. Tyto látky byly analyzovány fyzikálně-chemickými metodami pro ověření jejich identity a čistoty. Následně byla změřena cytotoxicita těchto látek na vybrané nádorové a nenádorové buněčné linie. Všechny látky jsou cytotoxické pro nádorové linie MCF7, pro buňky K-562 jsou toxické všechny látky vyjma látky **2**. Všechny testované látky jsou naneštěstí vysoce toxické i pro primární lidské fibroblasty.

Cílem dalšího snažení by mohlo být testování připravených látek na dalších nádorových liniích, případně příprava dalších derivátů toxických pouze pro nádorové buněčné linie.

V cytokininových biotestech dosahují látky nejvyšších relativních aktivit v senescenčním biotestu. Ani jedna z látek není schopná aktivovat cytokininové receptory AHK3 a AHK4.

## 7 LITERATURA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5th ed., Garland Science, New York, USA, 1392 stran.
- Amanullah M. M., Sekar S., Vincent S. (2010): Plant growth substances in crop production: A review. *Asian Journal of Plant Sciences* **9**, 215-222.
- Bamberger E., Mayer A. M. (1960): Effect of Kinetin on Formation of Red Pigment in Seedlings of *Amaranthus retroflexus*. *Science, New Series* **131**, 1094–1095.
- Biddington N. L., Thomas T. H. (1973): A modified *Amaranthus* betacyanin bioassay for the rapid determination of cytokinins in plant extracts. *Planta* **111**, 183–186.
- Chashoo G., Saxena A. K. (2014): Targetting Cdks in Cancer: An Overview and New Insights. *Journal of Cancer Science & Therapy* **6**, 488-496
- Davies P. J. (2010): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. 3rd ed., Springer, Dordrecht, Netherlands, 802 stran.
- De Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlicek L., Strnad M., Kim S. H. (1997): Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. Crystal Structure of Human cdk2 Complexed with Roscovitine. *European Journal of Biochemistry* **243**, 518–526.
- Doležal K., Popa I., Hauserová E., Spíchal L., Chakrabarty K., Novák O., Kryštof V., Voller J., Holub J., Strnad, M. (2007): Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 3737–3747.
- Fingrut O., Flescher E. (2002): Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia* **16**, 608–616.

- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka, P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431–2452.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004): *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8821–8826.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *Ortho*- and *Meta*-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.
- Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y. (2002): Control of Differentiation and Apoptosis of Human Myeloid Leukemia Cells by Cytokinins and Cytokinin Nucleosides, Plant Redifferentiation-inducing Hormones. *Cell Growth & Differentiation* **13**, 19-26.
- Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002): Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**, 3283–3286.
- Lack A., Evans D. (2005): *Plant Biology*. 2nd ed., (Owen E. ed.), Taylor & Francis Group, New York, USA, 368 stran.
- Malíková J., Swaczynová J., Kolář Z., Strnad, M. (2008): Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* **69**, 418–426.
- Malumbres M., Barbacid M. (2001): To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* **1**, 222-231.

- Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630–641.
- Mayer E. L. (2015): Targeting Breast Cancer with CDK Inhibitors. *Current Oncology Reports* **17**, 19-23.
- Mlejnek P., Kuglík P. (2000): Induction of apoptosis in HL-60 cells by N<sup>6</sup>-benzyladenosine. *Journal of Cellular Biochemistry* **77**, 6–17.
- Mlejnek P. (2001): Caspase inhibition and N<sup>6</sup>-benzyladenosine-induced apoptosis in HL-60 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **83**, 678–689.
- Mlejnek P., Doležel P. (2005): Apoptosis induced by N<sup>6</sup>-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* **19**, 985–990.
- Pollock C. B., Koltai H., Kapulnik Y., Prandi C., Yarden R. I. (2012): Strigolactones: A novel class of phytohormones that inhibit the growth and survival of breast cancer cells and breast cancer stem-like enriched mammosphere cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **134**, 1041–1055.
- Prakash B., Amuthavalli A., Edison D., Sivaramkumar M. S., Velmurugan R. (2018): Novel indole derivatives as potential anticancer agents: Design, synthesis and biological screening. *Medicinal Chemistry Research* **27**, 321–331.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*. 1. vyd., Academia, Praha, Česká republika, 484 stran.
- Raviv Z., Cohen S., Reischer-Pelech D. (2013): The anti-cancer activities of jasmonates. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **71**, 275–285.

- Rialet V., Meijer L. (1991): A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Research* **11**, 1581-1590.
- Savelieva E. M., Oslovsky V. E., Karlov D. S., Kurochkin N. N., Getman I. A., Lomin S. N., Sidorov G. V., Mikhailov S. N., Osolodkin D. I., Romanov, G. A. (2018): Cytokinin activity of N<sup>6</sup>-benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors *in planta*, *in vitro*, and *in silico*. *Phytochemistry* **149**, 161–177.
- Spíchal L., Rakova 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 and Cell Physiology* **45**, 1299–1305.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001): The Arabidopsis Sensor His-kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107–113.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus × canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* **117**, 579-590.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chemické Listy* **98**, 834-841.
- Vermeulen K., Strnad M., Kryštof V., Havlíček L., Van der Aa A., Lenjou M., Nijs G., Rodrigus I., Stockman B., Van Onckelen H., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2002): Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Leukemia* **16**, 299–305.

- Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer, L. (1994): Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *European Journal of Biochemistry* **224**, 771–786.
- Voller J., Zatloukal M., Lenobel R., Doležal K., Béreš T., Kryštof V., Spíchal L., Niemann P., Džubák P., Hajdúch M., Strnad, M. (2010): Anticancer activity of natural cytokinins: A structure–activity relationship study. *Phytochemistry* **71**, 1350–1359.
- Voller J., Béreš T., Zatloukal M., Kaminski P. A., Niemann P., Doležal K., Džubák P., Hajdúch M., Strnad M. (2017): The natural cytokinin 2OH3MeOBAR induces cell death by a mechanism that is different from that of the “classical” cytokinin ribosides. *Phytochemistry* **136**, 156–164.
- Wan Z. K., Binnun E., Wilson D. P., Lee J. (2005): A Highly Facile and Efficient One-Step Synthesis of N<sup>6</sup>-Adenosine and N<sup>6</sup>-2′-Deoxyadenosine Derivatives. *Organic Letters* **7**, 5877-5880.
- Wang L., Sun Ch., Wang Z. H., Guo G. Q. (2012): Mechanism of apoptosis induced by ortho-topolin riboside in human hepatoma cell line SMMC-7721. *Food and Chemical Toxicology* **50**, 1962–1968.
- Wani S. H., Kumar V., Shriram V., Sah S. K. (2016): Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* **4**, 162–176.
- Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. (2010): The Strigolactone Story. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 93–117.

Zhang Y., Zhang H., Chen J., Zhao H., Zeng X., Zhang H., Qing Ch. (2012): Antitumor and antiangiogenic effects of GA-13315, a gibberellin derivative. *Investigational New Drugs* **30**, 8–16.



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 2OH3MeOBAPR – N<sup>6</sup>-(2-hydroxy-3-methoxybenzyl)adenosin  
AHK – *Arabidopsis thaliana* histidinová kinasa  
ARPE-19 – buněčná line immortalizovaných buněk lidské sítnice  
BAP – benzylaminopurin  
BAPR – benzylaminopurin ribosid  
BJ – buněčná linie primárních lidských fibroblastů  
BOP – benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát  
CDC2 – protein homologní lidské CDK1 nacházející se v *S. pombe*  
CDK – na cyklinech závislá proteinkinasa  
CEM – buněčná linie akutní lymfoblastické leukemie  
CKX – cytokinin oxidasa/dehydrogenasa  
DIPEA – *N, N*-diisopropylethylamine  
DMAPP – dimethylallyldifosfát  
DMEM – Dulbekovo modifikované Eaglovo kultivační médium  
DMF – dimethylformamid  
DMSO – dimethylsulfoxid  
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina  
GI<sub>50</sub> – koncentrace nutná pro 50% inhibici buněčného dělení  
HaCaT – buněčná linie immortalizovaných lidských keratinocytů  
HeLa – buňky rakoviny děložního čípku  
HL-60 – buňky akutní promyelocytické leukemie  
HOS – buněčná linie osteosarkomu  
IAA – indol-3-octová kyselina  
IC<sub>50</sub> – koncentrace nutná pro 50% inhibici biologické aktivity  
iP – isopentenyladenin  
iPR – isopentenyladenin ribosid  
iPRMP – isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfát  
IPT – isopentenyltransferasa  
K-562 – buněčná linie lidské chronické myeloidní leukemie  
KR – kinetin ribosid  
MCF7 – buněčná linie karcinomu prsu  
mT – *meta*-topolin

NAA – kyselina naftyloctová  
oT – *ortho*-topolin  
oTR – *ortho*-topolin ribosid  
ROS – reaktivní formy kyslíku  
TEA – triethylamin  
TMS – tetramethylsilan  
tZ – *trans*-zeatin  
tZR – *trans*-zeatin ribosid