



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Syntéza, charakterizace a biologická aktivita nových  
cukerných derivátů cytokininů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tereza Miksteinová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Václav Mik, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2018

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Tereza Miksteinová
Název práce:	Syntéza, charakterizace a biologická aktivita nových cukerných derivátů cytokininů
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	Bakalářská práce je zaměřena na syntézu a biologickou aktivitu nových cukerných derivátů cytokininů. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zabývající se cytokininy a jejich metabolismem, transportem, signální dráhou a metodami chemické glykosylace purinů. V experimentální části byly připraveny <i>N9</i> -cukerné deriváty cytokininů odvozené od <i>N<sup>6</sup></i> -benzyladeninu, meta-topolinu a <i>meta</i> -methoxytopolinu, jejichž sacharidovou jednotkou byly $\beta$ -D-glukosa, $\beta$ -D-galaktosa nebo $\beta$ -D-xylosa. Připravené látky byly charakterizovány pomocí fyzikálně-chemických metod a jejich biologická aktivita byla testována v kompetičním ligand-vazebném biotestu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z <i>Arabidopsis thaliana</i> . U všech látek byla dále na vybraných buněčných liniích (HaCat, BJ a ARPE-19) zkoumána jejich cytotoxicita.
Klíčová slova:	Cytokininy, cytokininové glykosidy, cytotoxicita, kompetiční ligand-vazebný test, <i>N</i> -glykosylace, syntéza.
Počet stran:	53
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tereza Miksteinová

Title of thesis: Synthesis, characterization and biological activity of novel sugar cytokinin derivates

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: Mgr. Václav Mik, Ph.D.

The year of presentation: 2018

Abstract: This bachelor thesis is focused on synthesis and biological activity of novel *N9* cytokinin sugar conjugates. The theoretical part summarizes knowledge about cytokinins and their metabolism, transport, signalling pathway and chemical methodology of purine glycosylation. In the experimental part *N9* cytokinin conjugates of *N*<sup>6</sup>-benzyladenine, *meta*-topolin a *meta*-methoxytopolin with sugar moiety of  $\beta$ -D-glucose,  $\beta$ -D-galactose or D-xylose were synthesized. The physico-chemical characterization of those compounds had been done and the biological activity was examined in ligand binding bioassay on *Arabidopsis thaliana* cytokinin receptors AHK3 and CRE1/AHK4. Moreover cytotoxicity of prepared compounds was screened on certain human cell lines (HaCaT, BJ and ARPE-19).

Keywords: Competitive ligand-binding assai, cytokinin, cytokinin glycosides, cytotoxicity, *N*-glycosylation, synthesis.

Number of pages: 53

Number of appendices: 0

Language: Czech

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

V Olomouci dne 14.5.2018

Tereza Miksteinová

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho vedení, cenné rady a trpělivost nejen při práci v laboratoři, ale také při sepisování této práce. Děkuji také Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za provedení testů cytotoxicity, Mgr. Zuzaně Pěkné za provedení cytokininových biologických testů a týmu „HPLC-MS“ za měření a zpracování dat. Poděkování patří také kolektivu laboratoře organické syntézy na Oddělení chemické biologie a genetiky CRH za poskytované rady během práce v laboratoři. Tato práce byla zpracována za finanční podpory grantu IGA\_PrF\_2018\_023.

## Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod a cíle práce	9
2 Cytokinininy – historie a struktura	11
3 Cukerné konjugáty cytokininů	13
3.1 Biosyntéza cytokininových cukerných konjugátů	16
3.1.1 Ribosidy	16
3.2 Vznik ostatních cukerných konjugátů cytokininů	17
3.3 Degradace cukerných konjugátů	18
4 Cytokininová signální dráha a ligandová specifita receptorů	19
5 Chemická glykosylace purinů	22
5.1 Metody glykosylace purinů	24
6 Materiály a metody	29
6.1 Chemikálie	29
6.2 Metody	29
6.3 Syntéza	30
6.3.1 Peracetylace sacharidů (1-3)	30
6.3.2 Příprava cukerných derivátů 6-chlorpurinu (4-6)	31
6.3.3 Nukleofilní substituce 6-chlorpurinu (7-15)	32
6.4 Biologické testování	32
6.4.1 Kompetiční ligand-vazebný test	32
6.4.2 Testování cytotoxicity	32
7 Výsledky a diskuse	34
7.1 Syntéza	34
7.2 Testy biologické aktivity	44
8 Závěr	47
9 Seznam použité literatury	48

## Seznam použitých zkratk

Ade	adenin
AHK	hybridní kinasové receptory z <i>A. thaliana</i>
AHP	histidin fosfotransferasové proteiny
ARR	regulátory odpovědi z <i>A. thaliana</i>
ARPE-19	lidské imortalizované buňky sítnicového epitelu (ATCC® CRL-2302™)
BAP	6-benzylaminopurin
BJ	lidské kožní fibroblasty BJ (ATCC® CRL-2522™)
bs	široký singlet
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHASE	extracelulární histidin kinasová senzová doména
CKX	cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12)
CRF	faktory cytokininové odpovědi
cZ	<i>cis</i> -zeatin
d	dublet
DCM	dichlormethan
dd	dublet dubletu
DHZ	dihydrozeatin
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	deuterovaný dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DZR	dihydrozeatinribosid
ekv.	ekvivalent
	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní
ESI <sup>+</sup> -MS	mód
EtOAc	ethyl-acetát
FAD	flavinadenindinukleotid
GCMS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HaCaT	lidské imortalizované kožní keratinocyty (RRID:CVCL_0038)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyladenin
iPR	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyladenosin
iPRMP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát

iPRDP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPRTP	isopentenyladenosin-5'-trifosfát
IPT	Adenylátisopentenytransferasa (EC 2.5.1.27)
<i>J</i>	interakční konstanta
Kin	kinetin, 6-furfurylaminopurin
LOG	Lonely guy (EC 3.2.2.n1)
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin, 6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9 <i>H</i> -purin
<i>mTR</i>	<i>meta</i> -topolinribosid
MW	mikrovlny
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NB	nukleobáze
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin, 6-[(2-hydroxybenzyl)amino]-9 <i>H</i> -purin
PBU <sub>3</sub>	tributylfosfin
PG	chránící skupina
ppm	parts per milion
s	singlet
t	triplet
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TMSOTf	trimethylsilyltriflát
tRNA IPT	tRNAisopentenytransferasa (EC 2.5.1.8)
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatinribosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
UGT	uridindifosfátglykosyltransferasa (EC 2.4.1.-)
δ	chemický posun



## 1 Úvod a cíle práce

Cytokininy jsou drobné organické molekuly, jejichž struktura je odvozena od adeninu. Tyto nízkomolekulární látky jsou na základě svých vlastností a schopností ovlivňovat řadu biologických a fyziologických procesů v rostlinách klasifikovány jako fytohormony. Zatímco aktivními formami cytokininů jsou volné báze, cukerné konjugáty hrají nezastupitelnou roli v jejich biosyntéze a mechanismu regulace hladin aktivních fytohormonů. Ke glykosylaci cytokininů dochází na hydroxyskupině postranního řetězce za vzniku *O*-glykosidů, nebo na dusíkových atomech purinového heterocyklu v pozicích *N3*, *N7* a *N9* (*N*-glykosidy). Z literatury je známo, že v případě *O*-glykosidů vytvářejí cytokininy konjugáty s glukosou a xylosou. U *N*-glykosidů byl zaznamenán výskyt konjugátů s glukosou, která může být připojena na *N7* a *N9*, vzácně i *N3* atom purinového skeletu, a ribosou výlučně navázanou v pozici *N9*. Z hlediska biologické aktivity dochází po připojení glukosy k reverzibilní/ ireverzibilní inaktivaci, avšak u ribosidů je aktivita z části zachována.

Cílem této bakalářské práce bylo:

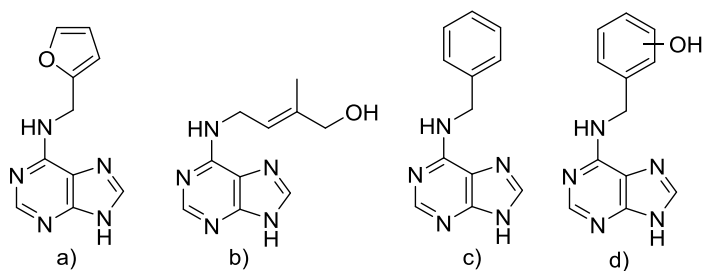
- vypracování literární rešerše na téma cytokininy, metabolismus cytokininů, glykosylace  
a metodologie přípravy cukerných derivátů purinů
- syntéza a charakterizace *N9*-cukerných konjugátů
- biologická aktivita připravených látek

# **Teoretická část**

## 2 Cytokininy – historie a struktura

Cytokininy jsou nízkomolekulární organické látky řadící se mezi rostlinné hormony, tzv. fytohormony. Cytokininy byly pojmenovány na základě schopnosti v přítomnosti auxinů stimulovat buněčné dělení (cytokinezi, řec. kytos = buňka, kinesis = dělení). V rostlinných pletivech jsou tyto látky přítomny ve velmi malých koncentracích (1-50 pmol.g<sup>-1</sup> čerstvé hmoty) a jsou zodpovědné mimo buněčného dělení také za regulaci růstu, klíčení semen, udržování funkce apikálních meristémů, oddálení senescence listů i formování chloroplastů. Svou aktivitou hrají významnou roli také v odpovědi na biotický a abiotický stres (Mok a Mok, 2001, Kurakawa a kol., 2007, Werner a Schmülling, 2009, Werner a kol., 2006).

Historie výzkumu cytokininů spadá na přelom 19. a 20. století, kdy byla ve floémových šťávách různých druhů rostlin objevena existence sloučenin, které stimulovaly buněčné dělení parenchymatických buněk brambor (*Solanum tuberosum*) (Haberlandt, 1913). První izolovanou látkou s cytokininovou aktivitou, získanou z autoklávovaného DNA sledího spermatu, byl kinetin (Kin) (Obr. 1a). Na základě jeho reaktivity a chemických vlastností byla jeho struktura navržena na 6-furfurylaminopurin (Miller a kol., 1955b). Její správnost byla potvrzena následnou syntézou a porovnáním chemických vlastností a biologické aktivity (Miller a kol., 1955a). Přirozený výskyt kinetinu v rostlinném materiálu, konkrétně v endospermu kokosu, byl potvrzen až později (Ge a kol., 2005, Barciszewski a kol., 1996).



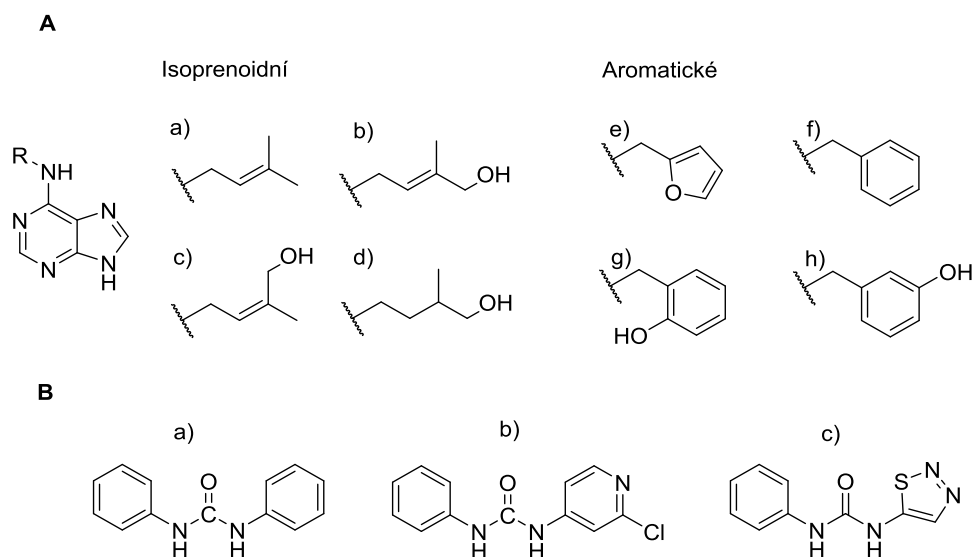
**Obr. 1: Struktura identifikovaných cytokininů.** a) kinetin, b) *trans*-zeatin, c) 6-benzylaminopurin, d) topolin.

Prvním přirozeně se vyskytujícím cytokininem byl zeatin (Obr. 1b), pojmenovaný na základě místa jeho primární detekce, kterým byl nezralý endosperm kukuřice *Zea mays* (Letham, 1963). O rok později byla stanovena jeho struktura (*trans*-zeatin, (*E*)-6-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)amino]-9*H*-purin), která byla potvrzena následnou syntézou a porovnáním biologické aktivity (Letham a kol., 1964, Shaw a Wilson, 1964). Od té doby byl zeatin i další isoprenoidní cytokininy pozorovány u různých rostlinných druhů.

Prvním aromatickým cytokininem identifikovaným v rostlinném materiálu byl 6-(2-hydroxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-ribofuranosylpurin, který byl objeven v listech topolu (*Populus sp.*) a na základě toho triviálně pojmenován topolin (Horgan a kol., 1973). Obdobné *meta* hydroxylované deriváty byly objeveny ve stejném rostlinném materiálu v roce 1997 (Strnad, 1997). Dalším aromatickým cytokininem úspěšně izolovaným z přírodních pletiv (*Pimpinella anisum L.*) byl  $N^6$ -benzyadenin (BAP) (Ernst a kol., 1983).

Cytokininy představují strukturálně pestrou skupinu látek, z nichž přirozené cytokininy jsou převážně definovány jako  $N^6$ -substituované deriváty adeninu. V závislosti na postranním řetězci v poloze  $N^6$  lze cytokininy rozdělit do dvou skupin na isoprenoidní a aromatické (Obr. 2) (Mok a Mok, 2001). Mezi zástupce isoprenoidní skupiny patří  $N^6$ -isopentenyladenin (iP, 6-[(3-methylbut-2-enyl)amino]-9*H*-purin) a jeho hydroxylovaná forma zeatin, vyskytující se ve dvou konfiguracích; *trans* (*tZ*) a *cis* (*cZ*). K isoprenoidním CK se řadí také dihydrozeatin s nasyceným postranním řetězcem (DHZ; 6-[(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino]-9*H*-purin). Do skupiny aromatických pak lze zařadit kinetin (Kin; 6-furfurylamino-9*H*-purin), BAP a jeho hydroxylované deriváty topoliny.

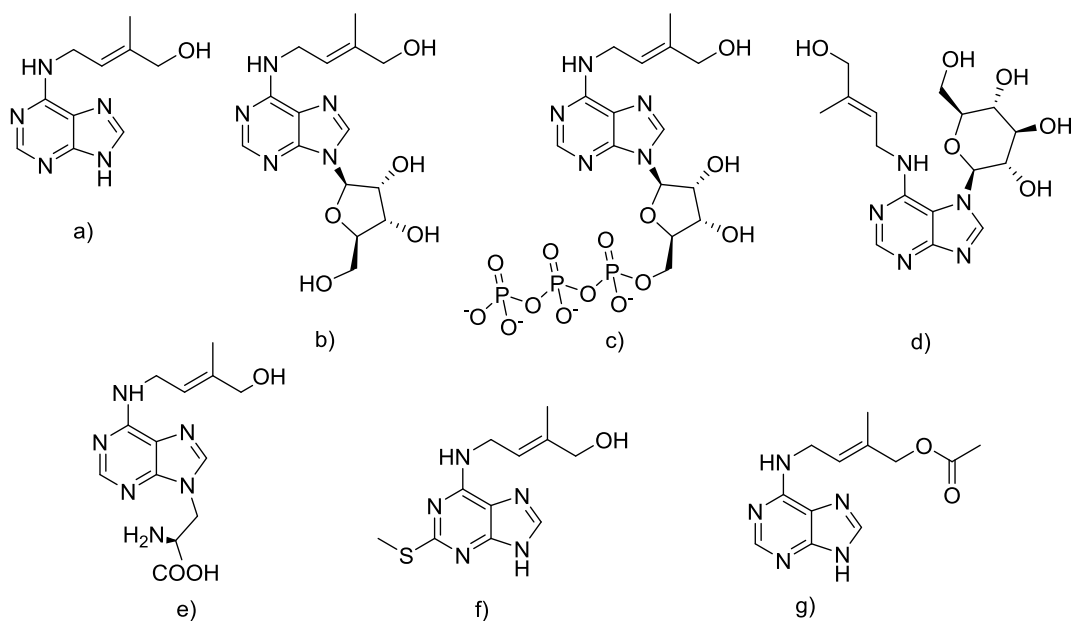
Mimo skupinu přírodně vyskytujících se cytokininů existují také syntetické deriváty s cytokininovou aktivitou např. *N,N'*-difenylmočovina, forchlorfenuron (*N*-fenyl-*N'*-(2-chlor-4-pyridyl)močovina) a thidiazuron (*N*-fenyl-*N'*-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)močovina).



**Obr. 2: Struktury vybraných cytokininů.** (A) přírodní cytokininy – isoprenoidní - a) iP, b) *tZ*, c) *cZ*, d) DHZ; aromatické – e) Kin, f) BAP, g) *o*-topolin, h) *m*-topolin. (B) syntetické látky s cytokininovou aktivitou – a) *N,N'*-difenylmočovina, b) forchlorfenuron, c) thidiazuron.

V pletivech rostlin se cytokininy vyskytují ve formě volných bází, nukleosidů, nukleotidů, cukerných nebo aminokyselinových konjugátů (Obr. 3). V případě

aminokyselinových konjugátů byly v lupině (*Lupinus sp.*) identifikovány dva deriváty – kyselina lupinová a dihydrolupinová vznikající z *O*-acetyl-L-serinu a *trans*-zeatinu, respektive dihydrozeatinu činností zeatin 9-aminokarboxyethyltransferasy (EC 2.5.1.50) (Knypl a kol., 1985, Parker a kol., 1975). U řas byla dále pozorována modifikace cytokininů methylsulfanylovou skupinou v pozici C2 (Tarkowski a kol., 2010). Z dalších modifikací je také známá acetylace terminální hydroxyskupiny na postranním řetězci tZ (Mok a Mok, 2001).



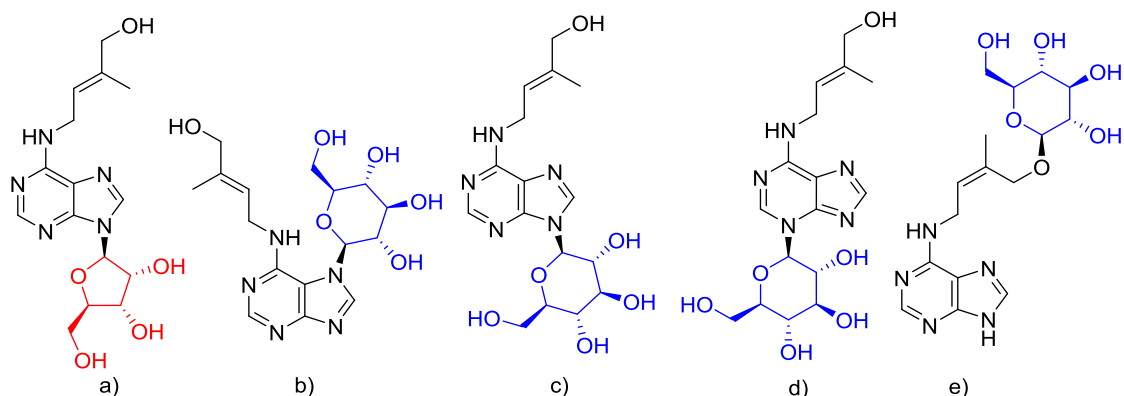
**Obr. 3: Přírodně se vyskytující deriváty cytokininů.** a) *trans*-zeatin b) *trans*-zeatinribosid, c) *trans*-zeatinribosid-5'-mono/di/trifosfát, d) *trans*-zeatin-7-glukosid, e) kyselina lupinová, f) 2-methylthio-*trans*-zeatin, g) *O*-acetyl-*trans*-zeatin.

Cytokiny hrají významnou roli v životním cyklu rostlin. Fungují zde jako hormony, a proto je třeba přísně kontrolovat hladiny aktivních forem (Frébort a kol., 2011). Regulace biologické aktivity cytokininů je pevně svázaná s mechanismy jako jejich biosyntéza, vzájemná konverze, transport, deaktivace a degradace. Důležitou roli zastává také signální dráha, která je zodpovědná za odpověď rostlin na cytokininový podnět.

### 3 Cukerné konjugáty cytokininů

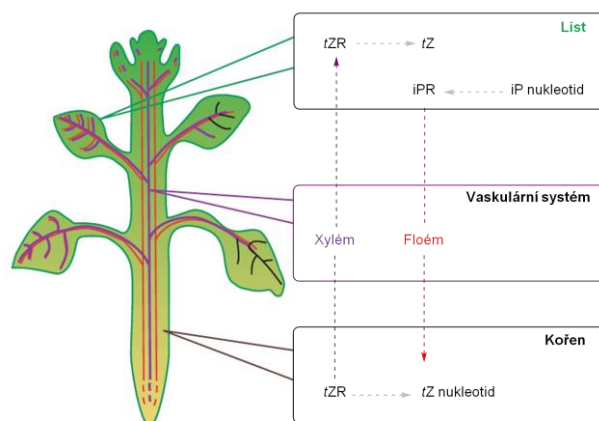
Cukerné konjugáty cytokininů lze rozdělit podle připojení glykosidové jednotky do dvou skupin na *N*-glykosidy a *O*-glykosidy (Bajguz a Piotrowska, 2009). První zmíněné, *N*-glykosidy, jsou látky s cukernou jednotkou navázanou přímo na purinový skelet. Nejčastěji dochází ke vzniku konjugátů v poloze N9 a N7, ale jsou známy i N3-glykosidy. Cukernou složku zde představují β-D-glukopyranosa a β-D-ribofuranosa. Druhou skupinou jsou *O*-glykosidy, které vznikají připojením

cukerného zbytku k hydroxylové skupině na  $N^{\beta}$ -postranním řetězci. Jako cukerná složka zde slouží  $\beta$ -D-glukopyranosa nebo  $\beta$ -D-xylofuranosa. Existují samozřejmě i látky s kombinací obou typů glykosylací např. *trans*-zeatinribosid-*O*-glukosid (*tZROG*) (Obr. 4).



**Obr. 4. Způsob připojení sacharidových jednotek na cytokininy.** a) *trans*-zeatinribosid, b) *trans*-zeatin-7-glukosid, c) *trans*-zeatin-9-glukosid, d) *trans*-zeatin-3-glukosid, e) *trans*-zeatin-*O*-glukosid.

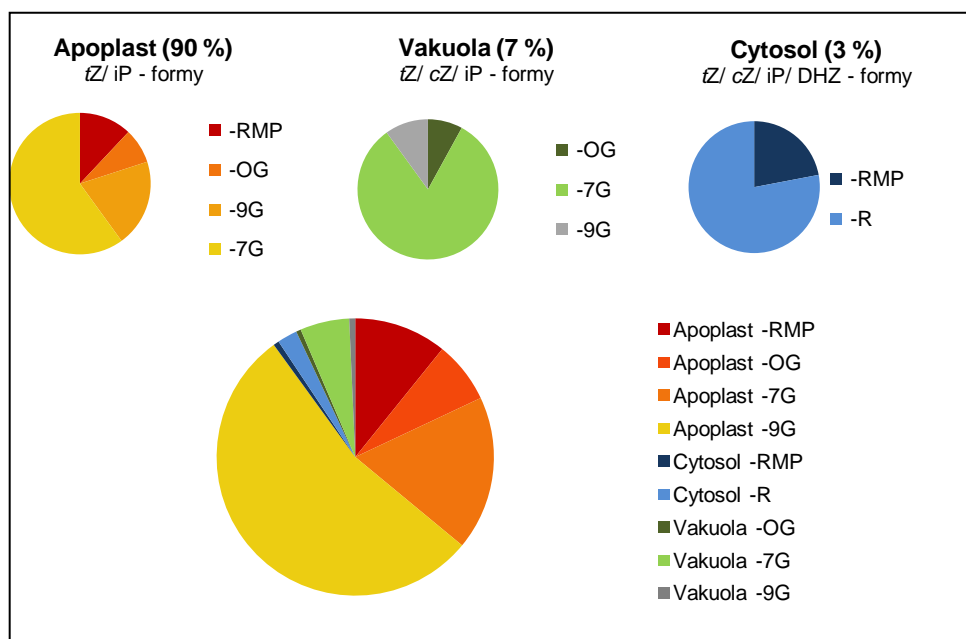
Cytokininové nukleosidy jsou důležitými intermediáty v *de novo* biosyntetické dráze cytokininů a zároveň představují transportní formy mezi nadzemními a podzemními částmi rostlin (Sakakibara, 2006). Biosyntéza probíhá terminálních částech rostlin, kde v kořenové špičce vzniká především *trans*-zeatin, který je transportován xylémem do nadzemní části. Naopak  $N^{\beta}$ -isopentenyladenin vzniká v nadzemní části a je transportován floémem do kořene (Obr. 5). Cytokininové ribosidy zároveň představují jednu z prvních forem, na kterou jsou převáděny exogenně aplikované volné báze cytokininů (Letham a Palni, 1983).



**Obr. 5: Distribuce CK forem v rámci rostliny upraveno dle (Sakakibara, 2006).** Umístění jednotlivých forem cytokininů a jejich distribuce napříč rostlinou za využití xylémových a floémových cévních svazků. *tZR* – *trans*-zeatinribosid, *tZ* – *trans*-zeatin, *iPR* –  $N^{\beta}$ -isopentenyladenosin, *iP* –  $N^{\beta}$ -isopentenyladenin.

Připojením cukerné jednotky (glukosy nebo xylosy) k cytokininu ať už do formy *N*- nebo *O*-glykosidu dochází k jeho inaktivaci (Brzobohatý a kol., 1993). Z hlediska stability jsou *O*-glykosidy schopné podléhat deglykosylaci zpět na aktivní formy činností  $\beta$ -glukosidasy (EC 3.2.1.21). *O*-glykosidy tak pravděpodobně zastávají zásobní funkci. U *N*-glykosidů závisí stabilita derivátů na poloze připojení cukerné jednotky k purinu. V případě *N7*- a *N9*-derivátů dochází k ireverzibilní deaktivaci, zatímco *N3*-glukosidy podléhají rozkladu  $\beta$ -glukosidasou za vzniku volné báze.

V rámci buněčné lokalizace cytokininů se 90 % z nich nachází v apoplastu, kde jsou převládajícími formami *O*- a *N*-glukosidy a v menší míře cytokininové nukleotidy (Obr. 6) (Jiskrová a kol., 2016, Šmehilová a kol., 2016). Sedm procent z celkového počtu cytokininů se nachází ve vakuolách, kde jsou majoritně přítomny opět *N7*-glukosidy a minoritně *O*- a *N9*-glukosidy. Zbýlá tři procenta se nacházejí v cytosolu a představují je ribosidy a cytokininové nukleotidy.



**Obr. 6: Distribuce a subcelulární lokalizace hlavních forem cytokininů v listech u 45 dní starých rostlin *Arabidopsis thaliana* dle (Jiskrová a kol., 2016).** -R - ribosid, -RMP - ribosid-5'-monofosfát, -7G - *N7*-glukosid, -9G – *N9*-glukosid, -OG - *O*-glukosid.

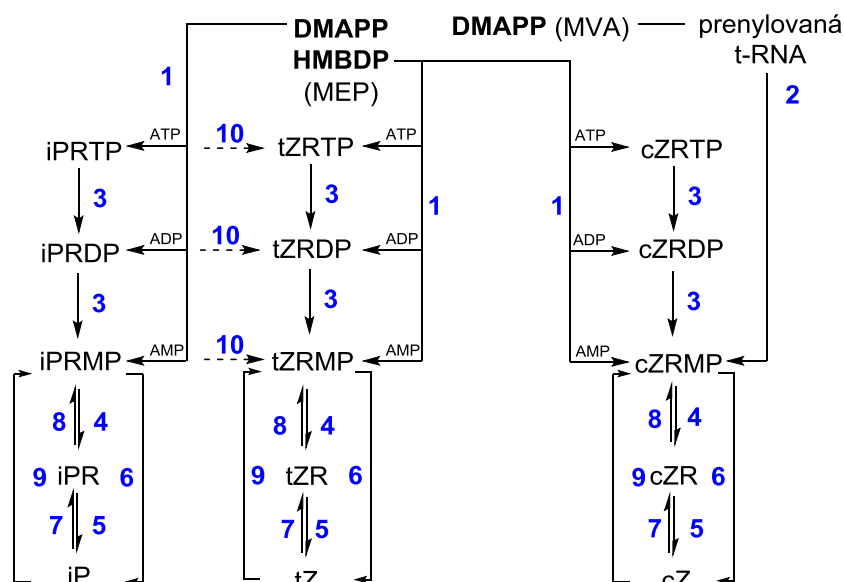
V roce 2016 byla provedena studie zaměřená na distribuci a akumulaci glukosidů v listech *A. thaliana* (Šmehilová a kol., 2016). K určení hladin jednotlivých forem byly zkoumány listy ve všech fázích jejich ontogenetického vývoje (zelené plně vyvinuté listy z nekvetoucí a kvetoucí rostliny, rostliny v reprodukční a rostliny v senescenční fázi). V průběhu stárnutí byl pozorován značný nárůst množství a kumulace *N7*-, *N9*-glukosidových forem. V porovnání s nimi byly *O*-glukosidy zastoupeny mnohonásobně méně, přičemž z jejich derivátů vykazoval nejvýznamnější zastoupení

tZOR. V průběhu senescence vzrostla i hladina cZ a cZR. Ale obecně byly aktivní formy cytokininů v podstatně nižším zastoupení než jejich inaktivní formy - glukosidy.

### 3.1 Biosyntéza cytokininových cukerných konjugátů

#### 3.1.1 Ribosidy

Jak již bylo zmíněno výše, cytokininové ribosidy jsou meziproduktem biosyntetické dráhy cytokininů, jejímž prvním a nejdůležitějším krokem je připojení postranního isoprenoidního řetězce na adeninové nukleotidy (ATP/ADP/AMP) (Frébort a kol., 2011). V průběhu biosyntézy dochází ke konverzi cytokininových nukleotidů vzniklých prenylací, přes odpovídající ribosidy, až na volné báze činností enzymů obecného purinového metabolismu (Obr. 7).



**Obr. 7. Biosyntéza cytokininů v rostlinách, upraveno dle (Spíchal, 2012).** (1) Adenylationisopentenytransferasa (EC 2.5.1.27), (2) tRNAisopentenytransferasa (EC 2.5.1.8), (3) fosfatasa (EC 3.1.3.1), (4) 5'-ribonukleotidfosfohydrolasa (EC 3.1.3.5), (5) adenosinnukleosidasa (EC 3.2.2.7), (6) fosforibohydrolasa "Lonely guy" (LOG, EC 3.2.2.n1), (7) purinnukleosidfosforylase (EC 2.4.2.1), (8) adenosinkinasa (EC 2.7.1.20), (9) adeninfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.7), (10) cytochrom P450 monooxygenasa (EC 1.14.14.1), (11) zeatinisomerasa, DMAPP – dimethylallylpyrofosfát, HMBPP - 4-hydroxy-3-methyl-2-butenyldifosfát, iP -  $N^6$ -isopentenyladenin, tZ - *trans*-zeatin, cZ - *cis*-zeatin, -R cytokinin ribosid, -RMP/-RDP/-RTP ribosid-5'-mono/di/trifosfát, MEP methylerythritol 4-fosfátová dráha, MVA mevalonátová dráha.

Jako donory isoprenoidního řetězce jsou využívány 4-hydroxy-3-methyl-2-butenyldifosfát (HMBDP) a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) vznikající v methylerythritol 4-fosfátové dráze lokalizované v plastidech (Kakimoto, 2003). Prenylace je katalyzována adenylationisopentenytransferasou (EC 2.5.1.27), jež se v huseníčku rolním (*A. thaliana*) vyskytuje v sedmi isoformách, označovaných jako



AtIPT1, AtIPT3–AtIPT8. Tímto způsobem pravděpodobně vznikají všechny isoprenoidní cytokininové nukleotidy (iP, tZ i cZ) (Spíchal, 2012). V následujících krocích dochází k defosforylaci nukleotidů nespecifickými fosfatasami: 5'-nukleotidasou (EC 3.1.3.5), alkalickou (EC 3.1.3.1) a kyselou fosfatasou (EC 3.1.3.2), až ke vzniku monofosfátů, které jsou dále převáděny na ribosidy prostřednictvím 5'-ribonukleotidfosfohydrolasy (EC 3.1.3.5). Finálním krokem je přeměněna ribosidů adenosinnukleosidasou (EC 3.2.2.7) na jednotlivé báze. Alternativní dráhou vzniku biologicky aktivních bází z monofosfátů je přímá konverze prostřednictvím cytokininnukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasy, tzv. Lonely guy (LOG, EC 3.2.2.n1) (Kurakawa a kol., 2007). K této jednodrokové transformaci existuje i zvrtná reakce katalyzovaná adeninfosforibosyltransferasou (EC 2.4.2.7). Ke vzniku tZ vede i alternativní cesta oxidací postranního řetězce iP cytochromem P450 monooxygenasou (EC 1.14.14.1) (Astot a kol., 2000). V tomto procesu slouží jako substráty iP nukleotidy, iPRTP, iPRDP a iPRMP. Majoritní dráha vedoucí ke vzniku cZ je spojená s degradací prenylované tRNA. Prenylaci katalyzuje tRNAisopentenylyltransferasa (EC 2.5.1.8), kdy donorem isoprenoidního řetězce je dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) pocházející z MVA dráhy lokalizované v cytosolu. Degradací tRNA je získáván *cis*-zeatinribosid-5'-monofosfát (cZRMP). V huseníčku jsou přítomny dvě isoformy tRNAisopentenylyltransferasy označované jako AtIPT2 a AtIPT9 (Kakimoto, 2001). Původně se uvažovalo, že alternativní cestou vedoucí ke vzniku *cis*-zeatinu je izomerace *trans*-zeatinu katalyzovaná zeatinisomerasou, která byla v roce 1993 zmapována v extraktu z nezralých semen fazole (*Phaseolus vulgaris*) (Bassil a kol., 1993). Od té doby se jí však nepodařilo znovu izolovat a v roce 2017 bylo zjištěno, že interkonverze mezi jednotlivými formami zeatinu neprobíhá enzymaticky, nýbrž spontánním chemickým procesem (Hluska a kol., 2017).

Dráha popisující vznik aromatických cytokininů nebyla do dnešní doby objasněna u vyšších rostlin, mechů ani řas (Zürcher a Müller, 2016).

### 3.2 Vznik ostatních cukerných konjugátů cytokininů

Nejdůležitějším mechanismem v deaktivaci cytokininů je jejich převedení na cukerné konjugáty glykosylací. Tento proces je společný i pro jiné hormony jako auxiny, kyselinu abscisovou, jasmonovou a salicylovou (Westfall a kol., 2013). V případě cytokininů vede glykosylace ke vzniku inaktivních forem, které mohou být zpětně aktivovány odštěpením sacharidu (O- a N3-glykosidy) anebo označeny k degradaci (N7- a N9-glykosidy).

Enzymy zajišťující glykosylaci jsou cytosolické uridindifosfátglukosyltransferasy (UGT), které jsou rozděleny do 69 multigenových rodin, z nichž Rodina 1 (Family 1)

obsahuje enzymy zodpovědné za glukosylaci malých molekul, jakými jsou například rostlinné hormony (Hou a kol., 2004). V rámci dané rodiny bylo u *Arabidopsis thaliana* identifikováno pět cytokinin specifických glykosyltransferas (UGT76C1, UGT76C2, UGT73C1, UGT73C5 a UGT85A1), z nichž později pouze tři byly potvrzené skutečně jako cytokinin specifické (Wang a kol., 2011). Z hlediska výsledných produktů se ukázalo, že UGT76C1 (EC: 2.4.1.-) a UGT76C2 (EC: 2.4.1.-) jsou specifické *N*-glukosyltransferasy schopné glykosylace do pozic *N7* a *N9*, zatímco UGT85A1 (EC: 2.4.1.-) je *tZ* specifická *O*-glukosyltransferasa (Jin a kol., 2013). Z pohledu expresních profilů dochází ke zvýšené expresi UGT85A1 v listech po nástupu senescence zatímco exprese UGT76C1 s věkem klesá (Šmehilová a kol., 2016). UGT76C2 má stabilní expresi všech vývojových stupních a je také ovlivňována exogenně aplikovanými cytokininy (iP, KIN a BAP). UGT85A1 byla identifikována jako cytosolický enzym (Jin a kol., 2013). Pomocí označení zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) byla potvrzena stejná lokalizace i pro UGT76C2 s akumulací podél plasmatické membrány a jádra. Na základě porovnání signálních peptidů se předpokládá obdobné umístění i pro UGT76C1.

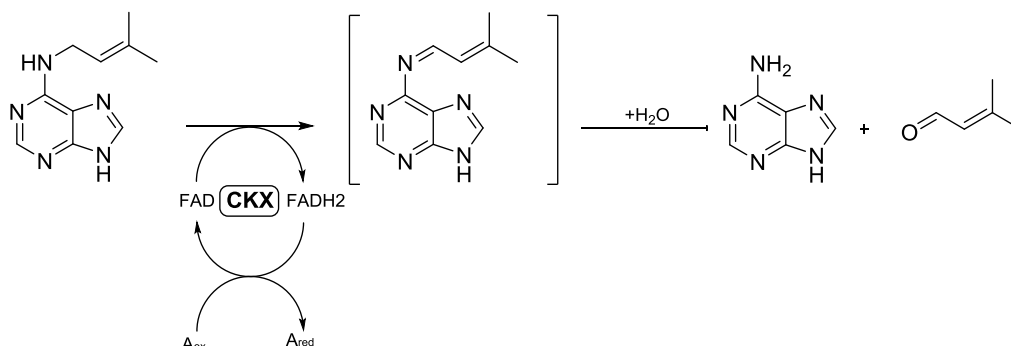
UGT85A1 vykazuje porovnatelnou aktivitu vůči *tZ*, *cZ* stejně jako k DHZ (Hou a kol., 2004). Dalším výsledkem studie bylo, že glukosylace na jedné straně cytokininu výrazně ovlivňuje glukosylaci na druhé straně. Například glukosylace *tZ* značně redukuje aktivitu *N*-glukosyltransferas k tomuto substrátu a naopak. Obě *N*-glykosyltransferasy vykazují stejnou aktivitu vůči všem základním cytokininům (iP, *tZ*, *cZ*, DHZ, BAP, Kin), přičemž preferenčně vznikají *N7* izomery.

### 3.3 Degradace cukerných konjugátů

Konečným krokem existence cytokininů v rostlinných pletivech je jejich degradace pomocí cytokinindehydrogenasy (CKX, EC 1.5.99.12) (Pačes a kol., 1971). Tento proces byl prvně demonstrován v roce 1971 na tabákové kultuře. O tři roky později byl objeven enzym odpovědný za tuto reakci, a byl pojmenován cytokininoxidasa (Whitty a Hall, 1974). Avšak na základě zkoumání reakčního mechanismu byl enzym posléze přejmenován na cytokinindehydrogenasu (Galuszka a kol., 2001). CKX je flavoenzym s kovalentně vázaným FAD kofaktorem, který je připojen prostřednictvím 8-methylové skupiny isoalloxazinového heterocyklu k histidinovému zbytku ve vysoce konzervovaném GHS motivu (Malito a kol., 2004).

Degradace je zajištěná oxidativním odštěpením *N*<sup>6</sup> postranního řetězce, kdy v prvním kroku dochází enzymaticky ke vzniku meziproduktu v podobě iminu. Následnou spontánní hydrolýzou vzniká adenin nebo jeho odpovídající derivát a aldehyd odvozený od postranního řetězce (Obr. 8) (Frébortová a kol., 2004).

K reoxidaci FAD kofaktoru slouží pravděpodobně látky *p*-chinonové struktury, nebo volné radikály produkované činností lakasy a peroxidasy (např. z DIMBOA) (Frébortová a kol., 2010).



**Obr. 8: Reakční schéma CKX (EC 1.5.99.12) dle (Frébortová a kol., 2004).** Degradace cytokininu ve formě iP cytokininoxidasou na adenin a 3-methyl-butenal.

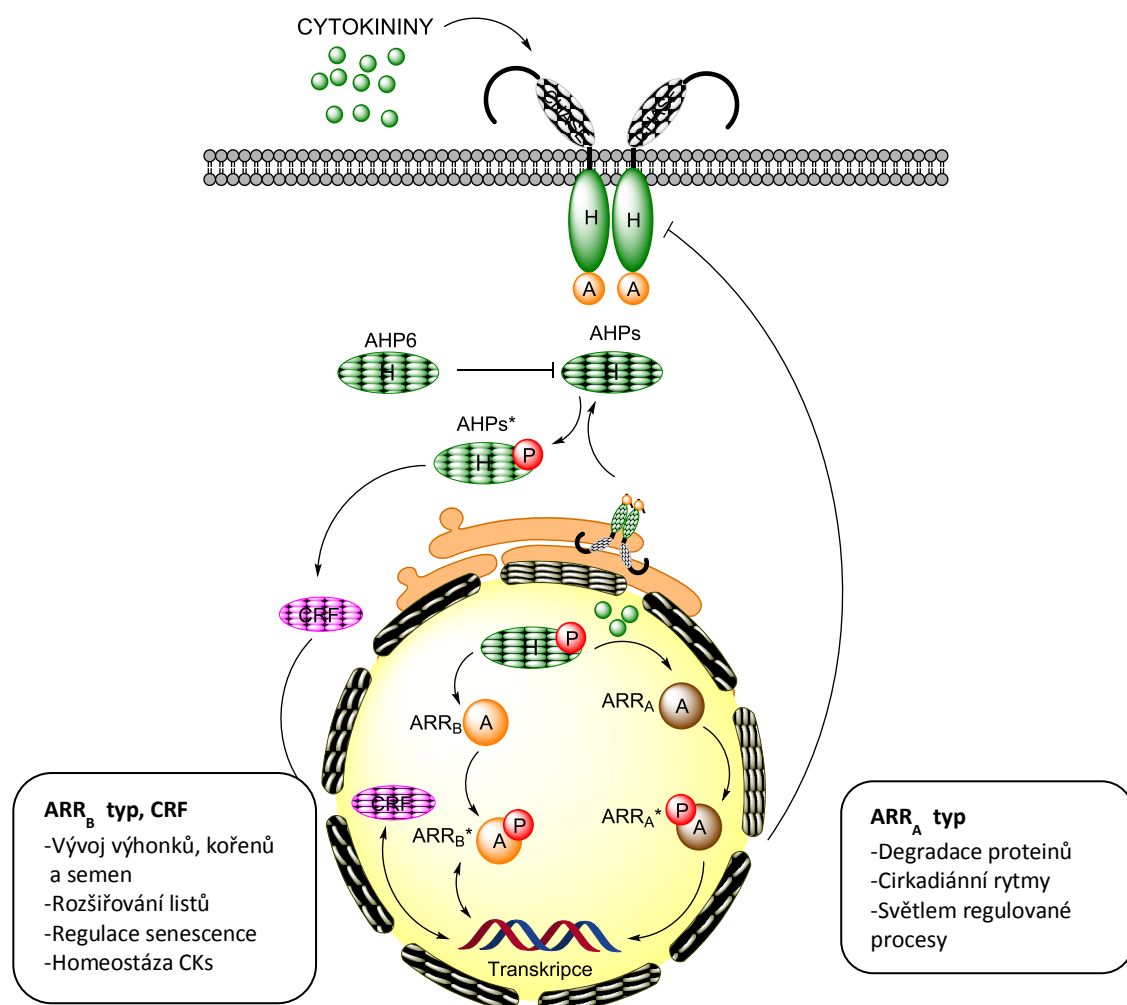
Katabolismus cytokininů je u *A. thaliana* řízen multigenovou rodinou CKX kódující sedm isoformů označovaných jako AtCKX1-AtCKX7 (Schmülling a kol., 2003). V rámci subcelulární lokalizace probíhá degradace cytokininů převážně v apoplastu (AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6), dvě formy degradačních enzymů byly identifikovány ve vakuolách (AtCKX1 a AtCKX3) a AtCKX7 je přítomna v cytoplasmě.

Jednotlivé cytokininové formy mohou vykazovat rezistenci vůči cytokinindehydrogenasám (Galuszka a kol., 2007). Mezi rezistentní zástupce patří O-glukosidy, N7-glukosidy a deriváty DHZ. Obtížně štěpitelnými jsou i cytokininy s aromatickým postranním řetězcem. Všechny CKX enzymy preferenčně rozkládají isoprenoidní cytokininy (iP, tZ a jejich ribosidy). Substrátová specifita jednotlivých isoformů je dána aminokyselinovým residuem, které je přítomno při vstupu do aktivního místa enzymu. AtCKX1 (Ala) vykazují nejvyšší aktivitu ve slabě kyselém pH s preferencí pro cytokininové ribosidy a především N9-glukosidy. AtCKX2 a AtCKX4 (Glu) preferují volné báze v neutrálním nebo mírně basicím prostředí. AtCKX3 (Gly) obecně využívá jako nejvýhodnější substrát cytokininové nukleotidy, především iPRMP. AtCKX7 (Ser) stejně jako AtCKX1 preferuje N9-glukosidy. AtCKX5 a AtCKX6 nevykazují žádné výrazné preference.

#### 4 Cytokininová signální dráha a ligandová specifita receptorů

Odpověď rostlin na cytokininový stimul je zprostředkována dvou komponentní His-Asp fosforylační signální dráhou, vedoucí od hybridního kinasového receptoru přes fosforylační kroky až k regulaci genové exprese. Cytokininová signální dráha je primárně složena ze tří komponent: hybridních kinasových receptorů

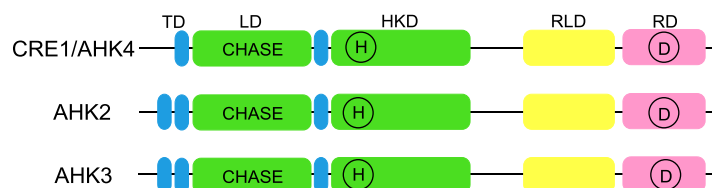
(HK) – rozpoznání ligandů a interakce s nimi, histidin fosfotransferových proteinů (HP) – přenos signálu z cytosolu do jádra, regulátorů odpovědi (RR) a sekundárně z faktorů cytokininové odpovědi (CRF) – transkripční faktory (Obr. 9).



**Obr. 9: Model signální dráhy cytokininů u *Arabidopsis* dle (Shi a Rashotte, 2012).** Cytokininové receptory jsou lokalizovány v plasmatické membráně i na endoplasmatickém retikulu. Po interakci cytokinin-receptor dochází k dimerizaci a autofosforylaci receptoru. Vzniklý signál je přenesen AHP a přesměrován z cytosolu do jádra, kde dochází k fosforylaci příslušných ARR. K aktivaci CRF dochází v cytosolu pomocí AHP a po přesunu do jádra regulují genovou expresi. Zpětná inhibice signální dráhy je zajištěna AHP6 a fosforylovanými ARR typu A.

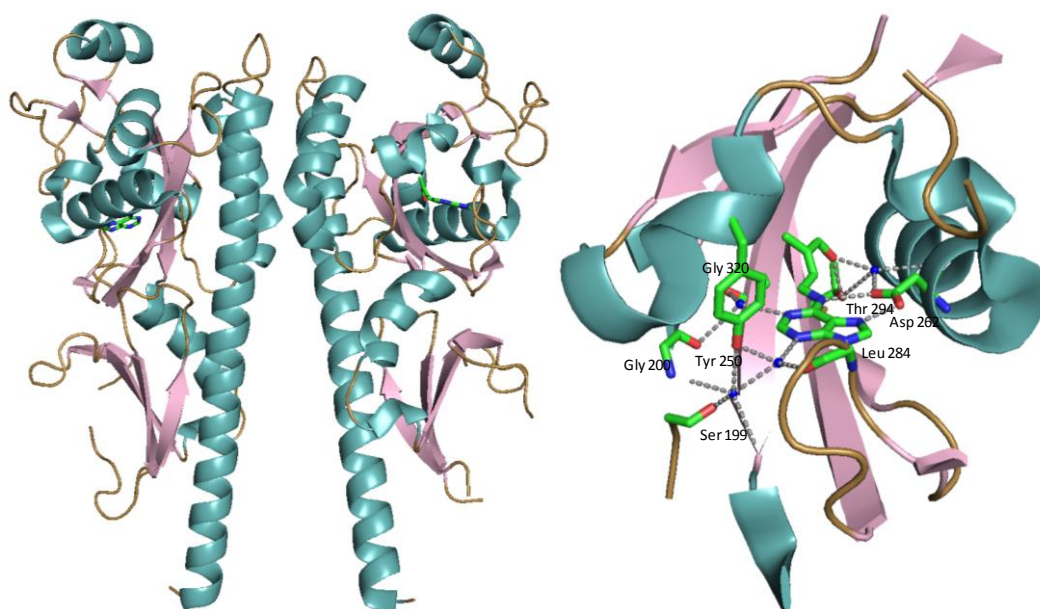
Na začátku 21. století byly v rostlinných pletivech huseníčku objeveny tři hybridní kinasové receptory (AHK). První z nich byl objeven CRE1/AHK4 a bezprostředně po něm i AHK2 a AHK3 (Inoue a kol., 2001). Z hlediska struktury jsou výše zmíněné receptory složeny ze dvou až tří transmembránových domén, mezi nimiž je uložena tzv. CHASE (extracelulární histidin kinasová sensorová) doména sloužící jako vazebné místo pro ligand (Anantharaman a Aravind, 2001, Mougel a Zhulin, 2001). Tento komplex je následován histidin kinasovou doménou obsahující kondenzovaný

histidin, dále přijímací (receiver) a k ní homologní doménou (receiver-like domain) obsahující konzervovaný aspartátový zbytek (Obr. 10) (Heyl a Schmülling, 2003).



**Obr. 10: Struktura receptorů CRE1/AHK4, AHK2, AHK3 dle (Heyl a Schmülling, 2003).** TD - transmembránová doména; LD - ligandová doména; HKD - histidin kinasová doména; RLD - receiver-like doména; RD – přijímací doména. Zakroužkované H a D; histidinový a aspartátový zbytek zodpovědný za přenos fosfátu.

Vědecká skupina profesora Hothorna připravila v roce 2011 krystalové struktury sensorové domény receptoru CRE1/AHK4 v komplexu s určitými cytokininy (iP, BAP, *τζ*, Kin) (Hothorn a kol., 2011). Při vizualizaci struktur je cytokininový ligand navázán pomocí postranního řetězce do nepolární vazebné kapsy receptoru. Jeho ukotvení je zajištěno van der Waalsovými silami a dvěma vodíkovými můstky mezi Asp262 a  $N^{\delta}$  a  $N7$  atomy cytokininu, dále také nepřímými vodíkovými vazbami skrze molekuly vody. Neaktivnějším cytokininem je *τζ* (Obr. 11), jeho afinita je zajištěna větší stabilitou způsobenou další vodíkovou vazbou mezi Thr294 a hydroxyskupinou isoprenoidního řetězce.



**Obr. 11: Krystalová struktura vazebné domény receptoru CRE1/AHK4 v komplexu s *τζ* (pdb kód: 3T4L).** Vlevo struktura celého komplexu; vpravo detail vazebného místa receptoru, modré kuličky symbolizují molekuly vody, šedá přerušovaná čára představuje vodíkové vazby, přímé interakce - Asp262, Thr294, nepřímé interakce Gly320, Gly200, Ser199, Tyr250, Leu284.

Jednotlivé přirozené cytokininy a jejich rozdílné formy mají různou afinitu vůči cytokininovým receptorům (Spíchal a kol., 2004). Pomocí reportérového *ARR5::GUS* testu v *A. thaliana* na receptorech AHK3, CRE1/AHK4 bylo zjištěno, že pro oba receptory jsou jako ligandy vhodné volné cytokininové báze *tZ* a *iP* (Tab. 1). Z aromatických cytokininů je pro oba receptory nejvýhodnějším ligandem *mT*. Na základě schopnosti vázat větší škálu ligandů vykazuje AHK3 menší specifitu. Ani jeden z testovaných *O*- nebo *N*-glukosidů v tomto testu nevykazoval žádnou aktivitu.

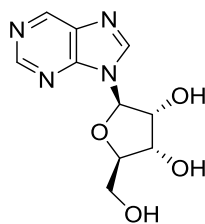
**Tab. 1:** Porovnání relativních aktivit vybraných cytokininových derivátů na receptorech CRE1/AHK4 a AHK3 pomocí reportérového *ARR5::GUS* testu v *A. thaliana* dle (Spíchal a kol., 2004).

Sloučenina	Relativní aktivita (%)		
	CRE1/AHK4	AHK3	<i>A. thaliana</i>
<i>tZ</i>	100	100	100
<i>tZR</i>	10	92,5	47,9
<i>tZOG</i>	0,0	0,0	92,0
<i>tZROG</i>	0,0	0,0	84,1
<i>tZ7G</i>	0,0	0,0	10,6
<i>tZ9G</i>	0,0	0,0	14,1
<i>cZ</i>	0	54,2	40,5
<i>iP</i>	89,2	72,9	108,2
<i>iPR</i>	10	10,1	77,3
Kin	2,5	23,8	94
KinR	0,0	5,0	61,7
BAP	7,7	3,6	93,6
<i>mT</i>	28,6	79,8	123,4

## 5 Chemická glykosylace purinů

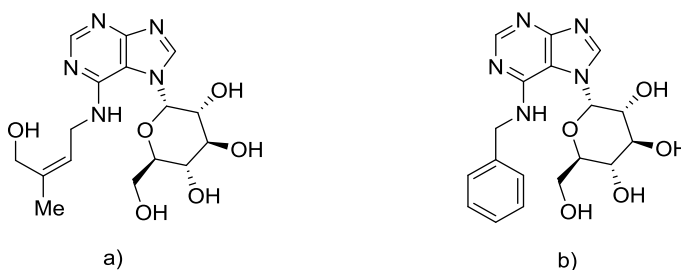
Purinový heterocyklus je základem řady přírodně vyskytujících se látek (Rosemeyer, 2004), jako jsou koenzymy a kofaktory v oxidačně-redukčních procesech (cAMP, NAD<sup>+</sup> a FAD), dále jako zásobní jednotky energie ve všech živých buňkách ve formě adenosin trifosfátu (ATP) nebo při  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v podobě acetylkoenzymu-A. Mezi zástupce sekundárních metabolitů se řadí např. xantin, kofein a mimo jiné skupina methylovaných purinových derivátů izolovaných z mořských živočichů a součástí výše zmíněných rostlinných hormonů cytokininů. Purinový skelet je součástí také DNA bází adeninu, guaninu a jejich derivátů hypoxantinu a isoguaninu.

Glykosylované purinové deriváty jsou běžným jevem. Nejjednodušším zástupcem z nich je purinribosid, tzv. nebularin (Obr. 12), který je přítomný v houbě *Agaricus nebularis*.



Obr. 12: Strukturální vzorec nebularinu.

Většina známých přírodních látek má cukerné jednotky připojené do pozice *N9*, výjimku představují právě cytokininy s navázanou glukosou na dusíkové atomy v pozici *N7* a *N3*. V roce 1972 byl v ředkvi seté (*Raphanus sativus*) objeven glukosid rafanatin (tZ7G) (Parker a Letham, 1972), o tři roky později byl izolován ze stejného biologického materiálu 6-benzylaminopurin-7- $\beta$ -D-glukopyranosid (Duke a kol., 1975) (Obr. 13). Ve stejném roce byl objeven *N3*-glukosid *N6*-benzylaminopurinu (Letham a kol., 1975).



Obr. 13: Strukturální vzorce a) rafanatin, b) 6-benzylaminopurin-7- $\beta$ -D-glukopyranosid.

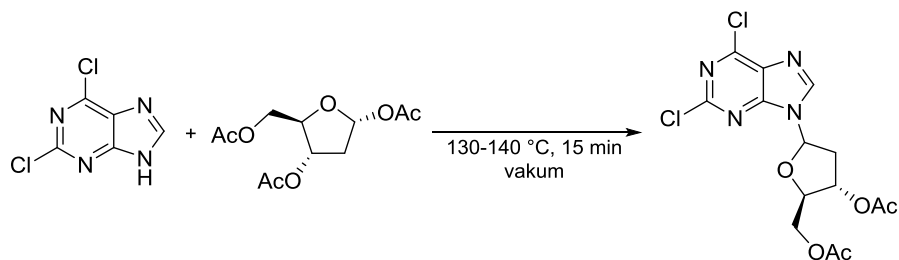
V závislosti na výskytu přírodních sloučenin bylo zaznamenáno množství pokusů tyto látky syntetizovat uměle za účelem bližšího určení struktury, stability, biologické funkce a lokalizace (Rosemeyer, 2004).

Glykosylace je reakce, při které dochází k navázání sacharidu na funkční skupinu glykosylového akceptoru (Demchenko, 2008). Průběh reakce a optimální podmínky jsou odlišné v závislosti na typu použitého aglykonu i monosacharidu. Ve většině případů glykosylace zahrnuje nukleofilní přesun do anomerního centra. V průběhu reakce dochází k inverzi konfigurace na anomerním atomu uhlíku. Vznik  $\alpha$  nebo  $\beta$  anomerů je závislý na struktuře a konformacích výchozích látek i na podmínkách reakce. Glykosylace často využívá plně ochráněné monosacharidy. Mezi často používané chránící skupiny (PG) patří benzylové, benzoylové, acetylové a toluoylové skupiny, anebo chránící skupiny na bázi křemíku. Regioselektivita se při glykosylaci purinů vyskytuje pouze výjimečně. Obvykle vzniká směs izomerů *N7* a *N9*, jejichž poměr lze upravit reakčními podmínkami.

## 5.1 Metody glykosylace purinů

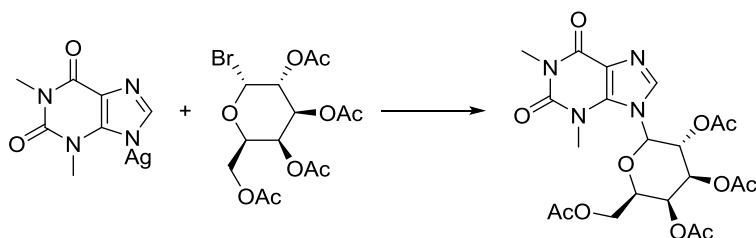
Syntézu nukleosidů lze obecně provést několika způsoby: i) fúzní metodou, která zahrnuje zahřívání báze a acetylovaného sacharidu, ii) metodou obsahující soli těžkých kovů s heterocyklickými bázemi a cukry, iii) Silyl-Hilbert-Johnsonovou reakcí, též známou jako Vorbrüggenova reakce, iv) Mitsunobu alkyací (Vorbrüggen a Ruh-Pohlenz, 2000).

V roce 1968 byla publikována syntéza a biologická aktivita nukleosidů odvozených od 2-fluoroadeninů (Montgomery a Hewson, 1969). Součástí syntetické sekvence byla glykosylace 2,6-dichlorpurinu zahříváním výchozí látky ve vakuu v přítomnosti peracetylovaného sacharidu při 130-140 °C po dobu 15 minut (Obr. 14). Výsledkem byla 85% konverze s poměrem 1,4:1  $\alpha$ : $\beta$  anomerů. Stejný mechanismus byl použit i při první syntéze 2-chloro-2'-deoxyadenosinu (cladribin, 2-CdA), který poskytl směs anomerů a celkový výtěžek 80 % (Leon a kol., 1972).



Obr. 14: Schéma reakce 2,6 dichlorpurinu s peracetylovaným sacharidem.

V roce 1914 byla provedena první chemická glykosylace purinu reakcí acetobromglukosy se stříbrnou solí teofylinu v alkalickém prostředí (Fischer a Helferich, 1914). Výsledkem byl theofylin-tetra-O-acetylglukopyranosid (Obr. 15). Později tato reakce byla pojmenována jako Fischer-Helfreichova metoda. Obdobně byly provedeny reakce se sodnými (Kazimierczuk, 1984, Davoll a Lythgoe, 1948) a rtuťnými solemi (Cowley a kol. 1978).

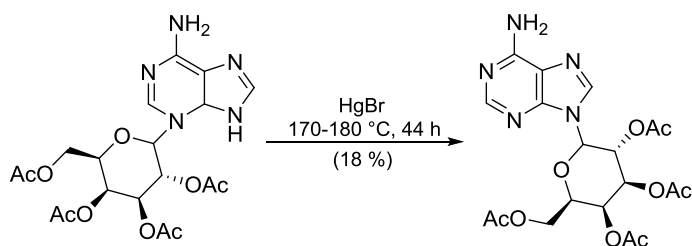


Obr. 15: Chemická glykosylace dle publikace (Fischer a Helferich, 1914), tzv. Fischer-Helfreichova metoda.

Dalším způsobem přípravy nukleosidů jsou intermolekulární a intramolekulární transglykosylační metody. Intramolekulární transglykosylace jsou využívány k přípravě

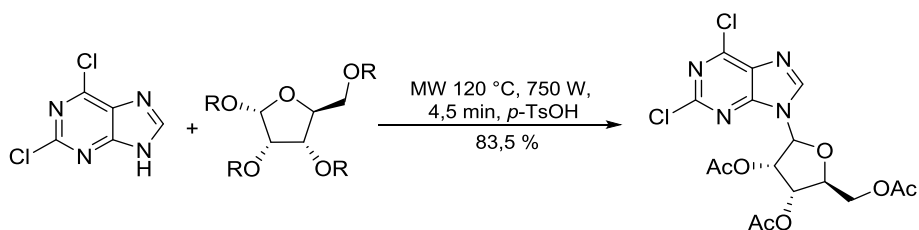


složitějších látek, při kterých dochází k migraci funkčních skupin např. u purinů z *N3* do *N9* a *N7* do *N9*. V roce 1970 byla provedena reakce, kdy byl zahříván 3-β-D-glukopyranosyladenin s bromidem rtuťnatým při 170-180 °C po dobu 44 h (Obr. 16). Při reakci docházelo k migraci sacharidové jednotky z *N3* na *N9* atom purinového skeletu za vzniku 9-β-D-glukopyranosyladeninu s 18% výtěžkem (Miyaki a Shimizu, 1970).



**Obr. 16:** Schéma glukosylové migrace z polohy *N3*→*N9*.

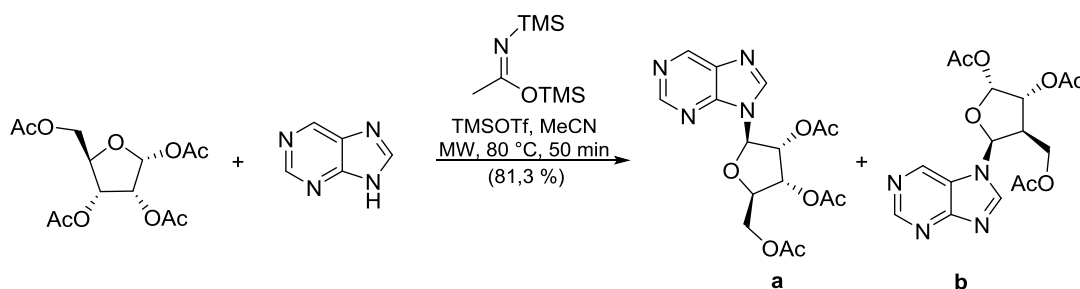
V dnešní době je nejvyužívanější metodou k syntéze nukleosidů Vorbrüggenova glykosylace, při níž je využívána reakce purinových bazí s acetylovaným sacharidem v přítomnosti Lewisových kyselin (např.  $\text{SnCl}_4$ , TMSOTf,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Ti}(\text{O}-i\text{-Pr})_4$ ). V rámci přípravy 6-arylpurinových nukleosidů byl publikován postup pro syntézu 6-chlor-9-(2,3,5-tri-O-acetyl-β-L-ribofuranosyl)purinu (Hocek a kol., 2006). Reakcí 6-chlorpurinu s tetra-O-acetyl-L-ribofuranosou v acetonitrilu v přítomnosti  $\text{SnCl}_4$  jako Lewisovy kyseliny byl připraven cílený produkt jako žlutá pěna s výtěžkem 61 %. V roce 2005 byla publikována Vorbrüggenova glykosylace dokonce v MW reaktoru katalyzovaná *p*-toluensulfonovou kyselinou bez použití rozpouštědla (Qu a kol., 2005). 2,6-Dichlorpurin s tetra-O-aceetylribofuranosou byl zahříván v konvenční mikrovlné troubě při 120 °C při 750 W po dobu 4,5 min. Výsledný produkt byl získán po krystalizaci z alkoholů s výtěžkem 83,5 % (Obr. 17).



**Obr. 17:** Schéma Vorbrüggenovy glykosylace dle publikace (Qu a kol., 2005).

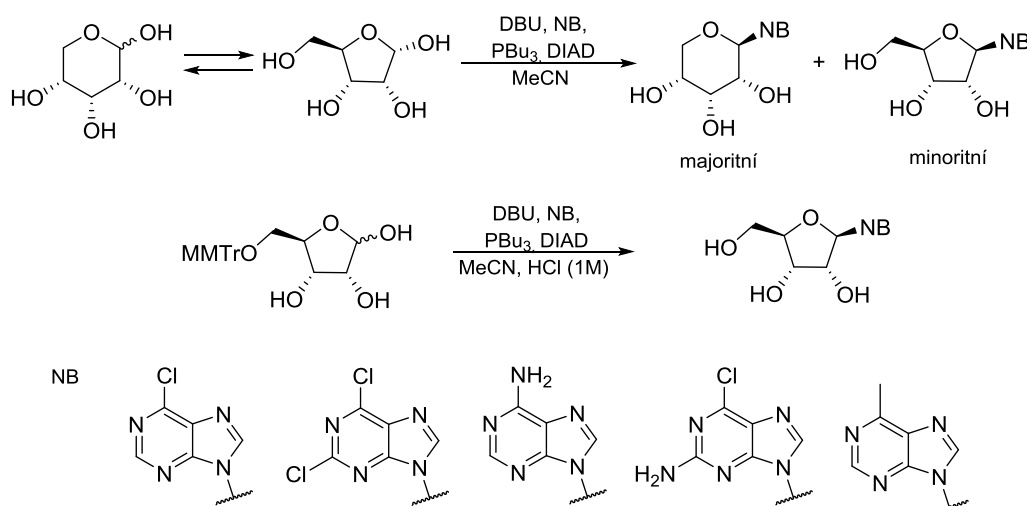
Vorbrüggenova ribosylace purinů byla využívána i nadále (Nikolaus, 2007). Kdy byla provedena reakce purinu s *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamidem (BSA) a tetra-O-acetyl-D-ribofuranosou v přítomnosti Lewisovy kyseliny a trimethylsilyl triflátu (TMSOTf). Reakce probíhala při 80 °C v MW reaktoru po dobu 50 min za vzniku

O-acetylovaného nebularinu a jeho *N7* izomeru v poměru 3,7:1 s celkovým výtěžkem 81,3 % (Obr. 18).



Obr. 18: Schéma Vorbrüggenovy glykosylace při přípravě O-acetylovaného nebularinu dle publikace (Nikolaus, 2007). Výtěžky reakce 81,3 % v poměru 3,7:1 a:b.

Tři roky zpět byla použita Mitsunobu reakce pro přímou jedнокrokovou syntézu purinových a pyrimidinových nukleobází s neochráněnou a 5-O-mono ochráněnou D-ribosou (Downey a kol., 2015). Reakce byla uplatněna pro řadu purinových derivátů (6-chlorpurin, 2,6-dichlorpurin, adenin, 2-amino-6-chlorpurin atd.) a probíhala v acetonitrilu za 0 °C, později za laboratorní teploty v přítomnosti 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-enu (DBU), tributylfosfinu (PBU<sub>3</sub>) a diisopropylazodikarboxylátu (DIAD) po dobu 12 h. Produkty reakcí byly výlučně β-anomery, ale forma cukerné jednotky (ribofuranosa/ ribopyranosa) se lišila v závislosti, zda byl použita neochráněná nebo ochráněná ribosa. Při použití D-ribosy vznikaly majoritně ribopyranosidy a v menší míře ribofuranosidy (Obr. 19). V případě 6-chlorpurinu byl poměr výtěžků následující 76 % pyranosidu a 3 % furanosidu.



Obr. 19: Metoda glykosylace dle publikace (Downey a kol., 2015).

Reakcí nukleobází s D-ribosou, jejíž hydroxyskupina v pozici 5 byla ochráněna 4-methoxytritylem (MMTr), za stejných podmínek vznikaly výlučně odpovídající

ribofuranosidy. Chránící skupina byla následně odstraněna vymícháním v acetonitrilu s 1M HCl.

# **Experimentální část**

## 6 Materiály a metody

### 6.1 Chemikálie

V experimentální části této práce byly použity následující chemikálie: acetanhydrid, benzylamin (Fluka); glukosa, galaktosa (Lachema); Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> (Lachner); 6-chlorpurin (Olchemim); aceton, acetonitril, dichlormethan, diethylether, ethanol, ethyl-acetát, chloroform, methanol, NaCl, pyridin, petrolether, triethylamin (Penta); 3-methoxybenzylamin HCl, 3-hydroxybenzylamin (připraveno v Oddělení chemické biologie a genetiky CRH); xylosa (SAFC); chlorid cíničitý, dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich).

Příprava suchého acetonitrilu byla provedena destilací nad hydridem vápenatým, příprava suchého methanolu byla provedena dle publikace (Bradley a kol., 2010): požadované množství rozpouštědla (20% m/v) bylo přidáno k aktivovanému molekulovému sítu (24 h, 300 °C) a sušeno pod chlorkalciovým uzávěrem po dobu 72 h.

### 6.2 Metody

Mikrovlnná syntéza byla provedena v mikrovlnném (MW) reaktoru Discover SP (CEM Corporation, USA) v uzavřeném systému. Reakční směsi byly zahřívány v dynamickém módu s následujícím nastavením – doba vyhřátí: 2,5 min, reakční doba: 30 až 120 min, výkon: 100/120 W, powermax: on.

Ke kontrole průběhu reakcí byla využita tenkovrstvená chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách potažených silikagelem 60 F<sub>254</sub> (Merck). Jako mobilní fáze byly použity směsi chloroform/methanol (9:1, 4:1 nebo 3:1) a petrolether:ethyl-acetát (2:1 nebo 1:1). K vizualizaci byla použita UV lampa Camag (254 nm). U většiny sloučenin byl využit barvicí roztok vanilinu (3,2 g vanilinu, 200 ml EtOH, 1 ml konc. kyseliny octové, 2 ml konc. kyseliny sírové) pro detekci cukerných složek a v některých případech roztok ninhydrinu (0,3 g ninhydrinu, 3 ml konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 ml *n*-butanolu) pro vizualizaci aminoskupin.

Za účelem purifikace připravených sloučenin byla použita sloupcová kapalinová chromatografie na silikagelu DAVISIL LC60A 40-63 Micron (Grace Davison Discovery Sciences, UK) za použití mobilních fází chloroform/ methanol, petrolether/ ethyl-acetát, petrolether/ ethyl-acetát/ methanol.

Čistota připravených látek byla ověřena vysokoúčinným kapalinovým chromatogramem (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. Vzorby byly rozpuštěny DMSO (1 mg/ml), naředěny (1000×) do počáteční mobilní fáze a naneseny na kolonu (10 μl). Separace probíhala

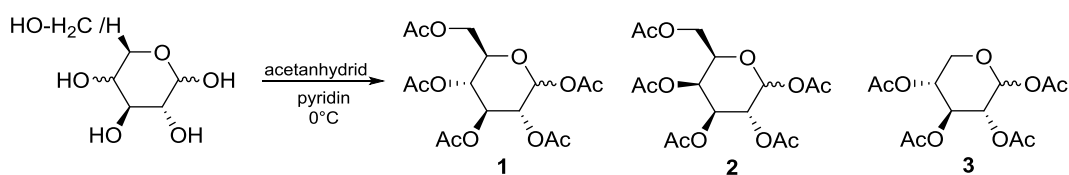
gradientovou elucí (0' – 90% A; 25' – 10% A; 35' – 10% A; 36' – 90% A; 45' – 10% A) o průtoku 0,25 ml/min. Mobilní fáze A byla tvořena 15mM mravenčanem amonným o pH 4,0, mobilní fázi B byl methanol. Analyty byly detekovány UV-VIS detektorem s diodovým polem (PDA 2996, Waters, UK) měřícím v rozmezí vlnových délek 210–400 nm. Molekulová hmotnost připravených sloučenin byla stanovena na hybridním hmotnostním spektrometru s analyzátozem doby letu QqTOF (Waters, UK). Eluát z HPLC byl veden 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+) módu a následující detekce ve FULLSCAN módu v rozsahu m/z 50-1000.

Připravené peracetylované sacharidy byly charakterizovány pomocí GC/MS analýzy. Byl použitý plynový chromatograf Thermo Scientific TRACE GC Ultra. Vzorky byly rozpuštěny v MeOH na koncentraci 1 mg/ml a naředěny do hexanu (1000×). Takto připravený vzorek o objemu 1 µl byl nastříknut na kolonu TRACE™ TR-1701 o rozměrech 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. Analýza probíhala za těchto podmínek: teplota injektoru 200 °C, splitless mode, teplotní gradient: 40 °C (1 min), 10 °C/min, 260 °C (5 min), teplota lineru 280 °C, průtok plynu (He) 1,2 ml/min. Eluenty byly dále analyzovány v hmotnostním spektrometru Polaris Q (Finnigan) s iontovou pastí a EI jako iontovým zdrojem s kolizním napětím 70 eV.

Hodnoty specifické optické otáčivosti byly naměřeny na Polarimetru polAAr 3001 (Optical Activity LTD, UK). Měřený vzorek byl naředěn methanolem na požadovanou koncentraci (viz Výsledky 6.1 Syntéza). Měření probíhalo při 25 °C a vlnové délce 589 nm. Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla měřena na spektrometru ECA-500 (Jeol, Japonsko) při frekvencích 500,16 MHz (<sup>1</sup>H) a 125,7 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>5</sub> (δ <sup>1</sup>H = 2,49 ppm) a DMSO-*d*<sub>6</sub> (δ <sup>13</sup>C = 39,5 ppm).

## 6.3 Syntéza

### 6.3.1 Peracetylace sacharidů (1-3)



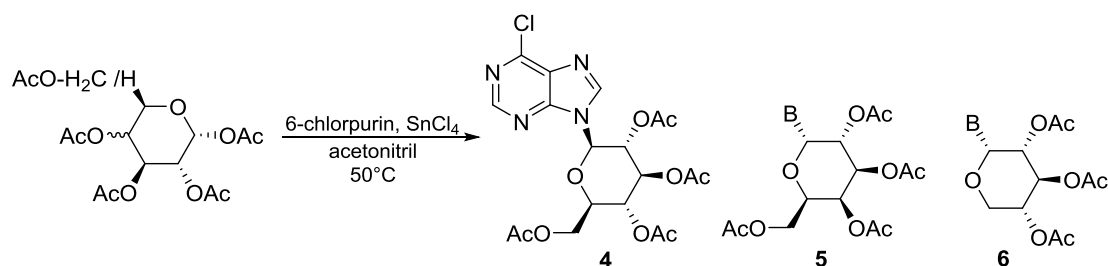
**Obr. 20. Příprava peracetylovaných sacharidů.** Reakce sacharidu s acetanhydridem v pyridinu. 1 - penta-*O*-acetyl-glukosa; 2 - penta-*O*-acetyl-galaktosa; 3 - tetra-*O*-acetyl-xylosa.

K suspenzi sacharidu (10 g) v pyridinu (62 ml) byl pod argonovou atmosférou za chlazení v ledové lázni přikapán acetanhydrid (8 ekv. v případě xylosy a 11 ekv. v případě glukosy a galaktosy). Výsledná reakční směs byla míchána 24 hodin za laboratorní teploty a poté nalita do ledové tříště (200 g).

Zpracování metoda A) po vzniku pevné látky. Pevná látka byla filtrována, promyta vychlazenou vodou (2× 50 ml) a vysušena v exsikátoru.

metoda B) po vzniku gelu. Vniklá směs byla extrahována do EtOAc (5× 100 ml). Spojené frakce promyty vodou (2× 75 ml), solankou (2× 100 ml). Filtrát byl po odpaření zkrystalizován za zchlazení ze směsi diethylether/ petrolether.

### 6.3.2 Příprava cukerných derivátů 6-chlorpurinu (4-6)



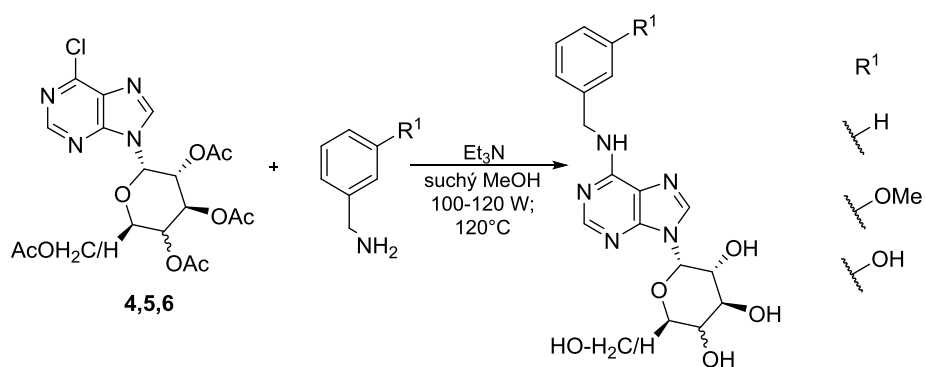
**Obr. 21. Příprava cukerných derivátů 6-chlorpurinu.** Reakce peracetylovaných sacharidů s 6-chlorpurinem katalyzované SnCl<sub>4</sub>. **4** - 6-chlorpurin-9-yl-tetra-O-acetyl-glukosid; **5** - 6-chlorpurin-9-yl-tetra-O-acetyl-galaktosid;

**6** - 6-chlorpurin-9-yl-tri-O-acetyl-xylosid.

K suspenzi **1-3** (800 mg) a 6-chlorpurinu (1,05 ekv.) v suchém acetonitrilu (10 ml) pod argonovou atmosférou byl za neustálého míchání přikapán SnCl<sub>4</sub> (2,1 ekv.). Reakce probíhala při 50 °C po dobu 24 hodin.

Zakoncentrovaná reakční směs byla rozdělena mezi EtOAc (50 ml) a sat. NaHCO<sub>3</sub> (20 ml). Vodní fáze byla re-extrahována EtOAc (2× 25 ml). Spojené organické fáze byly promyty sat. NaHCO<sub>3</sub> (2× 20 ml), vodou (2× 15 ml), vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zkoncentrovány za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol s gradientem methanolu.

### 6.3.3 Nukleofilní substituce 6-chlorpurinu (7-15)



N9-glukosid			N9-galaktosid			N9-xylosid		
BAP	mT	MeOmT	BAP	mT	MeOmT	BAP	mT	MeOmT
7	8	9	10	11	12	13	14	15

Obr. 22. Příprava cytokininových *N*-glykosidů nukleofilní substitucí v pozici C6.

Směs **4-6** (100 mg), benzylaminu/ 3-methoxybenzylaminu·HCl/ 3-hydroxybenzylaminu (1,5 ekv.) a Et<sub>3</sub>N (7 ekv., v případě hydrochloridu 8 ekv.) v suchém methanolu (1,4 ml) byly zahřívány v MW reaktoru za následujících podmínek: výkon 100 nebo 120 W, teplota 120°C, doba zahřátí 2,5 min, doba reakce 30-120 min v závislosti na použitém sacharidu. Reakční směs byla zahuštěna za sníženého tlaku a odparek purifikován pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol s gradientem methanolu. Případně rekrystalizován ze směsi MeOH/ DCM.

Látka **10** byla připravena zahříváním **5** (200 mg) v tlakové ampuli s benzylaminem (1,2 ekv.) a Et<sub>3</sub>N (2,5 ekv.) v suchém methanolu (2,75 ml) při 100 °C po dobu 4 h. Reakční směs byla zahuštěna za sníženého tlaku a odparek purifikován pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/ methanol s gradientem methanolu.

Látky v pevném skupenství byly získány po lyofilizaci z EtOH/H<sub>2</sub>O roztoků.

## 6.4 Biologické testování

### 6.4.1 Kompetiční ligand-vazebný test

Biologická aktivita **7-13**, **15** byla testována v kompetičním ligand-vazebném biotestu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z *Arabidopsis thaliana* dle přiložené publikace s drobnými modifikacemi (Romanov, 2005). Připravené látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny do finální koncentrace 20 μmol/l, jako standardy byly použity BAP, *meta*-topolin a *meta*-methoxytopolin v koncentracích 10 μmol/l. Látka **8** byla dále otestována na receptoru CRE1/AHK4 v koncentračním gradientu.

### 6.4.2 Testování cytotoxicity

Cytotoxicita připravených látek **7-9**, **11-13** byla testována *in vitro* na lidských buněčných liniích ARPE-19 (imortalizované buňky sítnicového epitelu,



ATCC® CRL-2302™), BJ (kožní fibroblasty BJ, ATCC® CRL-2522™), HaCaT (imortalizované kožní keratinocyty, RRID:CVCL\_0038) v 6 koncentracích s koncentračním maximem při 100 µmol/l. Po 72 h inkubace byl výsledek vyhodnocen pomocí resazurin redukční metody měřením fluorescence při vlnové délce  $\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ .

## 7 Výsledky a diskuse

Cílem této bakalářské práce byla příprava nových cukerných derivátů cytokininů odvozených od *N*<sup>6</sup>-benzylaminopurinu, *meta*-topolinu a *meta*-methoxytopolinu s navázanými sacharidovými jednotkami na dusíkový atom do polohy *N*9 ve formě glukosy, galaktosy nebo xylosy. Dalším cílem bylo najít optimální podmínky pro syntézu výše zmíněných látek a otestování jejich biologické aktivity.

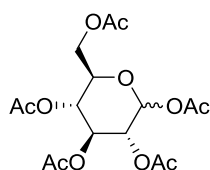
### 7.1 Syntéza

Pro přípravu *N*9 cytokininových glykosidů byla zvolena Vorbrüggenova glykosylace využívající jako donor cukerné jednotky peracetylované sacharidy a reakce je katalyzovaná pomocí Lewisovy kyseliny. Při přípravě peracetylovaných sacharidů byla použita metoda dle publikace (Zhang a Vasella, 2007), při které byl sacharid acetylován pomocí acetanhydridu v pyridinu, který sloužil zároveň jako rozpouštědlo i báze. V dané publikaci je popsána pouze peracetylace glukosy, avšak tato metoda byla v našem případě analogicky použita i pro galaktosu a xylosu. V případě xylosy byl použit menší nadbytek, odpovídající menšímu množství hydroxy skupin v molekule. Výtěžky reakcí se lišily na základě použitého sacharidu (Tab. 2). Největší úspěšnost byla zaznamenána u glukosy (95,1 %), zatímco podstatně nižší výtěžky byly dosaženy v případě galaktosy (44,4 %) a xylosy (49,2 %). Nízké výtěžky u galaktosy a xylosy byly způsobeny pokusem získání látek v pevném stavu při závěrečné krystalizaci z ethanolu. Po analýze výsledných produktů na GC/MS nebyly v hmotnostních spektrech přítomny molekulové píky, avšak byly viditelné jednotlivé fragmenty jejich molekul, které se shodovaly s daty v databázi NIST MS Search 2.0. Jelikož při syntéze byla použita jako výchozí látka racemická směs xylosy (D-(+)-xylosa), vznikla směs dvou neseparovatelných entantiomerů (**3**) v poměru 3:1  $\alpha$ : $\beta$ .

**Tab. 2: Výsledky fyzikálně-chemických vlastností látek 1-3.** GC – retenční čas na plynovém gromatografu,  $\alpha_D^{25}$  – optická otáčivost při 25 °C, (-) - netestováno.

Látka	Skupenství	Výtěžek [%]	GC - ret. čas [min]	$\alpha_D^{25}$ (°)
1	Pevná bílá látka	95,1	19,92	94,4
2	Pevná bílá látka	44,4	19,83	104,1
3	Pevná bílá látka	49,2	17,13	-

### Penta-O-acetyl-glukosa (1)



Pevná bílá látka, sumární vzorec:  $C_{16}H_{22}O_{11}$ , výtěžek (%): 95,1%.

GC retenční čas (min): 19.92.

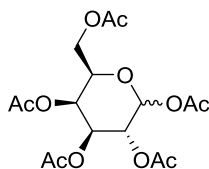
EI<sup>+</sup>-MS m/z (relativní intenzita, ion): 73,1, 81,1, 98,1, 114,9, 139,9, 156,7, 168,9, 171,9, 199,8.

$\alpha_D^{25}$  (°): 94,4 (c= 0,57 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 1,97 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 3,98-4,02 (m, 1H), 4,13-4,18 (m, 2H), 5,00 (dd, *J*= 3,7 Hz, 1H), 5,07(t, *J*= 9,8 Hz), 5,32 (t, *J*= 9,9 Hz, 1H), 6,16 (d, *J*= 3,7, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 20,29, 2× 20,34, 20,51, 20,65, 61,26, 67,36, 68,70, 2× 69,17, 88,23, 169,00, 169,15, 169,58, 169,68, 170,04.

### Penta-O-acetyl-galaktosa (2)



Pevná bílá látka, sumární vzorec:  $C_{16}H_{22}O_{11}$ , výtěžek (%): 44,4%.

GC retenční čas (min): 19,83.

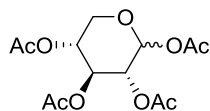
EI<sup>+</sup>-MS m/z (relativní intenzita, ion): 73,1, 81,0, 97,0, 98,8, 139,9, 156,9, 169,0, 198,9, 199,8.

$\alpha_D^{25}$  (°): 104,1 (c= 0,591 g/dl)

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

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 20,32, 20,36, 20,38, 20,51, 20,61, 61,10, 66,20, 66,75, 67,39, 68,38, 88,71, 169,10, 169,54, 169,83, 169,88, 169,95.

### Tetra-O-acetyl-xyloza (3)



Pevná bílá látka, sumární vzorec:  $C_{13}H_{18}O_9$ , výtěžek (%): 49,2%.

GC retenční čas (min): 17,13.

EI<sup>+</sup>-MS m/z (relativní intenzita, ion): 71,0, 85,9, 96,9, 138,9, 169,7.

NMR: dvě formy v poměru 3<sub>a</sub>:1<sub>b</sub>  $\alpha$ : $\beta$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm)<sub>a</sub>:** 1,98 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 3,64 (t, *J*= 11,0 Hz, 1H), 3,87 (dd, *J*= 11,2, 6,0 Hz, 1H), 4,97- 5,02 (m, 2H), 5,27-5,32 (m, 1H), 6,10 (d, *J*= 3,7 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm)<sub>a</sub>:** 20,32, 20,44, 20,53, 20,64, 59,99, 68,09, 68,74, 68,85, 88,52, 169,48, 169,57, 169,64, 169,70.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)**<sub>b</sub>: 1,98 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 3,66 (dd, *J*=11,6, 9,2 Hz, 1H), 3,98 (dd, *J*= 11,6, 4,9 Hz, 1H), 4,85-4,91 (m, 2H), 5,27-5,32 (m, 1H), 5,80 (d, *J*= 7,3, 1H).

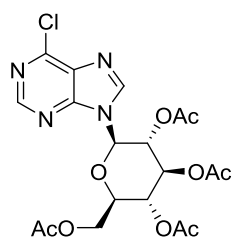
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)**<sub>b</sub>: 20,34, 20,40, 20,44, 20,53, 61,97, 68,09, 69,36, 70,55, 91,43, 168,89, 169,13, 169,48, 169,57.

Navazujícím krokem byla příprava *N*9-cukerných derivátů 6-chlorpurinu Vorbrüggenovou glykosylací katalyzovanou SnCl<sub>4</sub> dle (Hocek a kol., 2006). Při dodržení podmínek uvedených ve zmíněné publikaci u reakce 6-chlorpurinu s acetylovanou glukosou nedošlo po stanovené době k odreagování výchozí látky (monitorováno TLC). Skvrnu na TLC odpovídající 6-chlorpurinu nebylo možné vidět až po 4 dnech míchání za laboratorní teploty. Z tohoto důvodu byla zvýšena reakční teplota na 50 °C, díky které došlo k odreagování už po 24 hodinách. Ostatní glykosylace byly prováděny už při zvýšené teplotě. Po purifikaci pomocí sloupcové chromatografie byly látky v pevném skupenství získány krystalizací z EtOH. Největší výtěžky byly zaznamenány u derivátu galaktosy (58 %), zatímco nižší výtěžky byly u glukosy (34 %) a xylosy (42 %) (Tab. 3). Na základě HPLC analýzy byl u látky **6** pozorován vznik dvou anomerů s jednotlivými zastoupeními 28,2 % (α) a 55,7 % (β) z celkové hodnoty 84,2 %, což bylo potvrzeno na základě NMR analýzy. Vzniklé anomery nebylo možné sloupcovou chromatografií oddělit, tudíž byla **6** nasazena do dalšího kroku.

**Tab. 3: Výsledky fyzikálně-chemických vlastností látek 4-6.** HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, α<sub>D</sub><sup>20</sup> – optická otáčivost při 25 °C, (-) - netestováno.

Látka	Skupenství	Výtěžek [%]	HPLC [%]	α <sub>D</sub> <sup>25</sup> (°)
<b>4</b>	Pevná bílá látka	34,6	81,57	-9,1
<b>5</b>	Pevná bílá látka	57,8	75,42	22,9
<b>6</b>	Pevná bílá látka	42,7	84,21	-

#### 6-chlorpurin-9-yl-tetra-O-acetyl-glukosid (**4**)



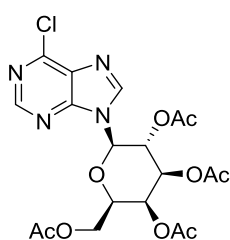
Pevná bílá, krystalická látka, sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>9</sub>, výtěžek: 34,6 %.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 484,1.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 19,85, 81,91.7.

α<sub>D</sub><sup>25</sup> (°): - 9,1 (c= 0,596 g/dl)

### 6-chlorpurin-9-yl-tetra-O-acetyl-galaktosid (5)



Pevní bílá, práškovitá látka, sumární vzorec:  $C_{19}H_{21}ClN_4O_9$ ,  
výtěžek 57,8 %.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 484,1.

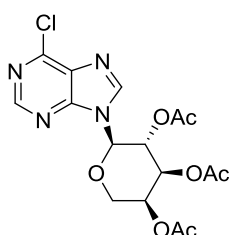
HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min, %): 19,55, 75,42.

$\alpha_D^{25}$  (°): 22,9 (c= 0,536 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 1,70 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,96 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 4,01 (dd, *J* = 11,6, 7,3 Hz, 1H), 4,13 (dd, *J* = 11,5, 5,3 Hz, 1H), 4,65 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 5,42 (dd, *J* = 3,4, 0,9 Hz, 1H), 5,56 (dd, *J* = 10,1, 3,4 Hz, 1H), 5,76 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H), 6,28 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,96 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 19,93, 20,35, 2× 20,49, 61,52, 67,13, 67,93, 70,28, 72,91, 80,36, 130,81, 145,66, 149,59, 151,62, 152,34, 169,10, 169,50, 169,94, 170,13.

### 6-chlorpurin-9-yl-tri-O-acetyl-xylosid (6)



Pevná bílá, krystalická látka, sumární vzorec  $C_{16}H_{17}ClN_4O_7$ ,  
výtěžek: 42,7%

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 412,01.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min, %): přítomny dva  
anomery-  $\alpha$ : 18,18, 28,25;  $\beta$ : 19,12, 55,76.

NMR: dvě formy v poměru 2<sub>a</sub>:1<sub>b</sub>  $\beta$ : $\alpha$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm)<sub>a</sub>:** 1,68 (s, 1H), 2,00 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 3,91 (t, *J* = 10,9 Hz, 1H), 4,07-4,10 (m, 1H), 5,14-5,19 (m, 1H), 5,60 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H), 5,81 (t, *J* = 9,2 Hz, 1H), 6,23 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 8,84 (s, 2H), 9,02 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm)<sub>a</sub>:** 19,87; 20,36; 20,52; 64,12; 67,97; 70,39; 71,67; 80,30; 130,69; 145,80; 149,50; 152,04; 152,26; 168,98; 169,56; 169,67.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm)<sub>b</sub>:** 2,01 (s, 1H); 2,12 (s, 3H); 2,18 (s, 3H); 4,17 (m, 1H); 4,30 (s, 1H); 4,80 (s, 1H); 5,01 (s, 1H); 5,25 (s, 1H); 6,34 (d, 1H); 8,73 (s, 2H); 8,87 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm)<sub>b</sub>:** 19,87; 20,36; 20,52; 65,10; 65,50; 65,60; 66,57; 78,90; 145,80; 151,60.

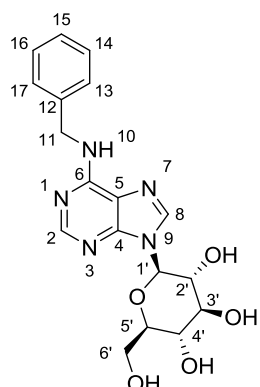
Finálním krokem přípravy *N*-glykosidů (Tab 4.) byla nukleofilní substituce v pozici C6, během které došlo ke kompletizaci molekuly. Reakce probíhaly s benzylaminem/ 3-methoxybenzylaminem·HCl/ 3-hydroxybenzylaminem (1,5 ekv.) v nadbytku

Et<sub>3</sub>N (7 nebo 8 ekv., v případě hydrochloridu). Pro rychlejší průběh reakcí bylo zvoleno zahřívání v MW reaktoru za následujících podmínek: výkon 100 nebo 120 W, teplota 120 °C, doba zahřátí 2,5 min. Při monitorování průběhu reakce pomocí TLC bylo zjištěno, že dochází k substituci v pozici C6 a zároveň k postupné deprotekcí acetylů (vznik polámějších skvrn na TLC). Z tohoto důvodu byla zvýšena reakční doba vedoucí k substituci a kompletní deprotekcí. Tato doba se lišila v závislosti na použitém sacharidu, kdy pro cytokininové *N*-glukosidy stačila doba reakce v rozmezí 30-60 minut, zatímco u *N*-galaktosidů a *N*-xylosidů byla zapotřebí reakční doba až 120 minut. Specifické podmínky byly použity pro přípravu BAP-*N*9-galaktosidu (**10**), kdy bylo použito BAP (1,2 ekv.) a Et<sub>3</sub>N (2,5 ekv.) v suchém methanolu (2,8 ml) v tlakové ampuli při 100 °C po dobu 4 h. Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 16 – 58 %.

**Tab. 4: Výsledky fyzikálně-chemických vlastností látek 7-15.** HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografie - retenční čas látky v minutách a její spektrofotometrická čistota (%), MS [M+H]<sup>+</sup> - hmotnostní spektrofotometrie – molekulový pík po ionizaci elektrosprejem, α<sub>D</sub><sup>25</sup> – optická otáčivost při 25 °C.

Látka	Sacharid	Substituent	HPLC [min, %]	MS [M+H] <sup>+</sup>	Výtěžek [%]	α <sub>D</sub> <sup>25</sup> (°)
7	<i>N</i> 9-glukosid	BnNH	17,20, 99,29	387,4	54,6	-14,8
8		3OHBnNH	13,90, 100	403,4	57,9	-13,2
9		3MeOBnNH	17,58, 98,81	417,4	35,2	-15,2
10	<i>N</i> 9-galaktosid	BnNH	16,45, 96,58	387,4	36,8	8,9
11		3OHBnNH	13,31, 100	403,1	21,3	1,2
12		3MeOBnNH	17,03, 94,3	417,1	42,1	-9,2
13	<i>N</i> 9-xylosid	BnNH	18,85, 95,67	357,1	21,1	-23,5
14		3OHBnNH	15,53, 100	373,3	36,8	-20,1
15		3MeOBnNH	15,02, 100	387,1	16,1	-18

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



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, výtěžek (%): 54,6.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,20, 99,29.

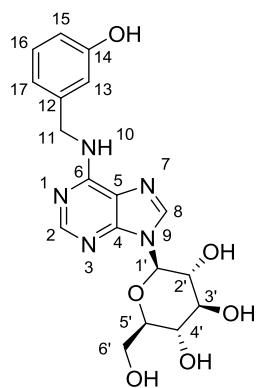
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 387,4.

$\alpha_D^{25}$  (°): - 14,8 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,22-3,25 (m, 1H, -H<sup>4'</sup>), 3,34-3,44 (m, 3H, -H<sup>3'</sup>, -H<sup>5'</sup>, -H<sup>6'</sup>), 3,69 (dd, *J* = 10,9, 5,7 Hz, 1H, -H<sup>6'</sup>), 3,99-4,00 (m, 1H, -H<sup>2'</sup>), 4,57 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, -OH<sup>6'</sup>), 4,70 (s, 2H, -H<sup>11</sup>), 5,14 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH<sup>4'</sup>), 5,27 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H, -OH<sup>3'</sup>), 5,32 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH<sup>2'</sup>), 5,39 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H<sup>1'</sup>), 7,19 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, -H<sup>15</sup>), 7,27 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, -H<sup>14</sup>, -H<sup>16</sup>), 7,32 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>17</sup>), 8,20 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,34 (bs, 2H, -H<sup>8</sup>, H<sup>11</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 42,8 (C<sup>11</sup>), 60,9 (C<sup>6'</sup>), 69,7 (C<sup>4'</sup>), 71,2 (C<sup>2'</sup>), 77,2 (C<sup>3'</sup>), 80,0 (C<sup>5'</sup>), 82,8 (C<sup>1'</sup>), 119,1 (C<sup>5</sup>), 126,5 (C<sup>15</sup>), 127,0 (C<sup>14</sup>, C<sup>16</sup>), 128,2 (C<sup>13</sup>, C<sup>17</sup>), 139,7 (C<sup>8</sup>), 140,1 (C<sup>12</sup>), 149,2 (C<sup>4</sup>), 152,5 (C<sup>2</sup>), 154,3 (C<sup>6</sup>).

**(3R,4S,5S,6R)-2-{6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (8)**



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, výtěžek (%): 57,9.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,90, 100.

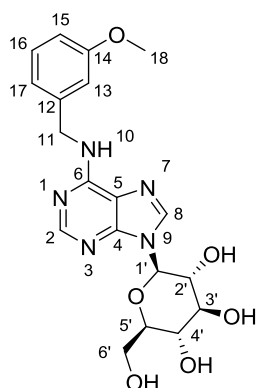
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 403,4.

$\alpha_D^{25}$  (°): - 13,2 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,22-3,25 (m, 1H, -H<sup>4'</sup>), 3,31-3,42 (m, 3H, -H<sup>3'</sup>, -H<sup>5'</sup>, -H<sup>6'</sup>), 3,67-3,70 (m, 1H, -H<sup>6'</sup>), 4,00-4,01 (m, 1H, -H<sup>2'</sup>), 4,57-4,62 (m, 3H, -OH<sup>6'</sup>, -H<sup>11</sup>), 5,14 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH<sup>4'</sup>), 5,28 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H, -OH<sup>3'</sup>), 5,33 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH<sup>2'</sup>), 5,40 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H<sup>1'</sup>), 6,57 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H<sup>15</sup>), 6,70 (s, 1H, -H<sup>13</sup>), 6,72 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H<sup>17</sup>), 7,06 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H<sup>16</sup>), 8,20 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,30 (s, 1H, -H<sup>10</sup>), 8,34 (s, 1H, -H<sup>8</sup>), 9,25 (s, 1H, -OH<sup>14</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 42,7 (C<sup>11</sup>), 60,9 (C<sup>6'</sup>), 69,8 (C<sup>4'</sup>), 71,2 (C<sup>2'</sup>), 77,2 (C<sup>3'</sup>), 80,0 (C<sup>5'</sup>), 82,8 (C<sup>1'</sup>), 113,5 (C<sup>15</sup>), 113,6 (C<sup>13</sup>), 117,6 (C<sup>17</sup>), 119,0 (C<sup>5</sup>), 129,1 (C<sup>16</sup>), 139,7 (C<sup>8</sup>), 141,5 (C<sup>12</sup>), 149,2 (C<sup>4</sup>), 152,5 (C<sup>17</sup>), 154,4 (C<sup>6</sup>), 157,3 (C<sup>14</sup>).

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



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, výtěžek (%): 35,3.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,58, 98,81.

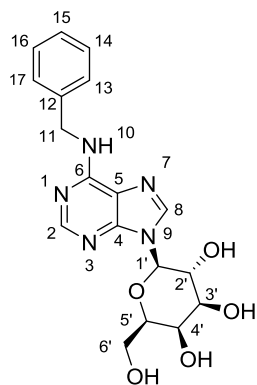
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 417,4.

$\alpha_D^{25}$  (°): - 15,2 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,20-3,24 (m, 1H, -H<sup>4'</sup>), 3,30-3,37 (m, 2H, -H<sup>3'</sup>, -H<sup>5'</sup>), 3,38-3,42 (m, 1H, -H<sup>6'</sup>), 3,67-3,72 (m, 4H, -H<sup>6'</sup>, -H<sup>18</sup>), 4,00 (bs, 1H, -H<sup>2'</sup>), 4,56 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, -OH<sup>6'</sup>), 4,67 (bs, 2H, -H<sup>11</sup>), 5,12 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, -OH<sup>4'</sup>), 5,26 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, -OH<sup>3'</sup>), 5,31 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH<sup>2'</sup>), 5,39 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H, -H<sup>1'</sup>), 6,76-6,77 (m, 1H, -H<sup>15</sup>), 6,88-6,89 (m, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>17</sup>), 7,19 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H<sup>16</sup>), 8,20 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,34 (s, 2H, -H<sup>8</sup>, -H<sup>10</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 42,8 (C<sup>11</sup>), 54,9 (C<sup>18</sup>), 60,9 (C<sup>6'</sup>), 69,7 (C<sup>4'</sup>), 71,2 (C<sup>2'</sup>), 77,2 (C<sup>3'</sup>), 80,0 (C<sup>5'</sup>), 82,8 (C<sup>1'</sup>), 111,7 (C<sup>15</sup>), 112,8 (C<sup>13</sup>), 119,0 (C<sup>5</sup>), 119,2 (C<sup>17</sup>), 129,2 (C<sup>16</sup>), 139,7 (C<sup>8</sup>), 141,7 (C<sup>12</sup>), 149,2 (C<sup>4</sup>), 152,5 (C<sup>2</sup>), 154,3 (C<sup>6</sup>), 159,2 (C<sup>14</sup>).

**(3R,4S,5R,6R)-2-[6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl]-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (10)**



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, výtěžek (%): 36,8.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 16,45, 96,58.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 387,4.

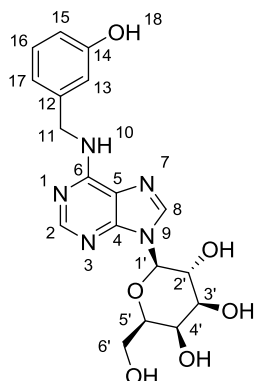
$\alpha_D^{25}$  (°): 8,9 (c= 0,615 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,44-3,48 (m, 1H, -H<sup>6'</sup>), 3,52-3,56 (m, 2H, -H<sup>3'</sup>, -H<sup>6'</sup>), 3,66 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, -H<sup>5'</sup>), 3,76-3,78 (m, 1H, -H<sup>4'</sup>), 4,16-4,20 (m, 1H, -H<sup>2'</sup>), 4,55-4,57 (m, 1H, -OH<sup>5'</sup>), 4,63-4,71 (m, *J* = 9,9 Hz, 2H, -H<sup>11</sup>; 1H, -OH<sup>6'</sup>), 4,96-4,98 (m, 1H, -OH<sup>3'</sup>), 5,17-5,19 (m, 1H, -OH<sup>2'</sup>), 5,38 (dd, *J* = 9,3, 3,5 Hz, 1H, -H<sup>1'</sup>), 7,17-7,21 (m, 1H, -H<sup>15</sup>), 7,26-7,29 (m, 2H, -H<sup>14</sup>, H<sup>16</sup>), 7,32 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>17</sup>), 8,19 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,27-8,30 (m, 2H, -H<sup>10</sup>, -H<sup>8</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 43,3 (C<sup>11</sup>), 60,9 (C<sup>6'</sup>), 69,1 (C<sup>4'</sup>), 69,4 (C<sup>2'</sup>), 74,4 (C<sup>3'</sup>), 78,9 (C<sup>5'</sup>), 83,3 (C<sup>1'</sup>), 119,3 (C<sup>5</sup>), 127,1 (C<sup>15</sup>), 127,58 (C<sup>14</sup>, C<sup>16</sup>), 128,7 (C<sup>13</sup>, C<sup>17</sup>), 139,7 (C<sup>8</sup>), 140,6 (C<sup>12</sup>), 149,7 (C<sup>4</sup>), 153,0 (C<sup>2</sup>), 154,8 (C<sup>6</sup>).



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



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, výtěžek (%): 21,3.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 13,32, 100.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 403,1

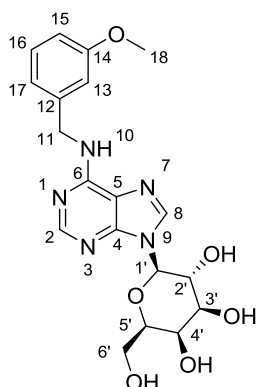
$\alpha_D^{25}$  (°): - 9,2 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,47-3,47p (m, 1H, -H<sup>6</sup>), 3,51-3,53 (m, 2H, -H<sup>3</sup>, -H<sup>6</sup>), 3,67 (t, 1H, -H<sup>5</sup>), 3,77-3,78 (m, 1H, H<sup>4</sup>), 4,16-4,21 (m, 1H, C<sup>2</sup>), 4,55 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH<sup>4</sup>), 4,65 (t, *J* = 5,5 Hz, 3H; 2H, -H<sup>11</sup>; 1H, -OH<sup>6</sup>), 4,97 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H,

-OH<sup>3</sup>), 5,18(d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH<sup>2</sup>), 5,39 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H<sup>1</sup>), 6,57 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H<sup>17</sup>), 6,71-6,74 (m, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>15</sup>), 7,06 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, -H<sup>16</sup>), 8,19 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,25-8,28 (m, 2H, -H<sup>8</sup>, -H<sup>10</sup>), 9,23 (s, 1H, -OH<sup>18</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 42,6 (C<sup>11</sup>), 60,4 (C<sup>6</sup>), 68,6(C<sup>4</sup>), 68,9 (C<sup>2</sup>), 73,9 (C<sup>3</sup>), 78,4 (C<sup>5</sup>), 82,8 (C<sup>1</sup>), 113,5 (C<sup>17</sup>), 113,6 (C<sup>13</sup>), 117,6 (C<sup>15</sup>), 118,8 (C<sup>5</sup>), 129,1 (C<sup>16</sup>), 139,2 (C<sup>8</sup>), 141,5 (C<sup>12</sup>), 149,3 (C<sup>4</sup>), 152,6 (C<sup>2</sup>), 154,4 (C<sup>6</sup>), 157,3 (C<sup>14</sup>).

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



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, výtěžek (%): 42,1.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 17,03; 94,3.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 418,7.

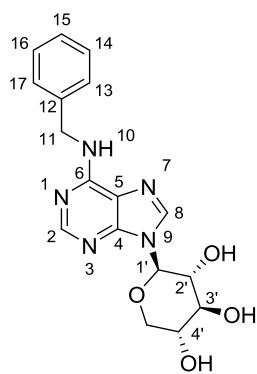
$\alpha_D^{25}$  (°): 1,2 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,43-3,48 (m, 1H, -H<sup>6</sup>), 3,50-3,56 (m, 2H, -H<sup>3</sup>, -H<sup>6</sup>), 3,65-3,68 (m, 1H, -H<sup>5</sup>), 3,69 (s, 3H, -H<sup>18</sup>), 3,76-3,77 (m, 1H, -H<sup>4</sup>), 4,16-4,20 (m, 1H, -H<sup>2</sup>), 4,57 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH<sup>4</sup>), 4,63-4,71 (m, 3H, -OH<sup>6</sup>, -H<sup>11</sup>), 5,01 (d,

*J* = 5,5 Hz, 1H, -OH<sup>3</sup>), 5,20 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH<sup>2</sup>), 5,38 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, -H<sup>1</sup>), 6,77 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, -H<sup>15</sup>), 6,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>17</sup>), 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, -H<sup>16</sup>), 8,20 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,29 (s, 1H, -H<sup>8</sup>), 8,33 (bs, 1H, -H<sup>10</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 42,8 (C<sup>11</sup>), 54,9 (C<sup>18</sup>), 60,4 (C<sup>6</sup>), 68,6 (C<sup>5</sup>), 68,9 (C<sup>2</sup>), 73,9 (C<sup>3</sup>), 78,4 (C<sup>5</sup>), 82,8 (C<sup>1</sup>), 111,8 (C<sup>15</sup>), 112,8 (C<sup>13</sup>), 118,8 (C<sup>5</sup>), 119,2 (C<sup>17</sup>), 129,2 (C<sup>16</sup>), 139,2 (C<sup>8</sup>), 141,7 (C<sup>12</sup>), 149,3 (C<sup>4</sup>), 152,5 (C<sup>2</sup>), 154,3 (C<sup>6</sup>), 159,2 (C<sup>14</sup>).

**(3R,4S,5R,6R)-2-{6-[benzylamino]-9H-purin-9-yl}-6-(hydroxybenzyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (13)**



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, výtěžek (%): 95,7.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 18,85, 95,67.

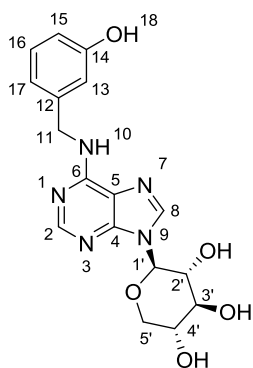
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 357,1

$\alpha_D^{25}$  (°): -23,5 (c= 0,285 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,28-3,35 ((m, 2H, -H<sup>3'</sup>, -H<sup>5'</sup>), 3,7-3,75 (m, 1H, -H<sup>5'</sup>), 4,00 (bs, 1H, -H<sup>2'</sup>), 4,62 (bs, 2H, -H<sup>11</sup>), 5,17 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H, -OH<sup>4'</sup>), 5,29-5,35 (m, 3H, -H<sup>1'</sup>, -OH<sup>2'</sup>, -OH<sup>3'</sup>), 6,7 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, -H<sup>15</sup>), 7,07 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, -H<sup>14</sup>, -H<sup>16</sup>), 7,2 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>17</sup>) 8,19 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,32 (s, 2H, -H<sup>8</sup>, -H<sup>11</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 43,19 (C<sup>11</sup>), 68,6 (C<sup>5'</sup>), 69,7 (C<sup>2'</sup>), 71,42 (C<sup>4'</sup>), 77,5 (C<sup>3'</sup>), 84,0 (C<sup>1'</sup>), 113,7 (C<sup>17</sup>), 114,4 (C<sup>13</sup>), 118,52 (C<sup>15</sup>), 119,5 (C<sup>5</sup>), 129,6 (C<sup>16</sup>), 140,01 (C<sup>8</sup>), 142,15 (C<sup>12</sup>), 149,6 (C<sup>4</sup>), 1528 (C<sup>2</sup>), 154,8 (C<sup>6</sup>), 158,08 (C<sup>14</sup>).

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



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, výtěžek (%): 89,6.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 15,53, 100.

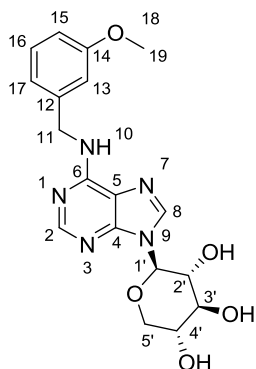
ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 373,3.

$\alpha_D^{25}$  (°): -20,1 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,27-3,35 (m, 2H, -H<sup>3'</sup>, -H<sup>5'</sup>), 3,46-3,50 (m, 1H, -H<sup>4'</sup>), 3,80-3,84 (m, 1H, -H<sup>5'</sup>), 4,00 (bs, 1H, -H<sup>2'</sup>), 4,62 (bs, 2H, -H<sup>11</sup>), 5,17 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H, -OH<sup>4'</sup>), 5,30-5,35 (m, 3H, -H<sup>1'</sup>, -OH<sup>2'</sup>, -OH<sup>3'</sup>), 6,57 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, -H<sup>15</sup>), 6,71-6,73 (m, 2H, -H<sup>13</sup>, -H<sup>17</sup>), 7,05 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, -H<sup>16</sup>), 8,19 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,29 (d, *J* = 13,1 Hz, 2H, -H<sup>8</sup>, -H<sup>10</sup>), 9,26 (s, 1H, -OH<sup>18</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 43,25 (C<sup>11</sup>), 68,9 (C<sup>5'</sup>), 69,77 (C<sup>2'</sup>), 71,54 (C<sup>4'</sup>), 77,9 (C<sup>3'</sup>), 84,1 (C<sup>1'</sup>), 114,0 (C<sup>17</sup>), 114,2 (C<sup>13</sup>), 118,1 (C<sup>15</sup>), 119,5 (C<sup>5</sup>), 129,6 (C<sup>16</sup>), 140,1 (C<sup>8</sup>), 142,0 (C<sup>12</sup>), 149,6 (C<sup>4</sup>), 153,0 (C<sup>2</sup>), 154,8 (C<sup>6</sup>), 157,8 (C<sup>14</sup>).

**(3*R*,4*S*,5*R*)-2-{6-[(3-methoxybenzyl)amino]-9*H*-purin-9-yl}tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (15)**



Pevná bílá látka, sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, výtěžek (%): 16,1.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min; %): 15,02, 100.

ESI<sup>+</sup>-MS *m/z* relativní intenzita, ion (%), [M+H]<sup>+</sup>: 387,1.

$\alpha_D^{25}$  (°): - 18,0 (c= 0,25 g/dl)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3,29-3,34 (m, 2H, -H<sup>3'</sup>,

-H<sup>5'</sup>), 3,45-3,50 (m, 1H, -H<sup>4'</sup>), 3,69 (s, 3H, -H<sup>18</sup>), 3,82

(dd, *J* = 11,0; 5,2 Hz, 1H, -H<sup>5'</sup>), 4,00 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, -H<sup>2'</sup>),

4,66 (s, 2H, -H<sup>11'</sup>), 5,16 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH<sup>4'</sup>), 5,29

(d, *J* = 4,8 Hz, 1H, -OH<sup>3'</sup>), 5,31-5,34 (m, 2H, -H<sup>1'</sup>, -OH<sup>2'</sup>), 6,76 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, -H<sup>17</sup>),

6,89 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, -H<sup>15</sup>), 6,90 (s, 1H, -H<sup>13</sup>), 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, -H<sup>16</sup>),

8,19 (s, 1H, -H<sup>2</sup>), 8,32 (s, 2H, -H<sup>8</sup>, -H<sup>10</sup>).

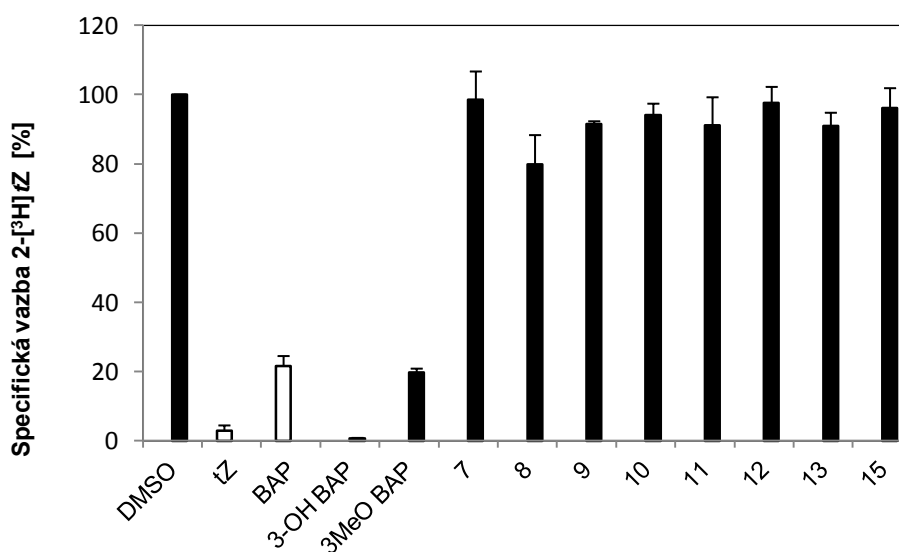
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 42,8 (C<sup>11</sup>), 54,9 (C<sup>18</sup>), 68,4 (C<sup>5'</sup>), 69,2 (C<sup>4'</sup>),

71,0 (C<sup>2'</sup>), 77,3 (C<sup>3'</sup>), 83,6 (C<sup>1'</sup>), 111,8 (C<sup>17</sup>), 112,9 (C<sup>13</sup>), 119,1 (C<sup>15</sup>), 119,3 (C<sup>5</sup>),

129,3 (C<sup>16</sup>), 139,7 (C<sup>8</sup>), 141,7 (C<sup>12</sup>), 149,1 (C<sup>4</sup>), 152,5 (C<sup>2</sup>), 154,3 (C<sup>6</sup>), 159,2 (C<sup>14</sup>).

## 7.2 Testy biologické aktivity

Biologická aktivita vybraných cukerných derivátů byla zkoumána v kompetičním ligand-vazebném testu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z *Arabidopsis thaliana*, na základě publikace s drobnými modifikacemi (Romanov, 2006). Podstatou tohoto testu je soupeření o vazebné místo na receptoru mezi 2-[<sup>3</sup>H]tZ a testovanou látkou. Další výhodou tohoto testu je to, že probíhá *in vitro*, a kultivace s danou látkou probíhá po dobu 30 minut při 4 °C. Za těchto podmínek se předpokládá omezení veškeré enzymatické aktivity i metabolických přeměn testované látky. Na základě těchto vlastností by měla být pozorována přímá interakce látky s receptorem. Připravené látky byly testované v koncentraci 20 μmol/l, pozitivní kontrolou byly odpovídající volné báze BAP, *meta*-topolin, *meta*-methoxytopolin v koncentraci 10 μmol/l. Žádná z testovaných látek **7-13**, **15** nebyla na receptoru AHK3 schopna vytlačit z vazebného místa 2-[<sup>3</sup>H]tZ (Obr. 23). Nejvyšší afinitu vykazovala **8** s hodnotou residuální radioaktivity 80 %, zatímco hodnota korespondující volné báze *meta*-topolin byla téměř nulová.

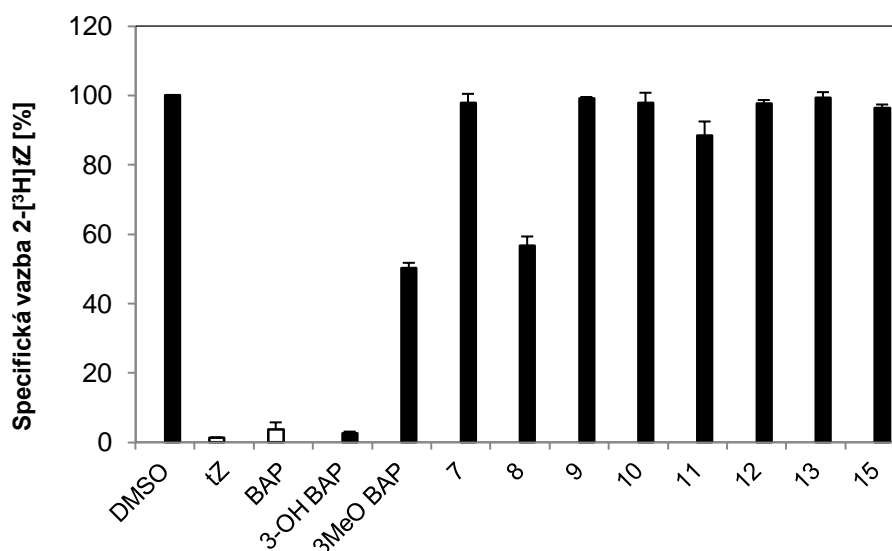


**Obr. 23:** Kompetiční (ligand-vazebný) test na cytokininovém receptoru AHK3 exprimovaném transformovaným kmenem *E. coli*. Připravené látky byly testované v koncentraci 20 μmol/l, jako standardy byly použity BAP, 3-OH BAP a 3MeO BAP v koncentraci 10 μmol/l. Pro rozlišení mezi nespecifickou a specifickou vazbou byl použit při kompetici neznačený tZ (10 μmol/l), získaná hodnota byla odečtená od naměřených dat.

Obdobné výsledky byly pozorovány na receptoru CRE1/AHK4, kde většina látek byla opět neaktivní s výjimkou **8**, jejíž afinita byla u tohoto receptoru vyšší než v předchozím případě (56,6 %). Vysoká afinita látky **8** na obou receptorech může být způsobena tím, že je odvozena od *meta*-topolinu. Bohužel v žádné publikaci nebyla nalezena zmínka o afinitě *meta*-topolinu vůči cytokininovým receptorům z *A. thaliana*, ale v *ARR5::GUS*

testu vykazoval ze zkoumaných aromatických cytokininů nejvyšší aktivitu (Spíchal, 2004). Na druhou stranu byla v tomto testu měřena aktivita *tZ9G* a v porovnání s volným *trans*-zeatinem vedla glukosylace v pozici *N9* ke ztrátě aktivity.

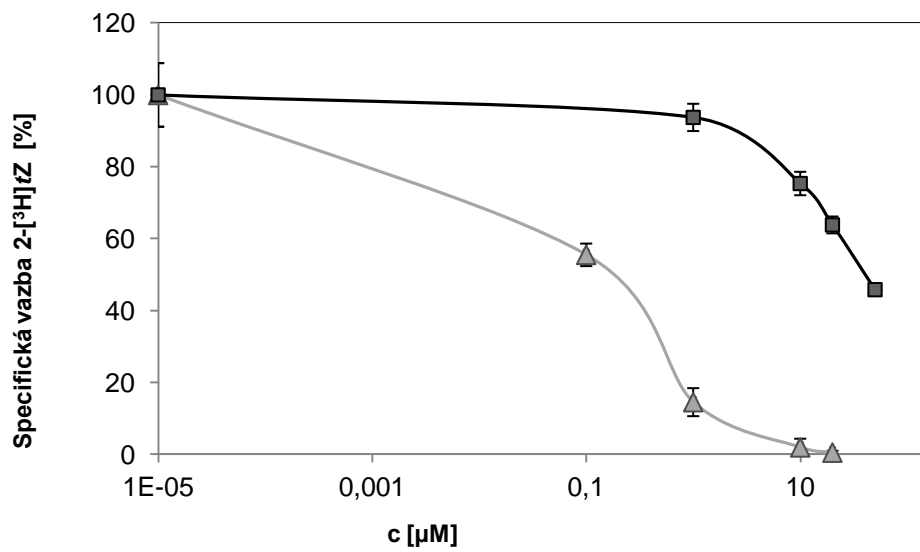
Vzhledem k rozdílnosti testů je obtížné srovnávat jejich výsledky. V *ARR5::GUS* testu dochází k vazbě na receptor a následně jeho aktivaci, na rozdíl u kompetičního ligand-vazebného testu dochází pouze k vazbě na receptor a není tedy patrné, jestli dochází i k jeho aktivaci.



**Obr. 24: Kompetiční (ligand-vazebný) test na cytokininovém receptoru CRE1/AHK4 exprimovaném transformovaným kmenem *E. coli*.** Připravené látky byly testovány v koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$ , jako standardy byly použity BAP, 3-OH BAP a 3MeO BAP v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ . Pro rozlišení mezi nespecifickou a specifickou vazbou byl použit při kompetici neznačený *tZ* (10  $\mu\text{mol/l}$ ), získaná hodnota byla odečtená od naměřených dat.

Jelikož látka **8** vykazovala na receptoru CRE1/AHK4 afinitu bylo provedeno měření v koncentrační závislosti. Bylo zjištěno, že od koncentrace 1  $\mu\text{mol/l}$  látka **8** vykazovala schopnost interagovat s receptorem a vytlačit 2-[<sup>3</sup>H]tZ. Na základě těchto výsledků by bylo do budoucna zajímavé zjistit, zda je **8** také schopna prostřednictvím tohoto receptoru aktivovat cytokininovou signální dráhu.

Látky **7-9**, **12-14** byly také testovány na vybraných nenádorových lidských buněčných liniích HaCaT, BJ a ARPE-19, kde byla zkomána jejich cytotoxicita. Na žádné z buněčných linií nevykazovaly látky cytotoxicitu ani v nejvyšší testované koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ . Vzhledem k povaze látek je otázkou, jestli byly schopné proniknout do buněk, kde by se mohl projevit jejich reálný cytotoxický efekt.



Obr. 25 Kompetiční (ligand-vazebný) test látky č. 8 s koncentračním gradientem na recetoru CRE1/AHK4. Datová řada označená trojúhelníkem – *meta*-topolin, čtvercem – látka č. 8.

## 8 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala syntézou a biologickou aktivitou cukerných derivátů cytokininů odvozených od *N*<sup>6</sup>-benzyladeninu, *meta*-topolinu a *meta*-methoxytopolinu. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na cytokininy, jejich metabolismus, transport, signální dráhu a metodologii chemické glykosylace purinů.

V experimentální části byli pomocí Vorbrüggenovy glykosylace připraveny nové cukerné deriváty aromatických cytokininů, odvozených od *N*<sup>6</sup>-benzyladeninu, *meta*-topolinu a *meta*-methoxytopolinu s navázanou sacharidovou jednotkou ve formě  $\beta$ -D-glukosy,  $\beta$ -D-galaktosy nebo  $\beta$ -D-xylosy na dusíkový atom purinového heterocyklu v poloze *N*9. Celkově bylo připraveno 15 látek, šest intermediátů a devět finálních produktů. Připravené látky byly charakterizovány dostupnými fyzikálně-chemickými metodami.

Biologická aktivita cytokininových *N*9-glykosidů **7-15** byla testována v kompetičním ligand-vazebném biotestu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4 z *A. thaliana*. Z testovaných látek na obou receptorech vykazovala afinitu pouze látka **8**, přičemž na receptoru AHK3 byla pozorována pouze nepatrná afinita (80 % residuální radioaktivity), zatímco výraznější vazby bylo dosaženo na receptoru CRE1/AHK4 (56 %).

U připravených látek byla dále na lidských nenádorových buněčných liniích (BJ, HaCaT, ARPE-19) testována jejich cytotoxicita. Žádná ze sloučenin nevykazovala cytotoxický efekt ani v nejvyšší testované koncentraci 100  $\mu$ mol/l.

## 9 Seznam použité literatury

- Anantharaman V. a Aravind L. (2001) The chase domain: A predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 579-582.
- Astot C., Doležal K., Nordstrom A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H. a Sandberg G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14778-14783.
- Bajguz A. a Piotrowska A. (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry.* **70**, 957-969.
- Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F. C. a Rattan S. I. S. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett.* **393**, 197-200.
- Bassil N. V., Mok D. W. S. a Mok M. C. (1993) Partial-purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **102**, 867-872.
- Bradley D., Williams G. a Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J. a Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a  $\beta$ -glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science.* **262**, 1051-1054.
- Cowley D. E., Duke C. C., Liepa A. J., Macleod J. K., Letham D. S. (1978) The structure and synthesis of cytokinin metabolites. The 7- and 9- $\beta$ -D-guocofuranosides and pyranosides of zeatin and 6-benzylaminopurine. *Aust. J. Chem.* **31**, 1095 – 1111.
- Davoll J., Lythgoe B., Todd A.R. (1948) Experiments on the synthesis of purine nucleosides. A synthesis of adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* 967-969.
- Demchenko A. V. (2008) General aspects of the glycosydic bond formation. *In Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance* (Ed. Demchenko A. V.), pp. 1-27, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, GE.
- Devine S., Scammells P. J. (2008) An efficient convergent synthesis of adenosine-5'-*N*-alkyluronamides, *Tetrahedron.* **64**, 1772 – 1777.
- Downey A. M., Richter C., Pohl R., Mahrwald R. a Hocek M. (2015) Direct one-pot synthesis of nucleosides from unprotected or 5-O-monoprotected D-ribose. *Org. Lett.* **17**, 4604-7.



- Duke C. C., Liepa A. J., MacLeod J. K., Letham D. S., Parker C.W. (1975) Synthesis of Raphanatin and its 6-benzylaminopurine analogue, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **24**, 964-965.
- Ernst D., Schafer W. a Oesterhelt D. (1983) Isolation and identification of a new, naturally-occurring cytokinin (6-benzylaminopurineriboside) from an anise cell-culture (*Pimpinella-anisum L.*). *Planta.* **159**, 222-225.
- Fischer E. a Helferich B. (1914) Synthetische glucoside der purine. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* **47**.
- Frébort I., Kowalska M., Hluška T., Frébortová J. a Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T. a Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: Preference for quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121-130.
- Frébortová J., Novák O., Frébort I. a Jorda R. (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *Plant J.* **61**, 467-481.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M, Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 450-461.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Kollmer I., Schmölling T. a Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/ dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum L.* *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255-267.
- Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N. a Ong E. S. (2005) Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera L.*) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chrom. B.* **829**, 26-34.
- Heyl A. a Schmölling T. (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Plant Biol.* **6**, 480-488.
- Hluska T., Šebela M., Lenobel R., Frébort I. a Galuszka P. (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin *cis-trans* isomerase in plants. *Front. Plant Sci.*, **8**.
- Hocek M., Šilhár P., Shih I. H., Mabery E. a Mackman R. (2006) Cytostatic and antiviral 6-aryl-purine ribonucleosides. Synthesis and evaluation of 6-substituted purine *L*-ribonucleosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5290-3.

- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G. a Wareing P. F. (1973) New cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Lett.* 2827-2828.
- Hothorn M., Dabi T. a Chory J. (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* Histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 766-768.
- Hou B. K., Lim E. K., Higgins G. S. a Bowles D. J. (2004) N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822-47832.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. a Kakimoto T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Jin S. H., Ma X. M., Kojima M., Sakakibara H., Wang Y. W. a Hou B. K. (2013) Overexpression of glucosyltransferase ugt85a1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through o-glucosylation. *Planta*. **237**, 991-999.
- Jiskrová E., Novák O., Pospíšilová H., Holubová K., Karady M., Galuszka P., Robert S. and Frébort I. (2016) Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. *N. Biotechnol.***33**, 735-742.
- Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate : ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant. Cell Physiol.* **42**, 677-685.
- Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* **116**, 233-239.
- Kazimierczuk Z. C., H. B.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. J. (1984) Synthesis of 2'-deoxytubercidin, 2'-deoxyadenosine, and related 2'-deoxynucleosides via a novel direct stereospecific sodium salt glycosylation procedure. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6379-6382.
- Knypl J. S., Letham D. S. a Palni L. M. S. (1985) Cytokinins in maturing and germinating lupinus-luteus l seeds. *Biol. Plant.* **27**, 188-194.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H. and Kyojuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature.* **445**, 652-655.
- Leon F. Christensen, Arthur D. Broom, Morris J. Robins, Bloch A. (1972) Synthesis and biological activity of selected 2,6-disubstituted(2-deoxy- $\alpha$ - and  $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)purines. *J. Med. Chem.*, **15**, 735–739.
- Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from zea-mays. *Life Sci.* 569-573.
- Letham D. S. a Palni L. M. S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **34**, 163-197.

- Letham D. S., Shannon J. S. a McDonald I. R. (1964) Structure of zeatin factor inducing cell division. *Proc. Chem. Soc.* 230-&.
- Letham D. S., Wilson M. M., Parker C. W., Jenkins I. D., Macleod J. K. and Summons R. E. (1975) Regulators of cell division in plant tissues XXIII. The identity of an unusual metabolite of 6-benzylaminopurine. *Biochim. Biophys. Acta* **399**, 61-70.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K. D., Fraaije M. W. a Mattevi A. (2004) Structures of michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: Implications for flavoenzyme catalysis. *J. Mol. Biol.* **341**, 1237-1249.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Vonsaltza M. H. a Strong F. M. (1955a) Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2662-2663.
- Miller C. O., Skoog F., Vonsaltza M. H. a Strong F. M. (1955b) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1392.
- Miyaki M. a Shimizu B. (1970) N-!N alkyl and glycosyl migration of purines and pyrimidines. *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 1446-+.
- Mok D. W. S. a Mok M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89-118.
- Mougel C. a Zhulin I. B. (2001) Chase: An extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 582-584.
- Montgomery A., Hewson K. (1969), Nucleosides of 2-fluoradenine. *J. Med. Chem.*, **12**, 498–504
- Nikolaus N.V, Božilović J., Engels J. W. (2007) Microwave-assisted Ribosylation of modified heterocyclic bases by Vorbrüggen method. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* **26**, 889-892.
- Qu G., Liu Q. (2005) Solvent-free synthesis of 2, 3, 5-tri-O-acetyl-2,6-dichloropurine nucleoside catalyzed by *p*-toluenesulfonic acid using microwave. *Indian J. Chem.*, **44**, 196.
- Pačes V., Werstiuk E. a Hall R. H. (1971) Conversion of *N*-6-( $\Delta$ -2-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in *tobacco* tissue. *Plant Physiol.* **48**, 775-&.
- Parker C. W., Letham D. S., Wilson M. M., Jenkins I. D., Macleod J. K. a Summons R. E. (1975) Identity of 2 new cytokinin metabolites. *Ann. Bot.* **39**, 375-376.
- Romanov G. A., Lomin S. N. a Schmulling 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.

- Romanov G. A., Spíchal L., Lomin S. N., Strnad M. a Schmülling T. (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal. biochem.* **347**, 129–134.
- Rosemeyer H. (2004) The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chem. Biodivers.* **1**, Pages 361-401.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *In Annu. Rev. Plant biol.* (Ed. pp. 431-449), Annual Reviews, Palo Alto.
- Shaw G. a Wilson D. V. (1964) Synthesis of zeatin. *Proc. Chem. Soc.* 231-&.
- Shi X. L. a Rashotte A. M. (2012) Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: Receptors and histidine phosphotransfer proteins. *Plant Cell Rep.* **31**, 789-799.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E. a Bartrina y Manns I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/ dehydrogenase genes of maize, rice, arabidopsis and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241-252.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct. Plant Biol.* **39**, 267-284.
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M. a Schmülling T. (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299-1305.
- Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**, 674-688.
- Šmehilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T. a Galuszka P. (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Front. Plant Sci.* **7**, 1264.
- Tarkowski P., Vaclaviková K., Novák O., Pertry I., Hanuš J., Whenham R., Vereecke D., Šebela M. a Strnad M. (2010) Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **680**, 86-91.
- Vorbrüggen H., Ruh-Pohlentz C. (2000) Synthesis Of Nucleosides, *Organic reaction*, **55**, 78-102.
- Wang J., Ma X. M., Kojima M., Sakakibara H. a Hou B. K. (2011) N-glucosyltransferase ugt76c2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2200-2213.
- Werner T., Kollmer I., Bartrina I., Holst K. a Schmülling T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol.* **8**, 371-381.
- Werner T. a Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.

- Westfall C. S., Muehler A. M. a Jez J. M. (2013) Enzyme action in the regulation of plant hormone responses. *J. Biol. Chem.* **288**, 19304-19311.
- Whitty C. D. a Hall R. H. (1974) Cytokinin oxidase in zea-mays. *Can. J. Biochem.* **52**, 789-799.
- Zhang F., Vasella A. (2007) Regioselective synthesis of 1<sup>l</sup>,1<sup>ll</sup>,5<sup>l</sup>,5<sup>ll</sup>,6<sup>l</sup>,6<sup>ll</sup>,6<sup>ll</sup>-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>-cellobiose. *Carbohydrate*, **342**, 2546-2556.
- Zürcher E. a 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.