

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Centrum regionu Haná pro biotechnologický
a zemědělský výzkum



Syntéza, charakterizace a biologická aktivita fotolabilních caged-cytokininů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Noemi Bucharová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2014

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Noemi Bucharová
Název práce	Syntéza, charakterizace a biologická aktivita fotolabilních caged-cytokininů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Bakalářská práce se zabývá syntézou a charakterizací caged-cytokininů. V teoretické části byla zpracována literární rešerše na téma cytokininy se zaměřením na jejich strukturu a biologickou aktivitu v rostlinách. Dále byl vypracován přehled dostupných fotolabilních chránících skupin, které byly již dříve použity v biologických studiích. V experimentální části bylo připraveno pět derivátů cytokininů odvozených od iP, BAP, INCYDE, 3MeOBAP a kinetinu s 2-nitrobenzylou chránící skupinou v pozici N9. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod a byla zkoumána jejich stabilita vůči UV záření. U vybraných látek byla testována jejich biologická aktivita před a po ozáření UV světlem na transgenní reportérové linii <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>ARR5::GUS</i>. Exprese β-glukuronidasy stimulovaná přítomností studovaných látek byla v kořenech rostlin histochemicky vizualizovaná pomocí chromogenního substrátu (5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-glukuronidu).</p>
Klíčová slova	Cytokininy, deriváty cytokininů, syntéza, fotolabilní chránící skupiny, biologická aktivita, <i>ARR5::GUS</i> test
Počet stran	49
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Noemi Bucharová
Title	Synthesis, characterization and biological activity of photolabile caged-cytokinins
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with synthesis and characterization of caged-cytokinins. In theoretical part published information about cytokinins, their structure and biological activity is summarized. Further, the list of photolabile protective groups previously used in biological studies is given. In experimental part five compounds derived from iP, BAP, INCYDE, 3MeOBAP and kinetin with 2-nitrobenzyl protective group at N9 position were prepared. Their physico-chemical properties and stability upon UV irradiation was examined. Biological activity of selected derivatives was also investigated using transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> cytokinin-responsive <i>ARR5::GUS</i> reporter line. Cytokinin-stimulated β-glucuronidase expression was histochemically localized in roots with a use of chromogenic substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide).</p>
Keywords	Cytokinins, cytokinin derivatives, synthesis, photolabile protective groups, biological activity, <i>ARR5::GUS</i> assay
Number of pages	49
Number of appendices	1
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Noemi Bucharová

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Mikovi Ph.D. za odborné a trpělivé vedení při sepisování této práce. Jemu i celému kolektivu laboratoře organické syntézy CRH patří díky za poskytnuté rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Evě Jiskrové za pomoc při přípravě a zpracování biologických testů.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
Úvod a cíle práce	9
1 Cytokininy	11
1.1 Struktura	11
1.2 Metabolismus.....	13
1.3 Signalizace.....	15
1.4 Biologická aktivita.....	16
2 Fotolabilní chránící skupiny	21
2.1 Nejpoužívanější fotolabilní chránící skupiny	22
3 Materiály a metody	29
3.1 Chemikálie	29
3.2 Metody	29
3.3 Syntéza	30
3.4 Stabilitní studie.....	33
3.5 Biologická aktivita.....	33
4 Výsledky a diskuze.....	34
4.1 Syntéza	34
4.2 Stabilitní studie.....	35
4.3 Biologická aktivita.....	36
5 Závěr.....	38
6 Seznam použité literatury	39
7 Přílohy.....	48
7.1 Příloha 1 - Absorpční spektra připravených látek	48

Seznam použitých zkratk

2-NO ₂ BzBr	2-nitrobenzylbromid
3MeOBAP	6-(3-methoxybenzylamino)-9 <i>H</i> -purin
AHK	histidinkinasový receptor z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AHPs	histidinfosfotransferové proteiny z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ARRs	regulátory odpovědi z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	<i>N</i> ⁶ -benzylamino-9 <i>H</i> -purin
bs	široký singlet
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CK, CKs	cytokinin, cytokininy
CKI1	gen cytokinin-independent 1 pro histidinkinasový receptor
CKX	cytokinindehydrogenasa
CRF	faktory odpovědi (cytokinin response factors)
d	dublet
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
ekv.	ekvivalent
ESI ⁺ - MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, pozitivní mód
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
GUS	β-glukuronidasa (EC 3.2.1.31)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INCYDE	2-chlor-6-(3-methoxyfenylamino)-9 <i>H</i> -purin
iP	6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9 <i>H</i> -purin, <i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin
iPR	6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9 <i>H</i> -purin ribosid
IPT	isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27)
<i>J</i>	interakční konstanta
KNOX	KNOTTED1-like homeoboxové proteiny
MeOH	methanol
NMR	nukleární magnetická rezonance
PE	petrolether
ppm	parts per million
s	singlet
SAM	stonkový apikální meristém

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

Úvod a cíle práce

Cytokinininy jsou nízkomolekulární látky patřící mezi rostlinné hormony. V pletivech rostlin plní nesčetné množství funkcí jak na úrovni samotných buněk, u kterých regulují jejich dělení a diferenciaci, tak i následně v rámci celého organismu, kde ovlivňují klíčení semen, růst laterálních pupenů či oddalují listovou senescenci. Studium jejich vlastností a působení umožňuje objasnění mechanismů, kterými mohou rostliny řídit různé vývojové procesy v odpovědi na biotické či abiotické vlivy prostředí. Sledování fyziologických účinků cytokininů prostřednictvím morfologických změn rostlin je možné několika způsoby, včetně sledování výskytu těchto fytohormonů v určitých stádiích vývoje, manipulace s jejich přirozenými hladinami nebo způsobem přenosu signálu, a často také aplikací exogenních cytokininů. Fotolabilní chránící skupiny představují výhodnou možnost mapování přítomnosti a vlivu různých látek včetně cytokininů. Uvolnění bioaktivní látky je umožněno působením UV záření, které lze časově i místně specifikovat až na jednotlivé buňky.

V rámci prohloubení znalostí dané problematiky byla v teoretické části práce zpracována literární rešerše na téma cytokinininy a fotolabilní chránící skupiny se zaměřením na jejich aplikaci v biologických systémech. Následná experimentální část se zabývala syntézou vybraných *N*9-substituovaných derivátů cytokininů s chránící 2-nitrobenzylovou skupinou (caged-cytokinininy) a jejich charakterizací pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod. Biologická aktivita získaných produktů byla poté testována na transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana* *ARR5::GUS*, ve kterých byla navozena exprese β -glukuronidasy a následně sledována její histochemická lokalizace.

Teoretická část

1 Cytokininy

Hormony jsou nízkomolekulární látky, které působí jako chemické přenašeče signálů z míst syntézy do míst potřeby, kde mohou pozměnit expresi genů a/nebo funkce proteinů. V rostlinách existuje mnoho skupin hormonů, které spolupracují na procesu zpracování environmentálních podnětů a řídí tak důležitá rozhodnutí rostlinného vývoje.

Jednou z nejlépe prozkoumaných skupin fytohormonů jsou cytokininy (CKs). Z chemického hlediska se jedná o N^6 -substituované deriváty adeninu, které lze podle navázaného postranního řetězce dále dělit na isoprenoidní a aromatické. Ačkoliv byly původně považovány za faktory, které v přítomnosti auxinů stimulují buněčné dělení (Miller a kol., 1955), navazující výzkumy prokázaly jejich účast na mnoha dalších aspektech rostlinného růstu a vývoje, jako je například klíčení, senescence či regulace apikální dominance (Mok, 1994).

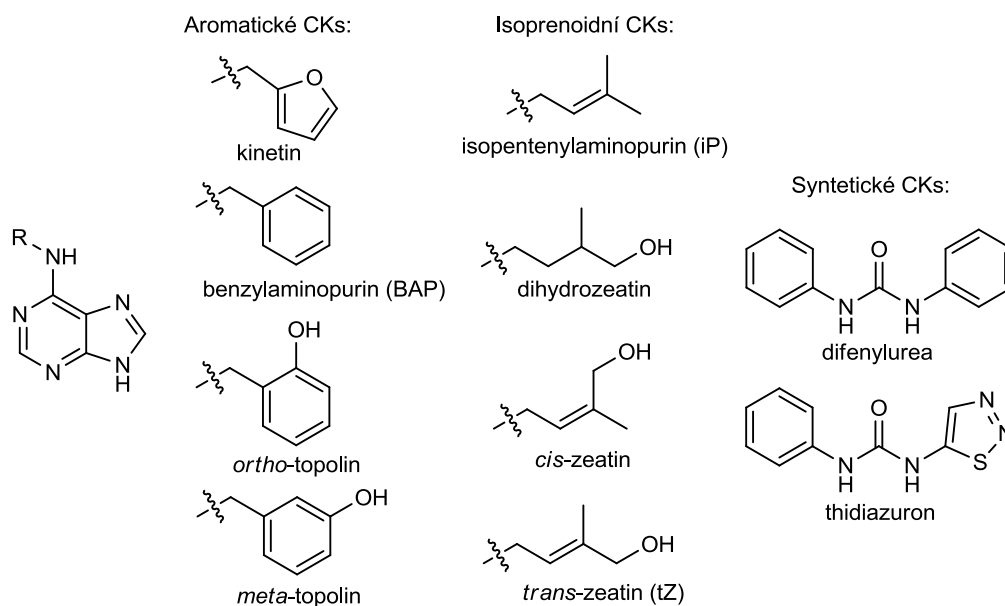
Jako první z CKs byl identifikován 6-furfurylaminopurin – degradační produkt DNA získaný ze sledího spermatu, později označený jako kinetin (Miller a kol., 1955). K objevení této sloučeniny v rostlinném materiálu však došlo až o několik desítek let později (Barciszewski a kol., 1996, Ge a kol., 2005). Prvním zástupcem CKs izolovaným přímo z rostliny byl zeatin, který dostal své označení podle rostliny, v jejímž nezralém endospermu byl identifikován – kukuřice, *Zea mays* (Letham, 1963). Navazující výzkumy prokázaly existenci mnoha dalších sloučenin strukturně či funkčně podobných a CKs se tak staly jedněmi z nejstudovanějších fytohormonů.

1.1 Struktura

Přirozené CKs jsou adeninové deriváty s vedlejšími řetězci isoprenoidního nebo aromatického typu v poloze N^6 (Obr. 1). Mezi nejčastější zástupce patří CKs s nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem, jako je například *trans*-zeatin a jeho deriváty. Dihydrozeatin, který na rozdíl od zeatinu obsahuje nasycený řetězec, byl mimo jiné identifikován ve fazolu - *Phaseolus vulgaris* (Wang a Horgan, 1978).

Zpočátku se předpokládalo, že endogenními látkami jsou pouze isoprenoidní CKs. Tento názor vyvrátil objev derivátů N^6 -benzylaminopurinu (BAP), tzv. topolinů (Horgan a kol., 1975).

Skupina syntetických CKs se skládá z derivátů močoviny, thiomčoviny a sloučenin od nich odvozených, jako jsou například difenylmočovina a thidiazuron (Mok a kol., 1982, Takahashi a kol., 1978).



Obr. 1. Struktura vybraných cytokininů.

Isoprenoidní

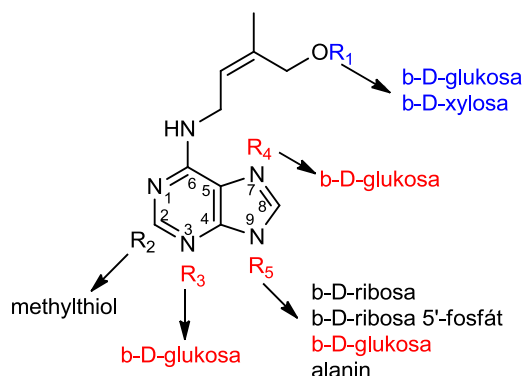
Většina CKs obsahuje krátký alifatický řetězec isopentenylového zbytku napojený na adenin v pozici 6. Hormony, u kterých nedošlo k modifikaci tohoto řetězce, patří do skupiny CKs isopentenylového typu (iP-typ). Zástupcem této skupiny látek je *N*⁶-isopentenylaminopurin (iP; 6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9*H*-purin). V rostlinách se dále vyskytují CKs zeatinového typu (Z-typ), mezi které patří *trans*-zeatin ((*E*)-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9*H*-purin) vznikající vlivem enzymů způsobujících hydroxylaci terminálního uhlíku na postranním řetězci nebo přímo působením adenylát-isopentenyltransferasy (IPT, EC 2.5.1.27) (Astot a kol., 2000). Jeho stereoizomer, *cis*-zeatin, vzniká především účinkem tRNA-IPT (EC 2.5.1.75) (Frébort a kol., 2011).

Aromatické

Aromatické CKs byly identifikovány v několika druzích rostlin, včetně huseníčku rolního - *Arabidopsis thaliana* (Tarkovská a kol., 2003) a topolu kanadského - *Populus canadensis* (Strnad, 1997), ale není jisté, zda se vyskytují i u jiných zástupců. Tato skupina látek zahrnuje kromě BAP i *meta*-topolin (6-(3-hydroxybenzylamino)-9*H*-purin) a *ortho*-topolin (6-(2-hydroxybenzylamino)-9*H*-purin). Vyznačují se výraznou CK aktivitou, avšak princip jejich biosyntézy a degradace zůstává neobjasněn. Mechanismus glykosylace a interakce se signálními drahami pravděpodobně sdílí s isoprenoidními CKs, jelikož enzymy i receptory jsou schopné rozpoznávat obě skupiny látek (Yamada a kol., 2001).

1.2 Metabolismus

Cytokininy se v rostlinách vyskytují nejen jako volné báze, ale i ve formě nukleosidů a nukleotidů (Obr. 2). Báze mohou dále vázat glukosu v pozicích *N*3, *N*7 a *N*9 na adeninovém kruhu (*N*-glykosylace) nebo přes hydroxyl postranního řetězce (*O*-glykosylace). Na této hydroxylové skupině dochází i k vazbě xylosy (Turner a kol., 1987). Pozice *N*9 může být modifikovaná L-alaninem (Entsch a kol., 1983) a *C*2 methylthio skupinou (Persson a kol., 1994).



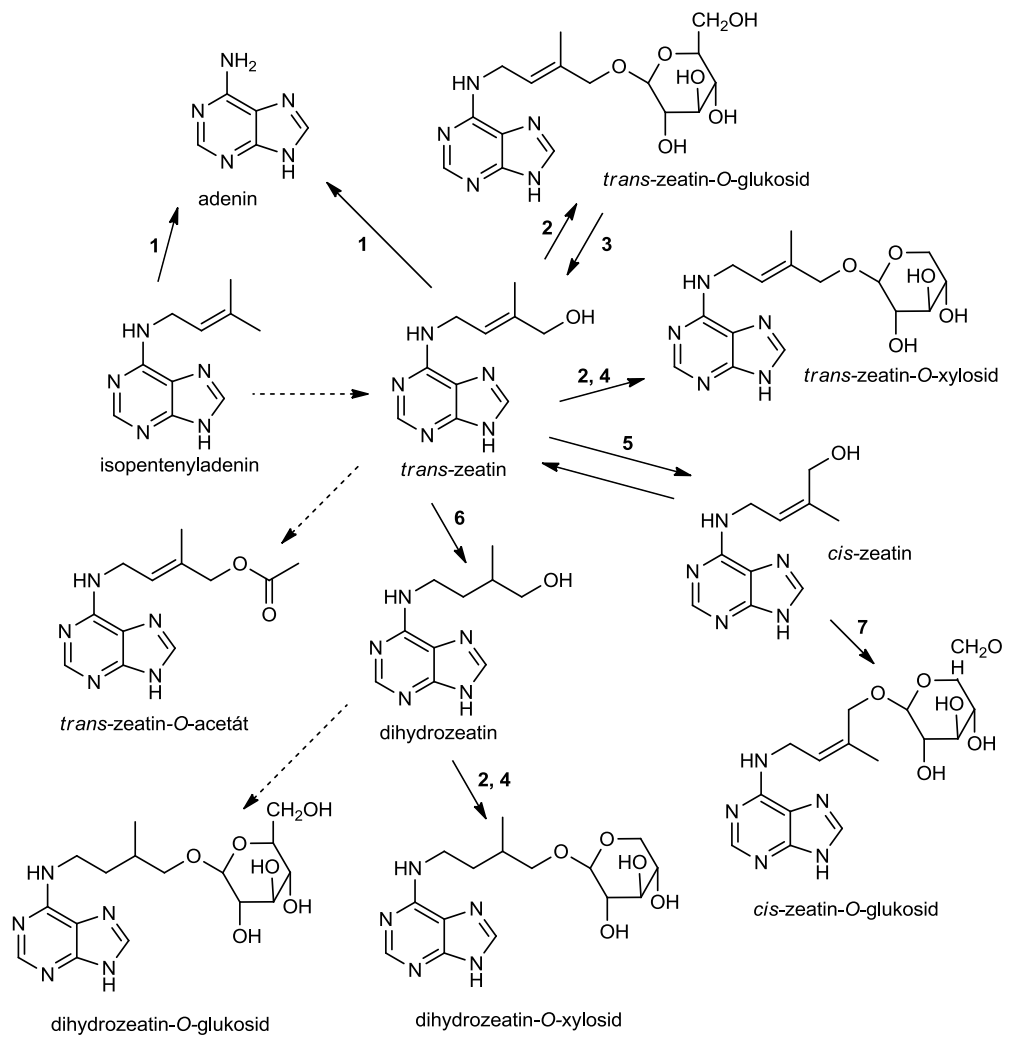
Obr. 2. Modifikace struktury CKs. *O*-glykosylace postranního řetězce je označena modře, červeně zvýrazněné části značí *N*-glukosylaci (podle Sakakibara, 2006).

Obsah endogenních CKs závisí na rovnováze mezi *de novo* syntézou, mírou importu a exportu, přeměnou mezi různými formami, přechodnou inaktivací pomocí konjugace (převážně glykosylace) a katabolickými reakcemi, které vedou ke ztrátě biologické aktivity (Schéma 1) (Mok a Mok, 2001, Sakakibara, 2006).

Experimentálně bylo zjištěno, že CKs ve formě volné báze představují aktivní látku, zatímco jejich ribosidy vykazují pouze nízkou hladinu aktivity (Spiess, 1975). Tuto hypotézu potvrdil objev genů kódujících CK receptory. Nukleosidy nebyly schopné vazby na receptor, volné báze však ano (Yamada a kol., 2001), a proto o nich dnes hovoříme jako o aktivní formě CKs. Hojně rozšíření nukleosidů v xylémových a floémových šťávách různých druhů rostlin naznačuje, že by se mohlo jednat o transportní formu fytohormonů. Možná funkce těchto cukerných konjugátů jako zásobních a inaktivních CKs byla potvrzena zjištěním odolnosti *O*-glukosidů vůči cytokinindehydrogenase (CKX, EC 1.5.99.12) (Frébort a kol., 2011).

Metabolicky stabilnější než volné báze jsou i další konjugáty, *N*-glukosidy, jejichž vznikem dochází k ireverzibilní inaktivaci CKs (McGaw a Horgan, 1983).

Další možností inaktivace je degradace CKs pomocí CKX, jejímž působením dochází k odštěpení *N*⁶-postranního řetězce za vzniku adeninu a příslušného aldehydu odvozeného od uvolněného řetězce (Frébort a kol., 2011).



1 - cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12)

2 - *trans*-zeatin-O- β -D-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.203)

3 - β -glukosidasa (EC 3.2.1.21)

4 - zeatin-O- β -D-xylosyltransferasa (EC 2.4.2.40)

5 - zeatinisomerasa

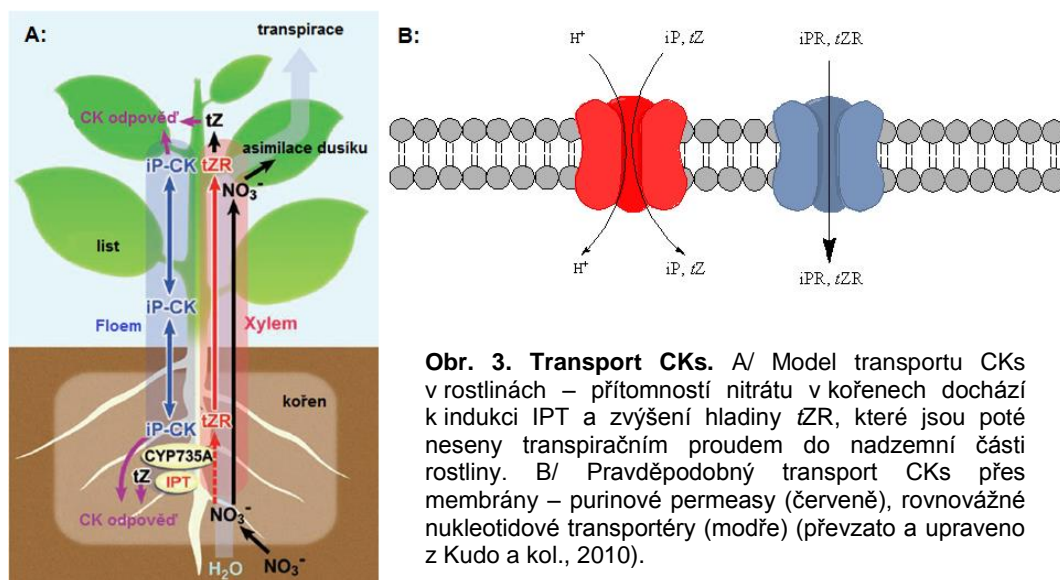
6 - zeatinreduktasa (EC 1.3.1.69)

7 - *cis*-zeatin-O- β -D-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.215)

Schéma 1. Možné modifikace N^6 -isoprenoidního postranního řetězce. Přerušovanou čarou jsou znázorněny přeměny, u kterých zatím nebyl identifikován daný enzym (podle Mok a Mok, 2001).

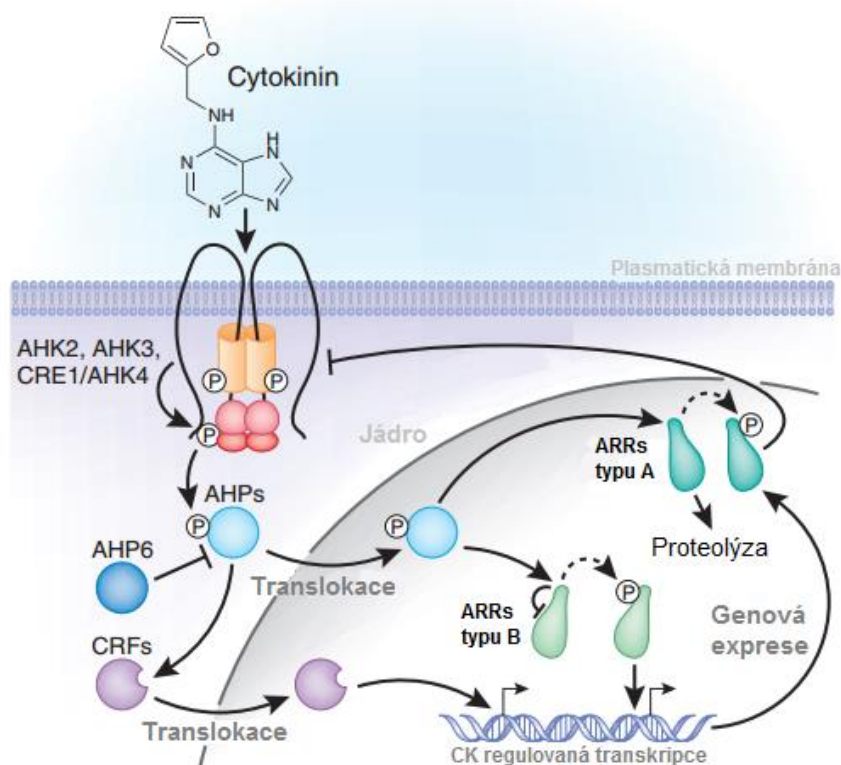
1.3 Signalizace

Cytokininy, obdobně jako další signální molekuly, působí ve velmi nízkých koncentracích ($1-50 \text{ pmol.g}^{-1}$ čerstvé hmoty) a jejich interakce se specifickým receptorem představuje základní krok v převodu signálu na konkrétní odpověď (Galuszka a kol., 2008). Fungují lokálně v meristematických pletivech, ale i na větší vzdálenosti (Obr. 3) (Kudo a kol., 2010, Werner a Schmülling, 2009). Distribuce CKs *trans*-zeatinového typu xylémovými a iP-typu floémovými šťávami naznačuje přítomnost selektivních transportních systémů (Hirose a kol., 2008). Nedávné studie odhalily možnou funkci některých purinových permeas *A. thaliana* jako transportérů cytokininových nukleotidů. Přenos pravděpodobně probíhá jako symport s protony (Bürkle a kol., 2003, Cedzich a kol., 2008). Specifické transportéry nukleosidů, které se pravděpodobně mohou podílet i na transportu CK ribosidů, byly objeveny v rýži (Hirose a kol., 2005) a *A. thaliana* (Hirose a kol., 2008).



Obr. 3. Transport CKs. A/ Model transportu CKs v rostlinách – přítomností nitrátu v kořenech dochází k indukci IPT a zvýšení hladiny tZ, které jsou poté nesený transpiračním proudem do nadzemní části rostliny. B/ Pravděpodobný transport CKs přes membrány – purinové permeasy (červeně), rovnovážné nukleotidové transportéry (modře) (převzato a upraveno z Kudo a kol., 2010).

Způsob příjmu a přenos signálu zůstal v případě CKs dlouho neobjasněn. Tato situace se začala měnit po objevení *CKI1* (CK-independent 1), genu z *A. thaliana*, který kóduje histidinkinasový receptor a jeho zvýšená exprese indukuje odpovědi typické pro CKs (Kakimoto, 1996). První CK receptor, CRE1/AHK4/WOL, byl identifikován v roce 2001 (Suzuki a kol., 2001). Následovaly objevy dalších receptorů, přenašečů (histidin-fosfotransferových proteinů z *Arabidopsis thaliana*, AHPs) a regulátorů odpovědi (*Arabidopsis* response regulators, ARR) (Suzuki a kol., 2002). Experimentálně bylo prokázáno, že CK signál je přijímán a přenášen pomocí několikasupňové fosforylace přes komplex tvořený dvoukomponentní signální dráhou, která byla již známa u prokaryot a nižších eukaryot (Obr. 4) (Hwang a Sheen, 2001).



Obr. 4. Model transdukce CK signálu (převzato a upraveno z Rashotte a kol., 2006).

První částí kaskády je již zmíněná membránová histidinkinasa (Higuchi a kol., 2004). Tento membránový protein obsahuje extracelulární CHASE (cyclases/histidine kinases-associated sensing extracellular) doménu (Mougel a Zhulin, 2001), která přijímá signál a změnou své konformace umožňuje dimerizaci receptoru. V důsledku toho dochází k autofosforylaci histidinkinase domény na histidinovém zbytku. Fosfát je poté přenesen na asparátový zbytek téhož proteinu a z něj putuje na histidin nacházející se na AHPs, které předávají signál dále až do jádra. Konečným příjemcem jsou ARRs typu B, které ovlivňují transkripci a umožňují expresi cílových CK genů, včetně ARRs typu A. Jejich aktivace způsobuje inhibici přenosu fosfátu a ARRs typu A tak fungují jako zpětná vazba (To a kol., 2007). Aktivací ARRs typu B dochází také ke zvýšení transkripce CRF (cytokinin response factors), které se v důsledku přítomnosti fosforylovaných AHPs hromadí v jádře, kde společně s ARR typu B zprostředkovávají expresi genů regulovaných CKs (Rashotte a kol., 2006).

1.4 Biologická aktivita

Cytokiny hrají roli v mnoha procesech růstu a vývoje rostlin, včetně regulace apikální dominance, formování a aktivity meristémů v nadzemních částech rostlin, zvětšování listů, senescence, transportu živin, klíčení semen či reakce na biotický a abiotický stres.

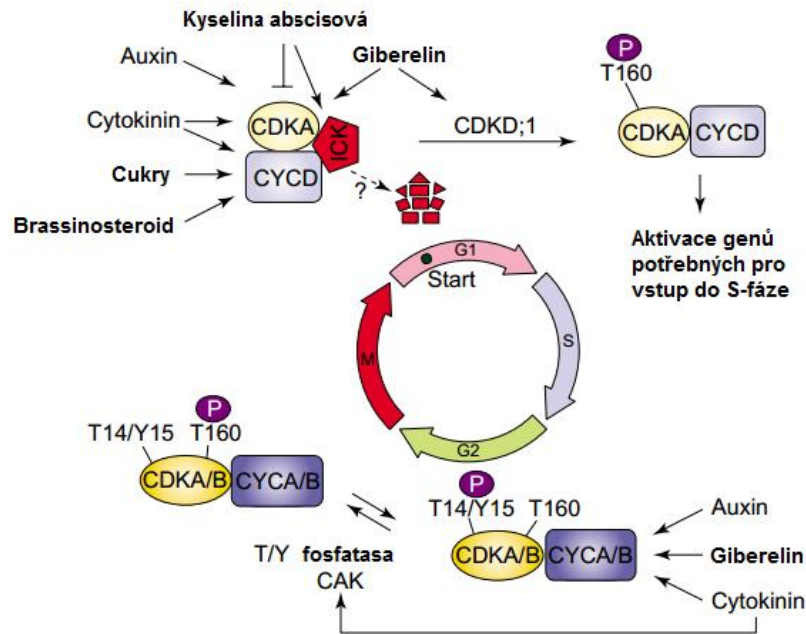
Pravděpodobně také zprostředkovávají množství procesů regulovaných světlem, jako je deetiolizace a diferenciacie chloroplastů (Mok, 1994).

Většina studií zabývajících se biologickou aktivitou CKs je založena na experimentech, které sledují následky exogenní aplikace CKs nebo regulaci jejich endogenního obsahu (Werner a kol., 2003). Významný přínos představují transgenní rostliny, u nichž byla pozměněna produkce biosyntetických či degradačních enzymů. Rostliny se zvýšenou expresí CKX se vyznačují nízkými hladinami CKs a následnými fenotypovými projevy, jako je snížená aktivita stonkového apikálního meristému či nadměrný růst primárního kořene (Werner a kol., 2003). Zvýšený obsah CKs způsobený indukci exprese IPT vede k oddálení senescence (Smart a kol., 1991). Při studiu funkcí CKs byly použity i rostliny s modifikovanou transdukcí signálu, například s absencí CK receptorů (Riefler a kol., 2006) či nadprodukcí ARRs (Kang a kol., 2013).

1.4.1 Buněčný cyklus

Průchod buněčným cyklem je řízen periodickým uskupováním regulačních proteinů, tzv. cyklinů s cyklin-dependentními kinasami, čímž dochází ke vzniku serin/threoninových kinasových komplexů, které zprostředkovávají fosforylaci dalších substrátů. Úspěšný průchod cyklem zajišťují tzv. kontrolní body, které monitorují vhodnost a správnost replikace. U eukaryot existují dva hlavní milníky: jeden na konci G₁-fáze a druhý na pomezí fází G₂/M (Francis a Sorrell, 2001).

Jednou z prvních objevených funkcí přisuzovaných CKs byla jejich schopnost v přítomnosti auxinu stimulovat buněčné dělení (Miller a kol., 1955). Při detailnějším zaměření na jednotlivé fáze buněčného cyklu a jejich porovnání s živočišným cyklem došlo k identifikaci specifických cyklinů a cyklin-dependentních kinas (CDK), které umožňují přechod buňky do následujícího stádia dělení (Obr. 5) (Stals a Inze, 2001). Bylo zjištěno, že po aplikaci CKs dochází k indukci exprese cyklinů typu D, které hrají roli při překonávání kontrolního bodu G₁/S. Analýza mutantních rostlin s vyššími hladinami CKs prokázala zvýšený obsah cyklinu D3 a nadměrná exprese tohoto proteinu v transgenních rostlinách vedla k jejich schopnosti tvořit kalus nezávisle na přidaných exogenních CKs (Riou-Khamlichi a kol., 1999).



Obr. 5. Model přechodů G₁/S a G₂/M v rostlinách. V G₁-fázi dochází k expresi cyklinů typu D (CYCD) a jejich katalytické podjednotky, cyklin-dependentní kiny A (CDKA). Aktivace komplexu CDKA-CYCD vyžaduje disociaci CDK inhibičního proteinu (ICK), jehož transkripce je indukována kyselinou abscisovou a fosforylací threoninového zbytku CDKA pomocí CDK-aktivující kiny (CDKD;1). Přejed G₂/M je spojen s fosforylací CDK prostřednictvím CDK-aktivující kiny (CAK) a defosforylací tyrosinového zbytku CDK (převzato a upraveno ze Stals a Inze, 2001).

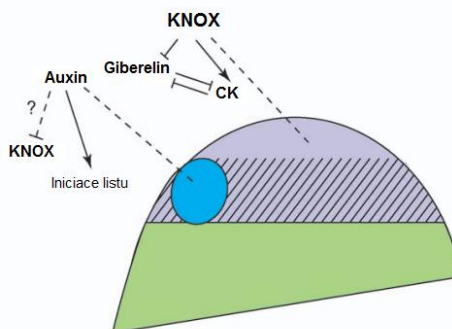
Při experimentech s buněčnými kulturami tabáku BY-2 bylo zjištěno, že v určitých fázích buněčného cyklu dochází ke zvyšování hladin těchto fytohormonů, převážně Z-typu CKs (Redig a kol., 1996). Navazující výzkumy zabývající se působením lovastatinu jako inhibitoru biosyntézy prekurzoru CKs (kyseliny mevalonové), potvrdily snížení hladiny těchto fytohormonů a zastavení buněčného cyklu v G₂-fázi. Opětovná aktivace dělení buněk byla navozena externí aplikací zeatinu (Laureys a kol., 1998). Nutnost přítomnosti CKs pro spuštění mitosy potvrdily experimenty na jiném druhu tabáku, *Nicotiana plumbaginifolia*, jehož buňky obsahovaly CDK s fosforylovaným tyrosinem (Tyr14 a Tyr15) a byly tak pozastaveny v G₂-fázi. Po aplikaci CKs došlo k odštěpení fosfátu a následné aktivaci daného enzymu, čímž bylo dosaženo synchronizovaného vstupu do fáze mitózy (Zhang a kol., 1996).

1.4.2 Vývoj kořene a prýtu

Růst rostlin závisí na kontinuální funkci meristémů, ve kterých je udržována rovnováha mezi proliferací a diferenciací buněk. Vliv CKs na dělení buněk byl potvrzen experimenty s transgenními rostlinami, ve kterých docházelo ke zvýšené expresi CKX a v důsledku toho degradaci aktivních fytohormonů (Werner a kol., 2001). Redukce stonkových meristémů byla pozorována i v případě mutantních rostlin, které neměly funkční receptory

(Nishimura a kol., 2004) či geny kódující enzymy biosyntetické dráhy CKs (Miyawaki a kol., 2004, Miyawaki a kol., 2006).

Za poslední desetiletí došlo k odhalení jistých spojů mezi transkripcí, která je důležitá pro aktivitu stonkových apikálních meristémů, a biosyntézou hormonů (Obr. 6). Exprese KNOTTED1-like homeoboxových proteinů (KNOX) ve stonkových dělivých pletivech potlačuje diferenciaci buněk, čehož je dosaženo pomocí regulace poměru mezi hladinou CKs a giberelinů. KNOX proteiny jsou schopné potlačit geny zodpovědné za biosyntézu giberelinů a naopak aktivují geny pro produkci CKs (Hake a kol., 2004, Kepinski, 2006, Sakamoto a kol., 2001, Yanai a kol., 2005). Další způsob regulace aktivity stonkového meristému je možný díky přeměně neaktivních CK nukleotidů na aktivní volné báze. K expresi požadovaného enzymu (EC 3.2.2.n1), který je kódovaný genem LONELY GUY, dochází v horní části meristému a mutace tohoto genu tak opět způsobuje redukcii počtu buněk (Kurakawa a kol., 2007).



Obr. 6. Interakce mezi hormony, které zprostředkovávají funkci stonkového apikálního meristému. Ve stonkovém apikálním meristému *A. thaliana* potlačuje KNOX protein biosyntézu giberelinů a navozuje biosyntézu CKs. Na okrajích meristému (šrafovaná oblast) dochází k akumulaci auxinu a následně iniciaci listového primordia (modrá oblast), čehož je dosaženo pravděpodobně sníženou expresí KNOX (převzato a upraveno z Kepinski, 2006).

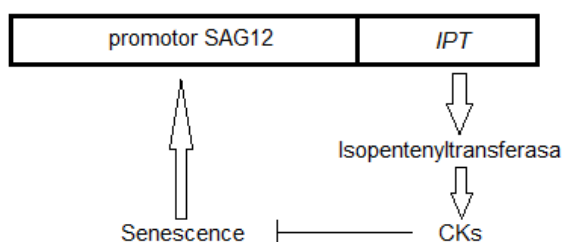
Pozitivní vliv CKs na růst stonkových apikálních dělivých pletiv je pravděpodobně opakem jejich funkce v kořenech. U mutantních rostlin se sníženým obsahem CKs došlo ke zvětšení kořenového meristému v důsledku hromadění meristematických buněk. Dá se předpokládat, že CKs zde fungují jako regulátory buněčné diferenciace (Dello loio a kol., 2007, Werner a kol., 2003). Dále bylo také zjištěno, že transkripční faktor ARR1, který je exprimován jako odpověď na CKs, aktivuje kromě jiných i gen SHY2. Vzniklý protein pak působí jako negativní regulátor auxinové signalizace a v důsledku toho dochází k redistribuci auxinu. Auxin však dokáže tento protein odbourat a zachovat dělivou schopnost buněk. Růst a velikost kořene je tak dána poměrem auxinů a CKs (Dello loio a kol., 2008).

1.4.3 Senescence

Prvotní experimenty zabývající se použitím CKs na oddělených částech rostlin objevily schopnost těchto látek oddalovat stárnutí. U listů rostliny *Xanthium pennsylvanicum* (řepeň), které byly ponořeny do vodného roztoku kinetinu, došlo ke snížení úbytku proteinů a listy si zachovaly zelenou barvu (Richmond a Lang, 1957). Antisenescenční vlastnosti fytohormonů byly pozorovány i u okvětních lístků hvozdíku karafiátu (*Dianthus caryophyllus*), ve kterých díky působení kinetinu a BAP nevznikal ethylen (Mor a kol., 1983). Pozdější výzkumy však dokázaly, že externí aplikace látek nemusí být vždy efektivní a může docházet ke zkreslení výsledků vlivem experimentálních podmínek, což bylo pozorováno například při aplikaci BAP na části listů *A. thaliana*. Ve tmě došlo k poklesu rozpadu chlorofylu, zatímco při práci na světle daný CK tento rozklad stimuloval (Zacarias a Reid, 1990).

Studium endogenních CKs prokázalo existenci nepřímé úměry mezi jejich obsahem a průběhem senescence (Singh a kol., 1992). V návaznosti došlo k potvrzení poklesu transkripce genů účastnících se biosyntézy a signalizace CKs během procesu stárnutí, zatímco geny kódující degradační enzymy byly aktivovány (Buchanan-Wollaston a kol., 2005).

Přímý důkaz o funkci CKs poskytly výzkumy transgenních rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*), v nichž po navození senescence docházelo k expresi klíčového enzymu CK biosyntézy, IPT (Obr. 7). Listy těchto rostlin měly delší životnost a veškeré aspekty senescence byly v dospělém stádiu znatelně potlačeny (Gan a Amasino, 1995).



Obr. 7. Model autoregulačního systému inhibice senescence. Exprese *IPT* je pod kontrolou specifického senescenčního promotoru *SAG12*. Počátek senescence indukuje vznik daného enzymu a následný vzestup hladiny CKs, čímž dochází k potlačení senescence a poté inaktivaci promotoru, což zamezí hromadění CKs (podle Gan a Amasino, 1995).

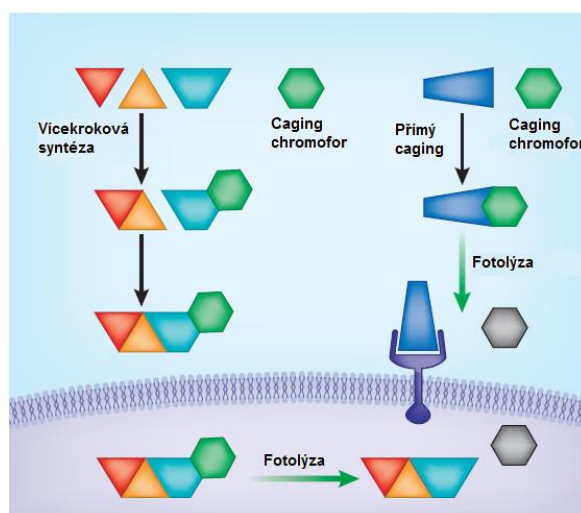
V souvislosti s navozením dlouhověkosti listů byly zkoumány i CK receptory. Nejdůležitější roli v oddálení listové senescence hraje AHK3, což prokázaly experimenty s mutantní linií *A. thaliana ore12-1*. Mutace v CHASE doméně toho receptoru měla za následek jeho stálou aktivaci. V případě této linie docházelo po aplikaci CKs k potlačení příznaků listové senescence, avšak u rostlin s nefunkčním receptorem AHK3 nebyl pozorován žádný vliv přidaných CKs (Kim a kol., 2006).

Dalším objeveným cílem působení CKs byly faktory ovlivňující transport živin ze zdroje do míst potřeby. Experimentálně bylo zjištěno, že tyto fytohormony způsobují indukci extracelulární invertasy, čímž dochází ke změnám vztahu mezi zdrojem a sinkovým pletivem a následným antisenescenčním projevům (Lara a kol., 2004).

2 Fotolabilní chránící skupiny

Přirozené denní světlo může působit změny v molekulách, které mu byly vystaveny. Toto pozorování vedlo ke vzniku samostatného odvětví chemie – fotochemie, které se vyvíjelo již od 19. století (Albini a Dichiarante, 2009). Pokroky ve výrobě umělých zdrojů světla a filtrů, které propouští pouze paprsky určitých vlnových délek, umožnily vysoce efektivní a selektivní provádění fotochemických reakcí, čehož je dnes využíváno pro odštěpování různých fotolabilních chránících skupin (Pelliccioli a Wirz, 2002).

Caged-sloučeniny jsou inertní, ale zároveň fotosenzitivní látky s latentní biologickou aktivitou (Obr. 8). Po jejich osvětlení dochází k fotolýze a transformaci na plně aktivní biomolekuly, které mohou být agonisty či antagonisty v určitých biologických procesech. Fotolýza je dvoufázový proces: nejprve dochází k pohlcení světla caged-molekulou za vzniku nestabilního meziprojektu. Následuje přeměna meziprojektu na požadovanou molekulu produktu. Celou reakci určuje několik zásadních molekulových vlastností, jako je extinkční koeficient, kvantový výtěžek fotolýzy a konstanta přeměny na produkt (Kao, 2006).



Obr. 8. Princip caging metody. K inaktivaci funkčních skupin může docházet přímo nebo lze využít syntézy o více krocích. Caging chromofor zabraňuje vazbě látky na receptor, dokud není odstraněn ozářením (převzato a upraveno z Ellis-Davies, 2007).

Pro zvýšení použitelnosti fotolabilních chránících skupin v biologických systémech se často využívá jejich modifikace. Přidáním jiných substitučních skupin do běžně používaných látek může dojít k pozitivní změně základních vlastností, jako je dobrá rozpustnost ve vodných rozpouštědlech, vyšší vlnová délka absorpce či vysoký absorpční koeficient (Yu a kol., 2010).

Caged-molekuly musí být před fotolýzou chemicky stabilní a biologicky inertní. Sloučeniny uvolněné fotolýzou by měly být transparentní pro vlnovou délku použitou k ozařování a biologicky benigní, stejně tak jako použité světlo. Většina dostupných caged-látek je tak aktivována ultrafialovým světlem v rozsahu vlnových délek 200-400 nm (Kao, 2006). Fotolýza by měla probíhat čistě a poskytovat vysoký kvantový výtěžek. Caged-molekuly by měly být rozpustné v cílovém médiu a rychlost uvolňování aktivní formy musí převyšovat rychlost studované odpovědi (Ellis-Davies, 2007, Pelliccioli a Wirz, 2002).

Na rozdíl od jiných konvenčních způsobů vpravování reagentů do buněk přináší caged-molekuly tři potenciální výhody. Tato metoda nabízí možnost uvolnit aktivní molekuly v určitém čase, přičemž může docházet i k hromadění inaktivní formy uvnitř živých buněk či tkání a po osvitě dojde k jejich okamžité interakci s receptory. Další výhodou je jednoduchost manipulace a zaměření světla pomocí zrcadel a čoček, což umožňuje soustředit paprsek do místa, jehož velikost je limitována pouze difrakcí. V neposlední řadě lze využít caged-sloučenin pro kontrolu chemické identity molekul uvolněných fotolýzou, jelikož bioaktivní látky bývají často nestálé a po jejich aplikaci mohou být cílové buňky vystaveny nejen požadovaným sloučeninám, ale i spektru jejich degradačních produktů (Kao, 2006).

2.1 Nejpoužívanější fotolabilní chránící skupiny

V případě organických syntéz byly fotolabilní chránící skupiny využívány již dlouhá léta a existuje tak celá řada komerčně dostupných sloučenin. V poslední době však nacházejí tyto látky uplatnění i při dočasné inaktivaci biologicky aktivních sloučenin. Následující stránky představují stručný přehled fotolabilních chránících skupin, které byly využity pro studium různých biologických procesů (Tabulka 1).

Tabulka 1. Souhrn nejčastěji využívaných fotolabilních chránících skupin.

Fotolabilní chránící skupiny	Funkční skupiny
2-nitrobenzyl	-COOH, -OH, -NH ₂
(2-nitrofenyl)amin	-COOH
2-fenyl-oxoethyl	-COOH, -OH, -NH ₂ , O-P(O)R ₂
fenoxy-, benzyloxy	-COOH, -NH ₂
2-(2-azidofenyl)ethyl	-COOH, -NH ₂
7-nitroindolin	-COOH, -NH ₂
benzensulfonyl	-OH
benzoin	-OH, -NH ₂
kumarin-4-ylmethyl	-COOH, -OH, -NH ₂

2.1.1 2-Fenyl-oxoethylová skupina (též fenacylová)

Bylo zjištěno, že fotolýzou fotosenzibilátorů, které jsou dobrými donory elektronů v excitovaném stavu, lze v přítomnosti fenacylových derivátů získat příslušné karboxylové kyseliny, alkoholy a fosfáty s vysokým výtěžkem. Vlnová délka použitého záření je následně dána zvoleným senzibilátorem (Banerjee a Falvey, 1997, Banerjee a kol., 1999). Obdobné experimenty byly provedeny pro fenacyl estery v přítomnosti donorů vodíkových atomů (Schéma 2) (Banerjee a Falvey, 1998). Jako velmi výhodná chránící skupina pro karboxylové kyseliny se jeví 2,5-dimethylfenacyl, k jehož odstranění dochází díky intramolekulární fotoreakci (Klán a kol., 2000). V důsledku interakcí elektronů mezi karbonylovou skupinou a fenylovým kruhem vyžaduje fenacylová skupina pro svou excitaci záření o kratších vlnových délkách (Sheehan a Umezawa, 1973). Ve srovnání s 2-nitrobenzylovou skupinou dochází k odštěpování fenacylu rychleji (Zabada a Klán, 2001).

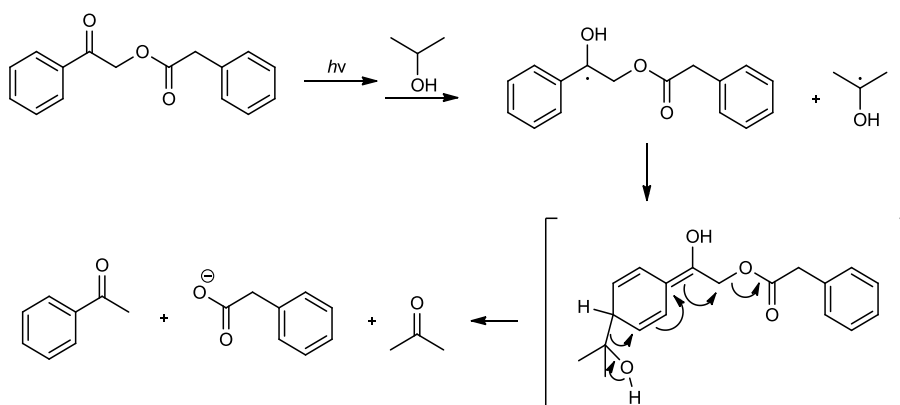


Schéma 2. Fotoindukované odštěpení vodíku z propan-2-olu karbonylovou skupinou fenacylesteru kyseliny fenylactové. Po přechodu do excitovaného tripletního stavu dochází k fragmentaci vzniklého radikálu, pravděpodobně přes meziprodukt, za vzniku volné kyseliny a acetofenonu (převzato a upraveno z Banerjee a Falvey, 1998).

p-hydroxyfenacylová skupina byla úspěšně použita při syntéze caged-ATP a také v biochemických a fyziologických výzkumech, které se zabývaly reakční kinetikou procesem transdukce signálu v nervové soustavě (Conrad a kol., 2000, Givens a kol., 2000). Moderní techniky umožňují její aplikaci v biologických studiích zabývajících se vazbou substrátu, konformačními změnami enzymu, dynamickou inhibicí či kinetikou přenosu signálu (Geibel a kol., 2000, Koetting a kol., 2012, Ma a kol., 2006).

2.1.2 Kumarin-4-ylmethylová skupina

Kumarin-4-ylmethylové chránící skupiny byly vytvořeny pro použití u fosfátů (Givens a Matuszewski, 1984, Schade a kol., 1999), karboxylátů (Schade a kol., 1999), aminů, alkoholů (Takaoka a kol., 2003, Takaoka a kol., 2004), fenolů a karbonylových sloučenin (Lu a kol., 2003). FOTOSENSITIVNÍCH VLASTNOSTÍ FOSFÁTOVÉHO ESTERU kumarin-4-ylmethanolu si jako první všimli Givens a Matuszewski, kteří také uvedli možnost jeho využití jako fluorescenční značky pro nukleofilní molekuly, včetně proteinů (Givens a Matuszewski, 1984). Karboxylové kyseliny a fosfáty mohou být chráněny pomocí 7-methoxykumarin-4-ylmethylu přes esterovou vazbu (Schade a kol., 1999).

Mechanismus fotolýzy kumarin-4-methyl caged-sloučenin je relativně jednoduchý. Po excitaci molekuly světlem dochází k heterolýze C-O esterové vazby a vzniká iontový pár (kumarinylmethylkarbokation a X anion). Ionový pár je poté separován a zachycen v polárním rozpouštědle za vzniku 4-hydroxymethylkumarinu a nechráněného XH. V případě sloučenin B (Schéma 3) vzniká přímou fotolýzou XCOOH, která podléhá dekarboxylaci a vzniká tak konečný produkt, XH (Schade a kol., 1999, Yu a kol., 2010).

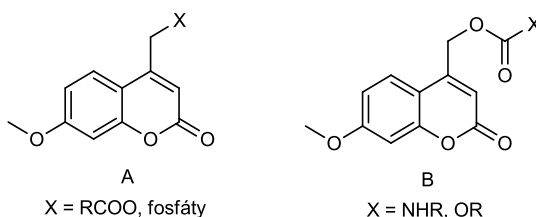


Schéma 3. Struktura kumarin-4-ylmethylových chránících skupin.

Fotolabilní skupiny odvozené od kumarinu jsou často využívány pro caging sekundárních poslů, jako je cyklický adenosin-5'-monofosfát a cyklický guanosin-5'-monofosfát (Furuta a kol., 2004). Dřívější výzkumy poukazují na použití těchto sloučenin při syntéze blokátorů glutamátových transportérů (Takaoka a kol., 2003).

2.1.3 Fenoxo- a benzyloxyskupiny

K objevu této skupiny látek vedly experimenty s benzyloxykarbonylglycinem, ze kterého se po osvětlení UV zářením uvolňovala zmíněná aminokyselina. Deriváty těchto skupin byly poté využívány při syntéze peptidů díky snadné separaci a identifikaci aminokyselinových produktů fotolýzy, během které docházelo k heterolytickému štěpení vazby C-O a vzniku benzylového kationtu. V případě fenoxyskupiny vázané na karboxylovou kyselinu se jedná o homolytické štěpení esteru (Schéma 4) (Barltrop a Schofield, 1965, Zabadal a Klán, 2001).

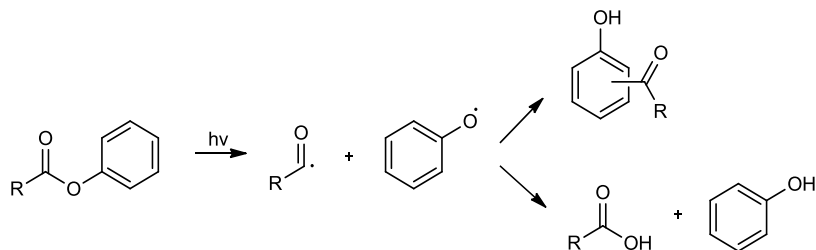


Schéma 4. Fitolýza fenoxyskupiny. Štěpením esteru dochází ke vzniku fenoxo- a acylradikálů, které poté mohou podléhat rekombinaci a vytvářet acylfenoly nebo po odštěpení vodíku z prostředí vzniká fenol a příslušná karboxylová kyselina.

2.1.4 2-(2-Azidofenyl)-ethylová skupina

Jako první ze zástupců této skupiny byl zkoumán 2-(2-azidofenyl)ethylalkohol. Aromatické azidy představují stabilnější sloučeniny než azidy alifatické, netvoří iminy a absorbují světlo větších vlnových délek. Jejich fotolýzou vzniká nitrenový meziprodukt, který přechází přes aminolový derivát na indol a uvolněnou aktivní molekulu (Barton a kol., 1971).

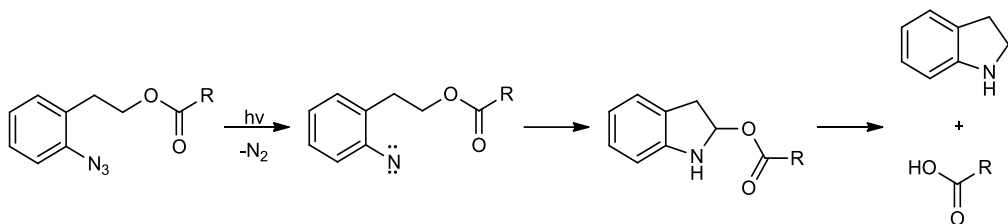


Schéma 5. Mechanismus fotolýzy esteru 2-(2-azidofenyl)ethylové skupiny. Dochází k rozpadu azidové skupiny za vzniku nitrenu a dusíku. Po následné cyklizaci se molekula štěpí na pyrrol a příslušnou karboxylovou kyselinu.

Azidofenylová fotolabilní chránící skupina byla aplikována při fotoafinitním značení nukleových kyselin, které napomáhá studiu struktury supramolekulárních komplexů účastnících se replikace a transkripce (Knorre a Godovikova, 1998). Dále byla také součástí syntézy vedoucí k vytvoření derivátu kyseliny hyaluronové, na jehož povrchu mohou být imobilizovány proteiny, což představuje výhodnou metodu pro transport léčiv (Lee a kol., 2013).

2.1.5 Benzoinová skupina

Mezi hlavní výhody, které podporují využití benzoinových derivátů jako chránících skupin, patří jejich vysoké kvantové výtěžky a vznik inertního meziproductu - benzofuranu. Vlnová délka používaná k uvolnění chránící skupiny (300 nm) však může být absorbována vznikajícím produktem. Kromě samotného benzionu patří mezi používané skupiny 3,5-dimethoxybenzoin a jeho deriváty (Pelliccioli a Wirz, 2002).

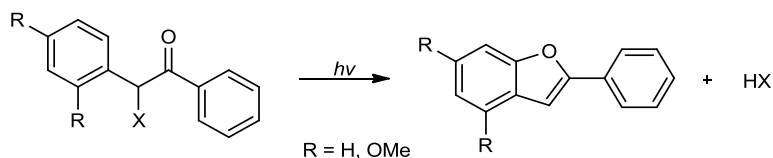


Schéma 6. Mechanismus fotolýzy benzoinové skupiny.

Benzoinová skupina byla mimo jiné použita pro syntézu caged-ATP (Thirlwell a kol., 1994). Další možností jejího využití je protekce hydroxyskupiny nukleosidů a alkoholů či karboxylového konce peptidů (Peach a kol., 1995, Pirrung a Bradley, 1994).

2.1.6 7-Nitroindolinová skupina

Sloučeniny této skupiny se vyznačují efektivní fotolýzou, která je dána silnou absorpcí světla v oblasti 350 nm, a nejsou ovlivňovány vznikem nitrosoindolového produktu (Corrie a kol., 2005). Jedna z prvních aplikací této fotolabilní chránící skupiny, konkrétně 1-acyl-7-nitroindolinu, byla uskutečněna v roce 1999 při syntéze caged-glutamátu. Fotolýza však probíhala v závislosti na rozpouštědle (Papageorgiou a kol., 1999). Pro syntézu dalších karboxylových kyselin s chránící skupinou (glycin, γ -aminomáselná kyselina) byl úspěšně využit 4-methoxy-7-indoliny, který v případě L-glutamátu poskytoval vyšší procento přeměny než L-glutamát ochráněný 7-nitroindolinylovou skupinou (Canepari a kol., 2001).

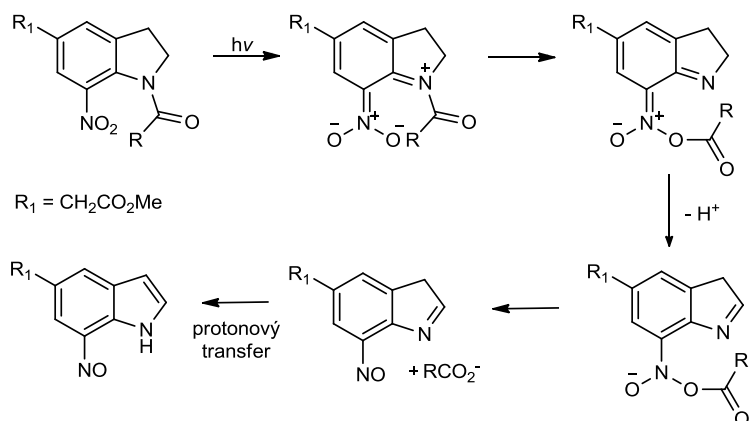


Schéma 7. Předpokládaný mechanismus fotolýzy 1-acyl-7-nitroindolinu. Primární reakcí je přenos acylové skupiny na sousední nitrosubstituent. Poté dochází k uvolnění protonu následovanému odštěpením karboxylátu.

2.1.7 2-Nitrobenzyllová skupina

V dnešní době patří 2-nitrobenzyllová skupina mezi jedny z nejpoužívanějších fotolabilních chránících skupin. Tato látka silně absorbuje světlo o vlnové délce 275 nm (UV-C) a částečně v oblasti UV-B (Herrmann, 2012). V případě alkoholů probíhá deprotektace v několika mezikrocích za vzniku příslušného alkoholu a 2-nitrosobenzaldehydu (Schéma 8) (Corrie a kol., 2005, Hellrung a kol., 2005). Reakce je silně ovlivňována rozpouštědlem a pH média (Il'ichev a kol., 2004). Za účelem snížení energie použitého světla se využívají substituenty poskytující elektrony, jako například methoxy skupina (Bochet, 2002, Pelliccioli a Wirz, 2002).

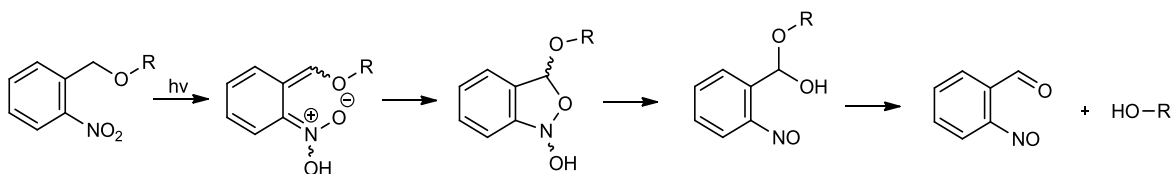


Schéma 8. Mechanismus fotolýzy 2-nitrobenzyletherových derivátů. Tyto ethery jsou odstraňovány intramolekulární interakcí, při které dochází k přenosu vodíku za vzniku tautomerů meziprojektu, *aci*-nitro sloučenin. Ty dále přechází přes benz[c]isoxazolol a 2-nitrosobenzyl hemiacetal na 2-nitrosobenzylaldehyd a příslušný alkohol.

Fotolabilní 2-nitrobenzyllové chránící skupiny byly použity při modifikaci povrchu krycích sklíček, na kterých po osvětlení fluorescenčním mikroskopem docházelo k přilnutí buněk, což umožňuje studium mezibuněčných interakcí (Kikuchi a kol., 2008). Dalším možným využitím je vazba léčiva přes chránící skupinu na nosič, který danou látku dopraví na místo určení a po ozáření dojde k jejímu uvolnění (Agasti a kol., 2009). Pro výzkum neurologických onemocnění může být přínosem použití caged zinečnatých iontů (Bandara a kol., 2009). Této chránící skupiny bylo použito i v případě syntézy caged CKs (Hayashi a kol., 2012).

Experimentální část

3 Materiály a metody

3.1 Chemikálie

V experimentální části této BP byly použity následující chemikálie: Murashige-Skoog medium, 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid (X-Gluc) (Duchefa); *N,N'*-dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol (EtOH), ethyl-acetát (EtOAc), methanol (MeOH), chlorid amonný, chloroform, petrolether, sacharosa, toluen (Lach-Ner, s.r.o.); disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové dihydrátu, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný (Merck); hexakynoželezitan draselný, hexakynoželeznatan draselný (Neolab); 1-brommetyl-2-nitrobenzen, 2-(4-morfolino)ethansulfonová kyselina, deuterovaný DMSO (DMSO- d_6), hydrid sodný, Phytigel, Triton-X100 uhličitan draselný (Sigma-Aldrich) a demi voda. Výchozí cytokininy pro syntézu iP, BAP, 2-chlor-6-(3-methoxyfenylamino)-9*H*-purin (INCYDE), 6-(3-methoxybenzylamino)-9*H*-purin (3MeOBAP) a kinetin byly připraveny v oddělení Chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná.

Suchá rozpouštědla byla připravena podle následujícího postupu: k aktivovanému molekulovému sítu (24 hodin – 300 °C) bylo přidáno požadované rozpouštědlo (20% m/v) a sušeno 72 hodin pod chlorkalciovým uzávěrem (Williams a Lawton, 2010).

3.2 Metody

Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) prováděné na hliníkových TLC deskách Silikagel 60 F₂₅₄ (Merck). Složení mobilní fáze bylo chloroform/MeOH 9:1 a vizualizace probíhala pod UV lampou Camag při vlnové délce 254 nm.

Sloupcová kapalinová chromatografie byla prováděna ve skleněných kolonách naplněných silikagelem Davisil LC60A 40-63 Micron (Grace Davison). Složení jednotlivých elučních směsí je uvedeno v následující kapitole u konkrétních látek.

Čistota připravených látek byla změřena pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC Alliance 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA, USA), ve kterém byla umístěna kolona C18 Symmetry (Waters) o průměru 2,1 mm a délce 150 mm s pórovitostí 5 μ m. Vzorek rozpuštěný v MeOH (1 mg/ml) byl následně naředěn 100krát a nanesen v objemu 10 μ l do počáteční mobilní fáze. Separace probíhala v methanolovém gradientu (0' – 90% A; 25' – 10% A; 35' – 10% A; 36' – 90% A; 45' – 10% A) o průtoku 0,25 ml/min. Mobilní fázi A tvořil 15 mM mravenčan amonný o pH 4,0, mobilní fázi B MeOH. Detekce byla zajištěna detektorem s diodovým polem (PDA 2996, Waters) s měřením v rozmezí vlnových délek 210–400 nm.

Za účelem zjištění molekulové hmotnosti produktů byl eluát veden do hmotnostního spektrometru ZMD 2000 (Micromass, Manchester, UK), jehož iontový zdroj (ESI) byl vyhříván na 120 °C a desolvatační teplota činila 300 °C. K ionizaci docházelo pomocí kapilárního napětí 3,0 kV a napětí na vstupní štěrbině 20 V. Jako desolvatační i zmlžovací plyn byl použit dusík. Měření bylo provedeno v pozitivním (ESI⁺) FULLSCAN módu v rozsahu *m/z* 50-850.

NMR spektra vzorků rozpuštěných v DMSO-*d*₆ byla měřena na spektrometru Jeol ECA-500 při frekvencích 500 MHz (¹H) a 125 MHz (¹³C) a Bruker Avance při frekvenci 300 MHz (¹H) a 75 MHz (¹³C).

Elementární složení produktů bylo stanoveno na analyzátoru Thermo Finnigan FLASH EA 1112 Series. Připravené látky byly naváženy do cínových kelímků (2-3 mg), a po sbalení spáleny při teplotě 950 °C za průtoku nosného plynu (helium) 130 ml/min a referenčního 100 ml/min. Jednotlivé prvky ve formě plynů byly detekovány teplotně-vodivostním detektorem.

3.3 Syntéza

N9-alkylace – obecný postup

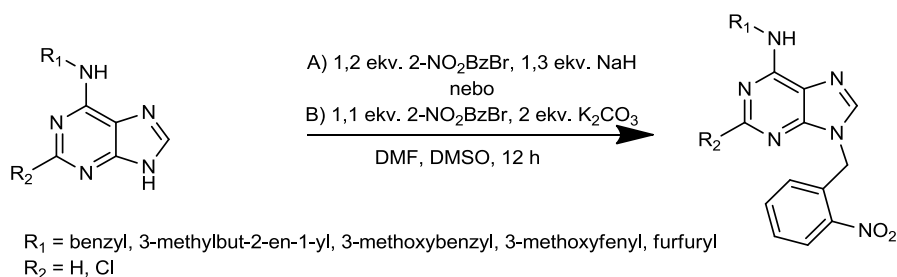


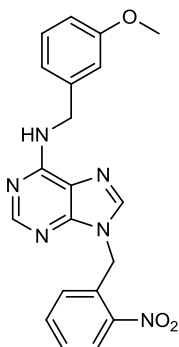
Schéma 9. Obecný postup N9-alkylace.

Metoda A: ve vysušené baňce pod dusíkovou atmosférou byl ve směsi suchého DMF a DMSO (4:1) rozpuštěn daný CKs a 2-nitrobenzylbromid (2-NO₂BzBr, 1,2 ekvivalentu). Poté byl ve třech dávkách přidán hydrid sodný (1,3 ekv.).

Metoda B: ve vysušené baňce pod dusíkovou atmosférou byl v suchém DMSO (7 ml) rozsuspendován daný CKs a bezvodý uhlíčan draselný (2 ekv.). Následně byl ke směsi přikapán roztok 2-NO₂BzBr (1,1 ekv.) v suchém DMF (5 ml).

Po ukončení reakce byla reakční směs nalita na led (20 g). V případě vzniku pevné látky byl pevný podíl zfiltrován, promyt vychlazenou vodou a vysušen v sušárně při 50 °C. Při vzniku gelu byl produkt extrahován EtOAc (4x 15 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (2x 10 ml), vysušeny (Na₂SO₄) a odpařeny za vakua. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie.

6-benzylamino-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (1)



- syntetizováno metodou A
- extrakce do EtOAc
- kolona chloroform/MeOH 19:1 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 43,1 %

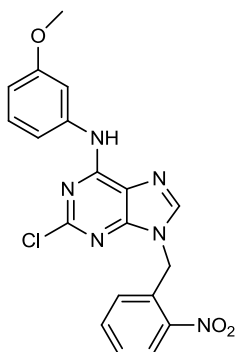
ESI⁺-MS m/z: (360,2, [M+H]⁺)

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

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43,44, 44,04, 119,51, 125,60, 127,16, 127,78, 128,74, 129,39, 129,60, 132,54, 134,93, 140,61, 141,58, 147,91, 149,66, 153,31, 154,92.

EA (teor./experiment.): %C - 63,32/63,00, %H - 4,48/4,18, %N - 23,32/22,00.

2-chlor-6-(3-methoxyfenylamino)-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (2)



- syntetizováno metodou A
- filtrace
- kolona toluen/MeOH 14:1
- žlutá pevná látka, výtěžek 22,48 %

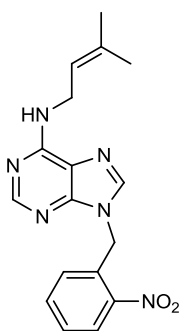
ESI⁺-MS m/z: (411,6, [M+H]⁺)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,73 (s, 3H), 5,75 (s, 2H), 5,89 (bs, 1H), 6,65 (dd, *J* = 8,3 Hz, 2,1 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,23 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,44 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,58 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 7,66 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,15 (dd, *J* = 8,3 Hz, 0,9 Hz, 1H), 8,32 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44,41, 55,41, 107,58, 109,21, 113,85, 119,28, 125,66, 129,35, 129,73, 131,88, 135,00, 140,38, 142,99, 147,76, 151,53, 152,86, 152,99, 159,79.

EA (teor./experiment.): %C - 55,55/56,97, %H - 3,68/3,84, %N - 20,46/19,00.

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



- syntetizováno metodou B
- extrakce EtOAc, filtrace
- kolona chloroform/MeOH 19:1 s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 20,17 %

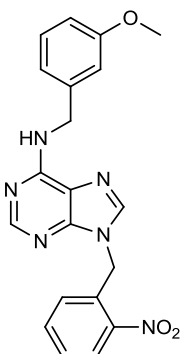
ESI⁺-MS m/z: (338,7, [M+H]⁺)

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

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 18,32, 25,87, 38,14, 43,91, 122,63, 125,50, 129,24, 129,50, 132,51, 133,61, 134, 81, 141,21, 147,82, 153,23, 154,73.

EA (teor./experiment.): %C - 60,34/60,14, %H - 5,36/5,00, %N - 24,84/24,12.

6-(3-methoxybenzylamino)-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (4)

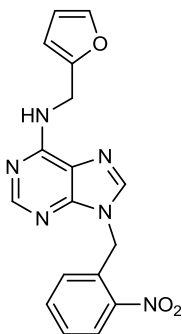


- syntetizováno metodou B
- filtrace
- kolona EtOAc/PE 1:1, 2:1
- bílá pevná látka, výtěžek 21,19 %

ESI⁺-MS m/z: (391,6, [M+H]⁺)

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

6-furfurylamino-9-(2-nitrobenzyl)-9H-purin (5)



- syntetizováno metodou B
- filtrace
- kolona chloroform s MeOH gradientem
- světle žlutá pevná látka, výtěžek 62,7 %

ESI⁺-MS m/z: (350,6, [M+H]⁺)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 4,66 (bs, 1H), 5,72 (s, 2H), 6,22 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 6,33 (dd, $J = 3,1$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H), 7,54 (td, $J = 8,0$ Hz, 0,9 Hz, 1H), 7,62 (td, $J = 7,3$ Hz, 0,9 Hz, 1H), 8,11 (dd, $J = 8,3$ Hz, 1,2 Hz, 1H), 8,18 (bs, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,32 (bs, 1H).

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

EA (teor./experiment.): %C - 58,28/57,90, %H - 4,03/4,03, %N - 23,99/23,17.

3.4 Stabilitní studie

Pro měření absorpčních spekter byly připravené látky (**1**, **3** a **5**) rozpuštěny v 60% EtOH a látka **2** nejprve v DMSO a poté v 60% EtOH (finální koncentrace DMSO 1 %). Na skenovacím spektrofotometru UV-2401 PC (Shimadzu) byla změřena absorbance v rozmezí vlnových délek 210-500 nm.

U látek **1** a **3** byla prováděna stabilitní studie. 1 mM roztoky testovaných látek v 60% EtOH byly ozářeny na skenovacím spektrofotometru v rozsahu 254-300 nm (20 skenů). Osvícené vzorky byly nanесeny na TLC a porovnány se standardy (iP a BAP) v mobilní fázi chloroform/MeOH (9:1).

3.5 Biologická aktivita

3.5.1 GUS test

Pro experimenty byla použita transgenní reportérová linie *Arabidopsis thaliana* *ARR5::GUS*. Semena byla sterilizována roztokem (70% EtOH s přidavkem 0,01 % Tritonu X-100) a po usušení umístěna na pevné MS médium (0,5x Murashige a Skoog médium, 1 % sacharosa, 11 g/l phytigel, 0,5 g/l 2-(4-morfolino)ethansulfonová kyselina, pH 5,6). Za účelem navození synchronizovaného růstu byla semena kultivována dva dny ve tmě při 4 °C a poté pěstována pět dnů v režimu 16 h světlo/8 h tma (24 °C/22 °C, 50% vlhkost).

Testované látky (**1** a **3**) byly rozpuštěny v DMSO a poté ve sterilním tekutém MS médiu (finální koncentrace 20 μM , 0,1 % DMSO). Z takto připravených roztoků byly odebrány 2 ml a v křemenných kyvetách ozářeny pomocí skenovacího spektrofotometru Shimadzu UV-2401 PC (20 skenů v rozsahu 254-300 nm).

Pětidenní semenáčky *ARR5::GUS* byly kultivovány v připravených médiích 16 h ve tmě při 24 °C. Poté byly rostliny několikrát opláchnuty roztokem pro GUS barvení (0,1 M fosfátový pufr pH 7,2, 10 mM ethylendiamintetraoctová kyselina, 0,5 mM hexakynoželezitan draselný, 0,5 M hexakynoželeznatán draselný, 0,1% Triton X-100). Pro histochemickou vizualizaci exprese β -glukuronidasy byly semenáčky inkubovány

v GUS roztoku s přísávkem X-Gluc (1 mM 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid), Nejprve bylo po 20 minut aplikováno vakuum a poté byly vzorky inkubovány jednu hodinu za laboratorní teploty. Po promytí 70% EtOH byly kořínky rostlin pozorovány pod mikroskopem SMZ 168 TL (Intraco micro) při 20násobném zvětšení.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza

V návaznosti na článek Hayashi a kol. publikovaný v roce 2012 byly syntetizovány caged-cytokininy a jejich deriváty s 2-nitrobenzylou chránící skupinou. V případě zmíněného článku probíhala syntéza přes dva kroky. V první reakci byl k 6-chlorpurinu připojen 2-NO₂BzBr (2,16 ekv.) v přítomnosti 1,8-biazabicykloundek-7-enu (1,44 ekv.). Vzniklý 6-chlor-9-(2-nitrobenzyl)-9*H*-purin byl dále substituován v poloze C6 benzylaminem (caged-BAP) nebo 4-amino-2-methylbutanolem (caged-dihydrozeatin).

Cílem této práce bylo ověření publikovaných výsledků a příprava dalších derivátů odvozených od iP, INCYDE, kinetinu a 3MeOBAP (Tabulka 2).

Tabulka 2. Shrnutí fyzikálně-chemických vlastností připravených látek.

Látka	Výtěžek (%)	HPLC (%)	ESI ⁺ -MS (m/z)	Elementární analýza		
				teor./experiment.		
				%C	%H	%N
1	43 ^A	99,9	360,2	63,32/63,00	4,48/4,18	23,32/22,00
2	23 ^A	99,9	411,6	55,55/56,97	3,68/3,84	20,46/19,00
3	20 ^B	99,3	338,7	60,34/60,14	5,36/5,00	24,84/24,12
4	21 ^B	87,2	391,6	n.a.	n.a.	n.a.
5	63 ^B	97,9	350,6	58,28/57,90	4,03/4,03	23,99/23,17

Vysvětlivky: n.a. – neanalyzováno, ^A – syntetizováno metodou A, ^B – syntetizováno metodou B.

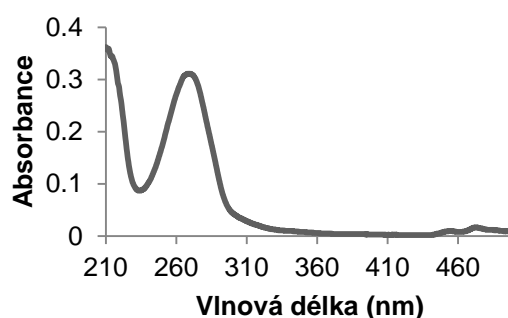
Reakční schéma bylo pozměněno a v průběhu syntézy byly optimalizovány reakční podmínky. Výchozí látkou byl samotný cytokinin, který následně podléhal *N*9-alkylaci. Zároveň došlo ke snížení nadbytku alkylačního činidla na 1,2 ekv. a jako báze byl použit hydrid sodný (1,3 ekv.) – *metoda A*. Při aplikaci této metody však reakční směs obsahovala nezreagované alkylační činidlo a výsledný produkt bylo obtížné separovat. Pro optimalizaci syntézy a separace byla navržena *metoda B*. Množství 2-NO₂BzBr bylo sníženo na 1,1 ekv. a použitou bází byl uhličitán draselný (2 ekv.).

V rámci *N*9-alkylace docházelo ke vzniku především *N*9, ale i *N*7 (minoritní podíl) izomeru. V průběhu separací byl úspěšně získán pouze jeden *N*7 derivát od látky **2**, který

byl charakterizován pomocí HPLC-MS. V důsledku malého množství produktu však nebylo možné tuto látku dále charakterizovat a testovat. *N7* deriváty však představují zajímavou alternativu k *N9* caged-CKs, protože se u těchto látek také nepředpokládá cytokininová aktivita. A jelikož doposud nebyly připraveny, není známa jejich stabilita ani podmínky pro deprotekcí.

4.2 Stabilitní studie

Pro měření absorpčních spekter v rozmezí 210-500 nm byly použity 10 μ M roztoky daných produktů (**1**, **3**, **5**) v 60% vodném EtOH. Z důvodu obtížné rozpustnosti byla látka **2** nejprve rozpuštěna v DMSO a poté v 60% EtOH (1 % DMSO). Spektra prvních tří vzorků obsahovala charakteristické absorpční maximum v oblasti 270 nm (Graf 1). Toto zjištění bylo v souladu s již publikovanými daty, která předpokládala silný absorpční pás kolem 275 nm (Herrmann, 2012). V případě látky **2** došlo k posunu absorpčního maxima do 305 nm (viz Příloha 1).



Graf 1. Absorpční spektrum látky 1.

Látky vybrané pro stabilitní studie (**1** a **3**) byly rozpuštěny v 60% EtOH (finální koncentrace 1 mM) a ozařovány v rozmezí 254-300 nm pomocí skenovacího spektrofotometru (20 skenů). TLC analýza připravených látek a standardů v mobilní fázi chloroform/MeOH (9:1) prokázala po ozáření vznik volných CKs ($R_f - iP = 0,34$, BAP = 0,34) z caged-CKs ($R_f - \mathbf{1} = 0,74$, $\mathbf{3} = 0,68$). Deprotekce však neprobíhala kvantitativně, jelikož kromě minoritního podílu aktivního CKs byla pozorována i výchozí látka, což je možné přisuzovat nedostatečné intenzitě světelného zdroje.

K odstranění chránící skupiny byly použity i jiné zdroje UV záření – ruční lampa Camag (254 nm a 365 nm, 8 W) a lampa Blak-Ray B-100AP (UVP, 365 nm, 100 W). Testované roztoky byly umístěny na Petriho miskách ve vzdálenosti 1 cm od světelného zdroje a ozařovány po dobu 1 h. Při porovnání se standardy byl pozorován vznik malého množství aktivní látky pouze v případě vzorku **3** ozařovaném světlem o vlnové délce 254 nm.

4.3 Biologická aktivita

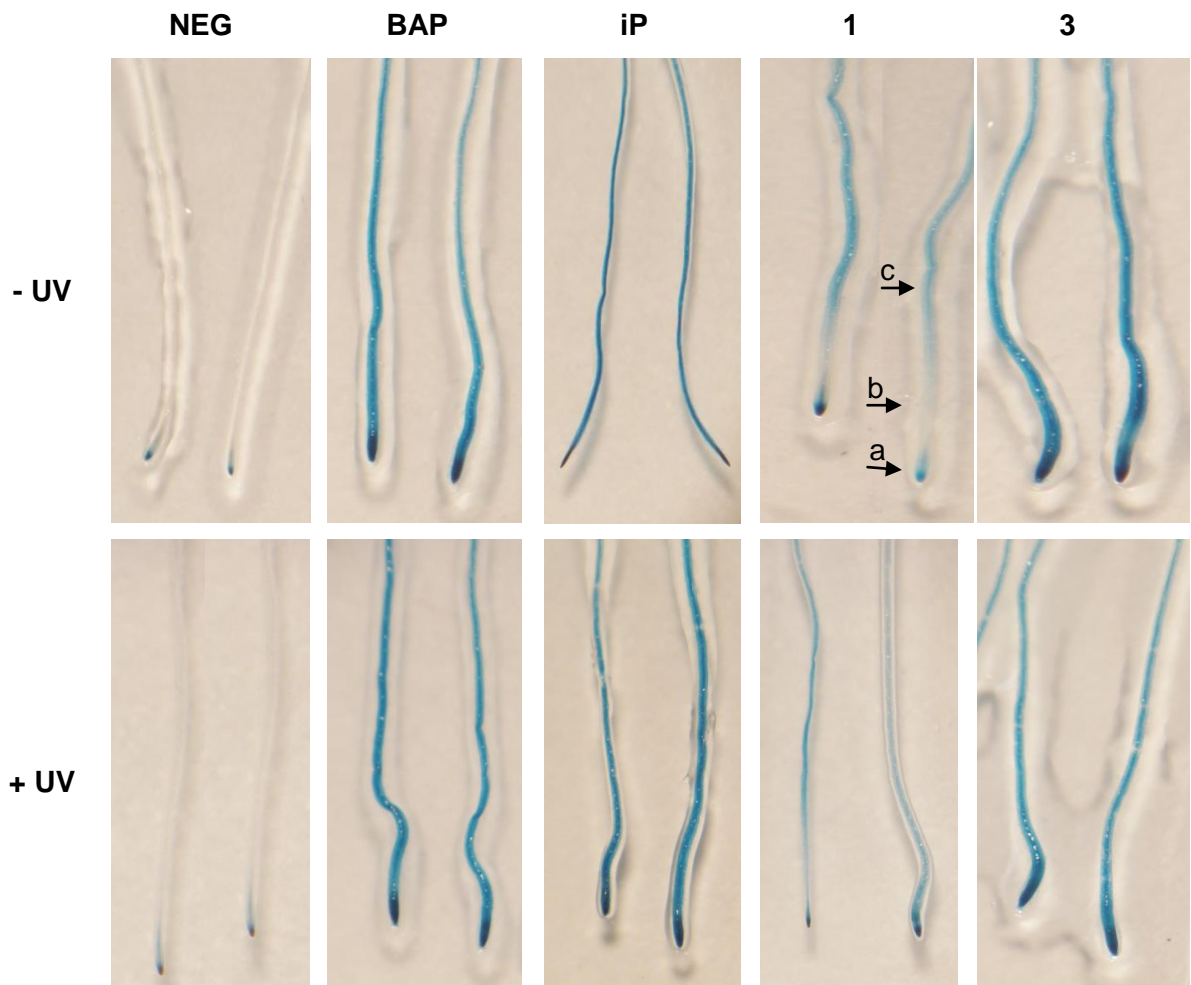
Pro *in vivo* testování biologické aktivity caged-CKs a úspěšnosti jejich fotolýzy byla použita transgenní reportérová linie rostlin *A. thaliana* *ARR5::GUS*. Tato linie obsahuje gen pro β -glukuronidasu (GUS), která je pod kontrolou cytokinin-inducibilního promotoru *ARR5*. V přítomnosti CKs dochází k aktivaci exprese GUS v závislosti na jejich koncentraci. Pro histochemickou lokalizaci GUS exprese se využívá chromogenní substrát X-Gluc, který po rozštěpení β -glukuronidasou poskytuje modré zbarvení (Stomp, 1992).

Pětidenní semenáčky byly umístěny po čtyřech do dvanáctijamkové desky s připravenými médii obsahujícími testované látky (20 μ M, 0,1 % DMSO) a byly kultivovány 16 h při 24 °C. Po přidání substrátu X-Gluc byly rostliny inkubovány 20 minut pod vakuem a poté 1 h za laboratorní teploty. Vizualizace exprese GUS v kořenové části rostlin probíhala pod mikroskopem při 20násobném zvětšení. Jako negativní kontrola sloužilo MS médium s přidavkem DMSO (finální koncentrace 0,1 %), pozitivními kontrolami byly roztoky iP a BAP v MS médiu (20 μ M, 0,1 % DMSO). Pro porovnání aktivity caged-CKs a volných CKs byla polovina médií před kultivací vystavena UV záření (20 skenů v rozsahu 254-300 nm) a druhá polovina roztoků zůstala neozářená.

V případě negativní kontroly bylo pozorováno modré zbarvení v těsné blízkosti kořenové špičky, v místě aktivního dělení buněk, ve které dochází k biosyntéze endogenních CKs (Obr. 9a). U obou pozitivních kontrol (iP, BAP) došlo ke vzniku modré barvy po celé délce kořene nezávisle na vystavení UV záření.

Aplikace testovaných látek (**1** a **3**) však neposkytovala příliš jasné výsledky. Modré zbarvení celého kořene se v případě vzorku **3** vyvinulo jak následkem působení UV světla, tak i bez jeho přítomnosti. Zjištěné výsledky nepotvrdily předpoklady o *N9*-substituovaných derivátech, jelikož by tyto látky neměly být schopné interagovat s CK receptory a stimulovat tak expresi β -glukuronidasy (Mik a kol., 2011). V důsledku nedostatku času byl však tento test proveden pouze jednou a pro ověření tohoto pozorování je nezbytné experiment zopakovat.

V případě rostlin kultivovaných v neozářeném médiu s obsahem látky **1** byla aktivita β -glukuronidasy pozorována v oblasti aktivního kořenového meristému a také následně ve vodivém pletivu. Modré zbarvení se však nenacházelo v prodlužovací a diferenciací zóně (Obr. 9b). Naopak u rostlin kultivovaných v médiu s přidavkem ozářeného roztoku látky **1** byla patrná exprese GUS v celém kořenu, což svědčí o přítomnosti aktivních CKs vzniklých odštěpením chránící skupiny. Stejného pozorování bylo dosaženo u pozitivní kontroly, přičemž všechny tyto informace jsou v souladu s daty publikovanými v článku Hayashi a kol., 2012.



Obr. 9. Výsledky histochemické lokalizace β -glukuronidasy v kořenech *A. thaliana*. –UV – neozářená kultivační média, +UV – ozářená kultivační média, NEG – negativní kontrola, a – zóna aktivního dělení buněk, b – prodlužovací zóna, c – cévní svazky.

Získané výsledky především u látky **1** potvrzují možné využití těchto sloučenin pro studium biologických procesů spojených s metabolismem či signalizací CKs. Aplikací dostatečně úzkého světelného svazku může potenciálně docházet ke vzniku aktivních molekul pouze v konkrétních buňkách, v nichž lze poté sledovat reakce na přítomnost dané látky. V rámci dalšího výzkumu je však nutné optimalizovat proces fotolýzy chránicí skupiny použitím vhodnějších světelných zdrojů s požadovanými vlnovými délkami a přiměřenou intenzitou záření. U biologického testování (*ARR5::GUS* test) je třeba upravit podmínky inkubace rostlin v médiu s testovanými látkami a zároveň také nalézt vhodný časový interval pro kultivaci semenáčků v roztoku s chromogenním substrátem.

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla zpracována literární rešerše zaměřená na téma cytokininů a fotolabilní chránící skupiny. V teoretické části byly shrnuty vlastnosti a funkce těchto fytohormonů. Dále byl vypracován přehled používaných fotolabilních chránících skupin s jejich aplikacemi v biologických systémech. V experimentální části byly připraveny deriváty cytokininů s 2-nitrobenzylou chránící skupinou v pozici N9, přičemž u dvou z nich byla testována jejich stabilita vůči UV záření. Biologická aktivita vybraných produktů byla dále zkoumána pomocí *ARR5::GUS* cytokininového testu.

Předpokládaná konverze neaktivního caged-cytokininu na aktivní molekulu po ozáření UV světlem byla pozorována pouze v případě látky **1**. Cytokinin aktivovaná exprese β -glukuronidasy byla lokalizována v meristematické zóně kořenové špičky a dále v cévních svazcích. Po ozáření došlo k zabarvení kořene po celé délce, včetně prodlužovací a diferenciací zóny. U produktu **3** nebylo dosaženo dostatečného rozdílu mezi intenzitou zbarvení kořenů rostlin kultivovaných v ozářeném a neozářeném médiu.

Pro zvýšení průkaznosti těchto výsledků je však nutné experimenty zopakovat a optimalizovat proces fotolýzy a *ARR5::GUS* test. Kromě syntézy dalších caged-cytokininů a jejich derivátů se jako vhodná možnost jeví použití jiných fotolabilních chránících skupin, které by danou biomolekulu uvolňovaly rychleji, nebo by bylo možné navodit jejich fotolýzu pomocí záření s odlišnými vlnovými délkami.

6 Seznam použité literatury

Agasti S. S., Chompoosor A., You C.-C., Ghosh P., Kim C. K., Rotello V. M. (2009) Photoregulated release of caged anticancer drugs from gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5728-+.

Albini A., Dichiarante V. (2009) The 'belle époque' of photochemistry. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 248-254.

Astot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H., Sandberg G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14778-83.

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

Banerjee A., Falvey D. E. (1997) Protecting groups that can be removed through photochemical electron transfer: Mechanistic and product studies on photosensitized release of carboxylates from phenacyl esters. *J. Org. Chem.* **62**, 6245-6251.

Banerjee A., Falvey D. E. (1998) Direct photolysis of phenacyl protecting groups studied by laser flash photolysis: An excited state hydrogen atom abstraction pathway leads to formation of carboxylic acids and acetophenone. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2965-2966.

Banerjee A., Lee K., Falvey D. E. (1999) Photoreleasable protecting groups based on electron transfer chemistry. Donor sensitized release of phenacyl groups from alcohols, phosphates and diacids. *Tetrahedron* **55**, 12699-12710.

Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F. C., Rattan S. I. S. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *Febs Lett.* **393**, 197-200.

Barltrop J. A., Schofield P. (1965) 883. Organic photochemistry. Part II. Some photosensitive protecting groups. *J. Chem. Soc.* 4758.

Barton D. H. R., Sammes P. G., Weingart G. G. (1971) Photochemical transformations. 28. Aryl azides as potential photosensitive protecting groups. *J. Chem. Soc. C* 721-&.

Bochet C. G. (2002) Photolabile protecting groups and linkers. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* 125-142.

Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P. O., Nam H. G., Lin J. F., Wu S. H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C. J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways

between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant J.* **42**, 567-585.

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

Canepari M., Nelson L., Papageorgiou G., Corrie J. E. T., Ogden D. (2001) Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolyl- and 4-methoxy-7-nitroindolyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters. *J. Neurosci. Meth.* **112**, 29-42.

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

Conrad P. G., Givens R. S., Weber J. F. W., Kandler K. (2000) New phototriggers: Extending the *p*-hydroxyphenacyl π - π^* absorption range. *Org. Lett.* **2**, 1545-1547.

Corrie J. E. T., Furuta T., Givens R., Yousef A. L., Goeldner M. (2005) Photoremovable protecting groups used for the caging of biomolecules. In *Dynamic studies in biology: Phototriggers, photoswitches and caged biomolecules* (Goeldner M., Givens R., ed.), str. 1-94, Wiley-WCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.

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

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

Ellis-Davies G. C. R. (2007) Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods* **4**, 619-628.

Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375-381.

Francis D., Sorrell D. A. (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: A mini review. *Plant Growth Regul.* **33**, 1-12.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortova J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.

Furuta T., Takeuchi H., Isozaki M., Takahashi Y., Kanehara M., Sugimoto M., Watanabe T., Noguchi K., Dore T. M., Kurahashi T., Iwamura M., Tsien R. Y. (2004) Bhc-cNMPs as

either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one- and two-photon excitation. *ChemBioChem* **5**, 1119-1128.

Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortova J., Šebela M., Frébort I. (2008) Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In *Bioactive natural products, vol. 34 studies in natural products chemistry* (UrRahman A., ed.), str. 203-264, Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands.

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

Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., 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. Chromatogr. B.* **829**, 26-34.

Geibel S., Barth A., Amslinger S., Jung A. H., Burzik C., Clarke R. J., Givens R. S., Fendler K. (2000) P-3- 2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo ethyl ATP for the rapid activation of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophys. J.* **79**, 1346-1357.

Givens R. S., Matuszewski B. (1984) Photochemistry of phosphate-esters - an efficient method for the generation of electrophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6860-6861.

Givens R. S., Weber J. F. W., Conrad P. G., Orosz G., Donahue S. L., Thayer S. A. (2000) New phototriggers 9: p-hydroxyphenacyl as a C-terminal photoremovable protecting group for oligopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2687-2697.

Hake S., Smith H. M. S., Holtan H., Magnani E., Mele G., Ramirez J. (2004) The role of knox genes in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.* **20**, 125-151.

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

Hellrung B., Kamdzhilov Y., Schworer M., Wirz J. (2005) Photorelease of alcohols from 2-nitrobenzyl ethers proceeds via hemiacetals and may be further retarded by buffers intercepting the primary aci-nitro intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8934-8935.

Herrmann A. (2012) Using photolabile protecting groups for the controlled release of bioactive volatiles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 446-59.

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

- Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* **138**, 196-206.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75-83.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J., Wareing P. F. (1975) New cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.
- Hwang I., Sheen J. (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Il'ichev Y. V., Schworer M. A., Wirz J. (2004) Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: Methyl ethers and caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4581-4595.
- Kakimoto T. (1996) Cki1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.
- Kang N. Y., Cho C., Kim J. (2013) Inducible expression of Arabidopsis response regulator 22 (ARR22), a type-C ARR, in transgenic Arabidopsis enhances drought and freezing tolerance. *Plos One* **8**, e79248.
- Kao J. P. Y. (2006) Caged molecules: Principles and practical considerations. In *Current protocols in neuroscience* (Crawley J. N., ed.), str. 6.20.1-6.20.21, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Kepinski S. (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 28-34.
- Kikuchi Y., Nakanishi J., Shimizu T., Nakayama H., Inoue S., Yamaguchi K., Iwai H., Yoshida Y., Horiike Y., Takarada T., Maeda M. (2008) Arraying heterotypic single cells on photoactivatable cell-culturing substrates. *Langmuir* **24**, 13084-13095.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 814-819.
- Klán P., Zabadal M., Heger D. (2000) 2,5-dimethylphenacyl as a new photoreleasable protecting group for carboxylic acids. *Org. Lett.* **2**, 1569-1571.

Knorre D. G., Godovikova T. S. (1998) Photoaffinity labeling as an approach to study supramolecular nucleoprotein complexes. *Febs Lett.* **433**, 9-14.

Koetting C., Gueldenhaupt J., Gerwert K. (2012) Time-resolved ftir spectroscopy for monitoring protein dynamics exemplified by functional studies of ras protein bound to a lipid bilayer. *Chem. Phys.* **396**, 72-83.

Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53-60.

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

Lara M. E. B., Garcia M. C. G., Fatima T., Ehness R., Lee T. K., Proels R., Tanner W., Roitsch T. (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* **16**, 1276-1287.

Laureys F., Dewitte W., Witters E., Van Montagu M., Inze D., Van Onckelen H. (1998) Zeatin is indispensable for the G(2)-M transition in tobacco BY-2 cells. *Febs Lett.* **426**, 29-32.

Lee H.-J., Park S.-H., Seo S.-Y., Cho Y.-M., Woo H. D., Ito Y., Son T.-I. (2013) Preparation of photoreactive azidophenyl hyaluronic acid derivative: Protein immobilization for medical applications. *Macromol. Res.* **21**, 216-220.

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

Lu M., Fedoryak O. D., Moister B. R., Dore T. M. (2003) Bhc-diol as a photolabile protecting group for aldehydes and ketones. *Org. Lett.* **5**, 2119-2122.

Ma C. S., Kwok W. M., Chan W. S., Du Y., Kan J. T. W., Toy P. H., Phillips D. L. (2006) Ultrafast time-resolved transient absorption and resonance raman spectroscopy study of the photodeprotection and rearrangement reactions of p-hydroxyphenacyl caged phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2558-2570.

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

Mik V., Szüčová L., Spíchal L., Plíhal O., Nisler J., Zahajská L., Doležal K., Strnad M. (2011) N9-substituted N-6-(3-methylbut-2-en-1-yl)amino purine derivatives and their biological activity in selected cytokinin bioassays. *Bioorgan. Med. Chem.* **19**, 7244-7251.

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

Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* **37**, 128-138.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16598-16603.

Mok D. W. S., Mok M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. In *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, str. 89-118, Annual Reviews, Palo Alto, California, USA.

Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Shudo K., Isogai Y., Okamoto T. (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511.

Mor Y., Spiegelstein H., Halevy A. H. (1983) Inhibition of ethylene biosynthesis in carnation petals by cytokinin. *Plant Physiol.* **71**, 541-546.

Mougel C., 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.

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

Papageorgiou G., Ogden D. C., Barth A., Corrie J. E. T. (1999) Photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in aqueous solution: Rapid and efficient photorelease of L-glutamate. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6503-6504.

Peach J. M., Pratt A. J., Snaith J. S. (1995) Photolabile benzoin and furoin esters of a biologically-active peptide. *Tetrahedron* **51**, 10013-10024.

Pelliccioli A. P., Wirz J. (2002) Photoremovable protecting groups: Reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 441-458.

Persson B. C., Esberg B., Ólafsson O., Björk G. R. (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in transfer-RNA. *Biochimie* **76**, 1152-1160.

Pirrung M. C., Bradley J.-C. (1994) Dimethoxybenzoin carbonates: Photochemically-removable alcohol protecting groups suitable for phosphoramidite-based DNA synthesis. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **208**, 198.

Rashotte A. M., Mason M. G., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. (2006) A subset of Arabidopsis ap2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11081-11085.

Redig P., Shaul O., Inze D., VanMontagu M., VanOnckelen H. (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *Febs Lett.* **391**, 175-180.

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

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

Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmard A., Murray J. A. H. (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.

Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.

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

Sheehan J. C., Umezawa K. (1973) Phenacyl photosensitive blocking groups. *J. Org. Chem.* **38**, 3771-3774.

Schade B., Hagen V., Schmidt R., Herbrich R., Krause E., Eckardt T., Bendig J. (1999) Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 1. Photocleavage of (7-methoxycoumarin-4-yl)methyl-caged acids with fluorescence enhancement. *J. Org. Chem.* **64**, 9109-9117.

Singh S., Letham D. S., Palni L. M. S. (1992) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. 8. Translocation, metabolism and biosynthesis of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiol. Plantarum* **86**, 398-406.

Smart C. M., Scofield S. R., Bevan M. W., Dyer T. A. (1991) Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with tmr, a gene for cytokinin production in Agrobacterium. *Plant Cell* **3**, 647-656.

Spiess L. D. (1975) Comparative activity of isomers of zeatin and ribosyl-zeatin on *funaria-hygrometrica*. *Plant Physiol.* **55**, 583-585.

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

Stomp A.-M. (1992) Histochemical localization of β -glucuronidase. In *Gus protocols: Using the gus gene as a reporter of gene expression* (Gallagher S. R., ed.), str. 103-113, Academic Press, INC., San Diego, California, USA.

Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plantarum* **101**, 674-688.

Suzuki T., Ishikawa K., Yamashino T., Mizuno T. (2002) An Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer (Hpt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: Overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant Cell Physiol.* **43**, 123-129.

Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.

Takahashi S., Shudo K., Okamoto T., Yamada K., Isogai Y. (1978) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-(4-pyridyl)urea derivatives. *Phytochemistry* **17**, 1201-1207.

Takaoka K., Tatsu Y., Yumoto N., Nakajima T., Shimamoto K. (2003) Synthesis and photoreactivity of caged blockers for glutamate transporters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 965-970.

Takaoka K., Tatsu Y., Yumoto N., Nakajima T., Shimamoto K. (2004) Synthesis of carbamate-type caged derivatives of a novel glutamate transporter blocker. *Bioorgan. Med. Chem.* **12**, 3687-3694.

Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol. Plantarum* **117**, 579-590.

Thirlwell H., Corrie J. E. T., Reid G. P., Trentham D. R., Ferenczi M. A. (1994) Kinetics of relaxation from rigor of permeabilized fast-twitch skeletal fibers from the rabbit using a novel caged-ATP and apyrase. *Biophys. J.* **67**, 2436-2447.

To J. P. C., Deruere J., Maxwell B. B., Morris V. F., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. (2007) Cytokinin regulates type-A Arabidopsis response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901-3914.

Turner J. E., Mok D. W. S., Mok M. C., Shaw G. (1987) Isolation and partial-purification of an enzyme catalyzing the formation of o-xylosylzeatin in *Phaseolus-vulgaris* embryos. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3714-3717.

Wang T. L., Horgan R. (1978) Dihydrozeatin riboside, a minor cytokinin from leaves of *Phaseolus-vulgaris* l. *Planta* **140**, 151-153.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-50.

Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10487-10492.

Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-38.

Williams D. B. G., Lawton M. (2010) Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-4.

Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017-1023.

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

Yu H., Li J., Wu D., Qiu Z., Zhang Y. (2010) Chemistry and biological applications of photo-labile organic molecules. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 464-73.

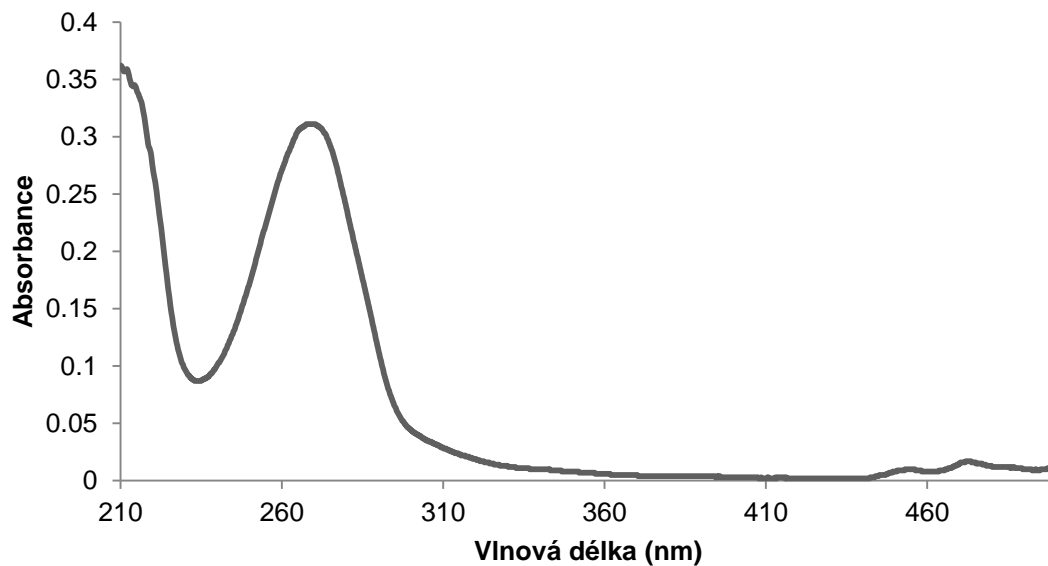
Zabadal M., Klán P. (2001) Fotolabilní chránicí skupiny. *Chem. Listy* **95**, 694-699.

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

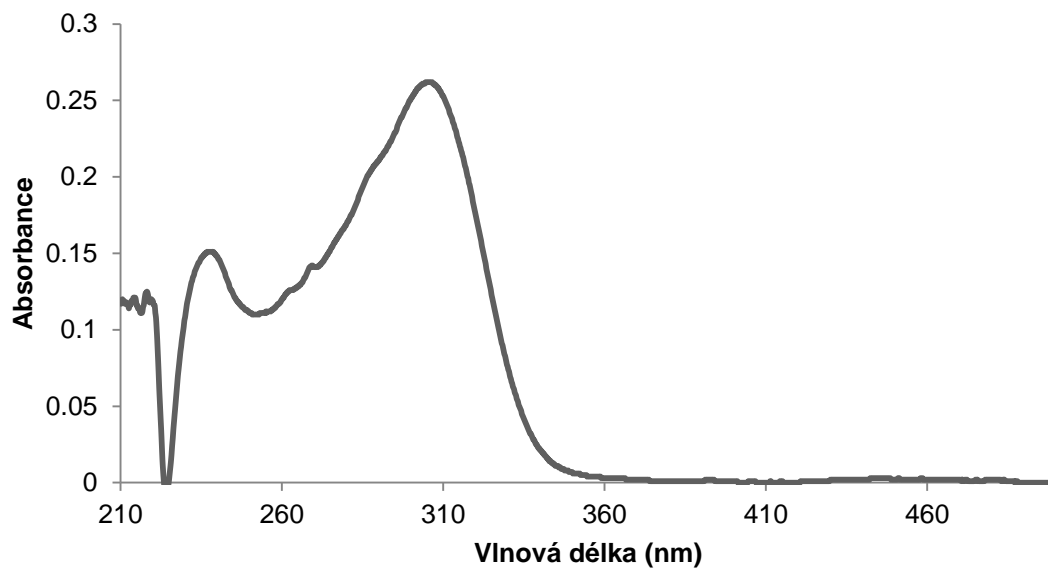
Zhang K., Letham D. S., John P. C. L. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34(cdc2)-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.

7 Přílohy

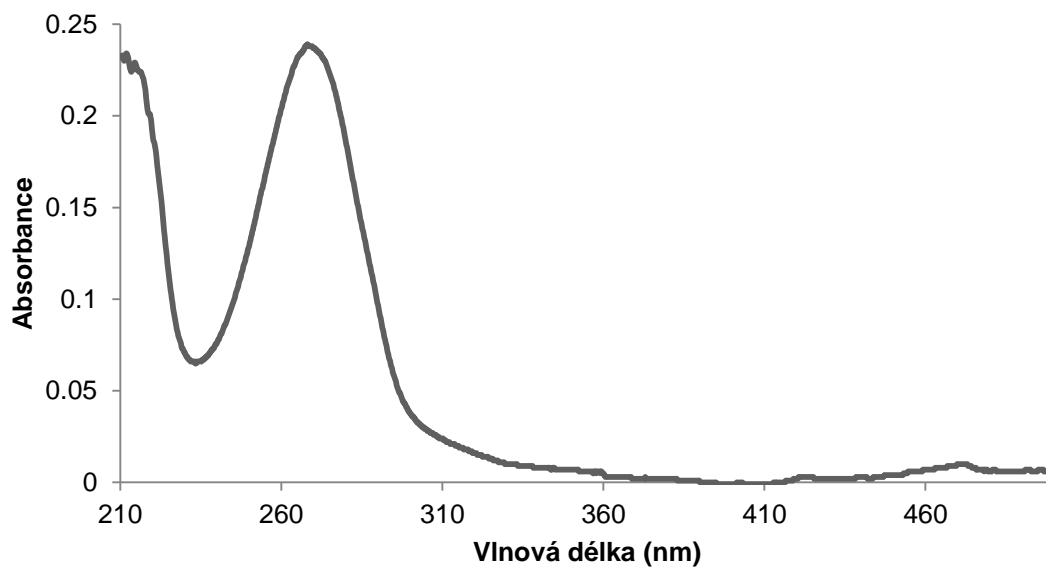
7.1 Příloha 1 - Absorpční spektra připravených látek



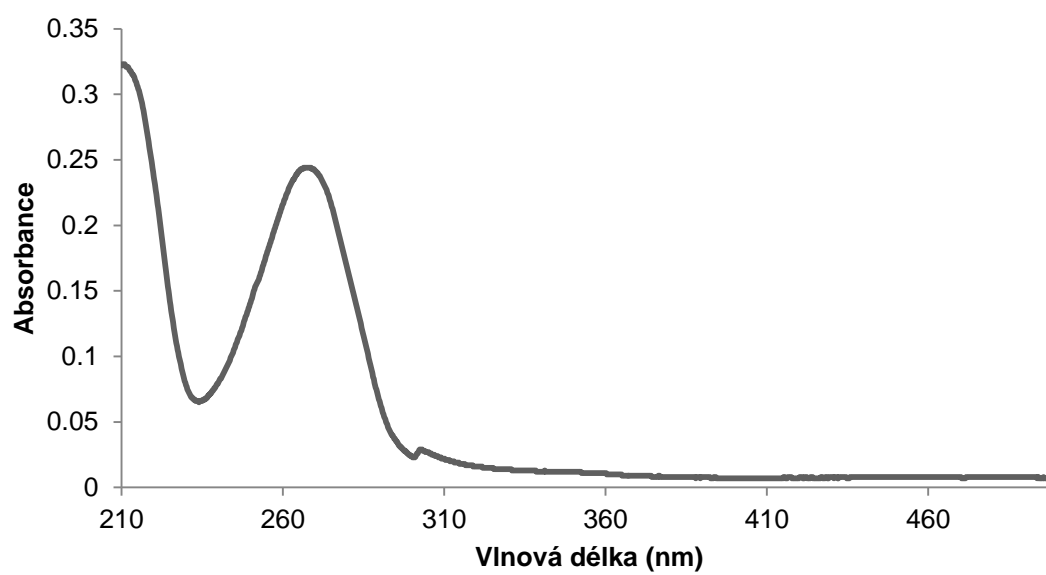
Graf 2. Absorpční spektrum látky 1 – absorpční maximum pozorováno při 268 nm.



Graf 3. Absorpční spektrum látky 2 – absorpční maximum pozorováno při 305 nm.



Graf 4. Absorpční spektrum látky 3 – absorpční maximum pozorováno při 268 nm.



Graf 5. Absorpční spektrum látky 5 – absorpční maximum pozorováno při 270 nm.