

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava a charakterizace fluorescenčně značených derivátů aromatických cytokininů, zejména kinetinu, a jejich biologická aktivita

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Martin Tkáč
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Plíhalová (roz. Szüčová), Ph.D.
Termín odevzdání:	30.4.2014

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Děkuji Mgr. Lucii Plíhalové (roz. Szüčové), Ph.D. za vedení, všechny odborné rady a ochotu s jakou se mé práci věnovala. Dále také všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a hlavně Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. a Mgr. Tomáši Pospíšilovi, D.E.A., Ph.D. za jejich odborné rady a pomoc při práci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Martin Tkáč
Název práce	Příprava a charakterizace fluorescenčně značených derivátů aromatických cytokininů, zejména kinetinu, a jejich biologická aktivita
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Plíhalová (roz. Szüčová), Ph.D.
Rok obhajoby	2014
Abstrakt	<p>Předkládaná diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací derivátů kinetinu a jejich následným fluorescenčním značením.</p> <p>Teoretická část práce pojednává o všech cytokininech, jejich dělení a struktuře, výskytu a vlastnostech. Dále také detailně o kinetinu, jsou popsány jeho fyzikální vlastnosti, struktura a jeho biologické působení na samotné buňky, živočichy a celé rostliny.</p> <p>Praktická část popisuje laboratorní přípravu derivátů kinetinu a jejich fluorescenční značení. Následně jsou uvedeny biologické testy, v nichž byly připravené látky testovány.</p> <p>Poslední část je tvořena výsledky biologických testů a jejich následným zhodnocením v diskuzi.</p>
Klíčová slova	Cytokinin, kinetin, deriváty kinetinu, biologická aktivita
Počet stran	77
Počet příloh	11
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Martin Tkáč
Title	Synthesis and characterization of fluorescently labeled derivatives of aromatic cytokinins, especially kinetin, and their biological activity
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators Faculty of Science University of Palacký Olomouc
Supervisor	Mgr. Lucie Plíhalová (born Szüčová), Ph.D.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Presented diploma thesis concerned with preparation and characterization of kinetin derivatives and their followed fluorescent labeling.</p> <p>Theoretical part of thesis deals with all cytokinins, their division and structure, occurrence and properties. After that, thesis deals with kinetin in detail, its physical properties, structure and biological influence of as such cells, animals and whole plants are described.</p> <p>Practical part of thesis describes laboratory preparation of kinetin derivatives and their fluorescent labeling. After that, biotests in which prepared substances were tested, are presented.</p> <p>Final part is created by result of biotests and by their followed evaluation in discussion.</p>
Keywords	Cytokinins, kinetin, kinetin derivatives, biological activity
Number of pages	77
Number of appendices	11
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 Cytokininy.....	11
1.1.1 Obecné informace	11
1.1.2 Rozdělení cytokininů	12
1.1.3 Cytokininový „signalling“	16
1.1.4 Transport cytokininů.....	18
1.2 Kinetin.....	20
1.2.1 Obecné informace a výskyt.....	20
1.2.2 Struktura kinetinu	20
1.2.3 Biosyntéza kinetinu.....	22
1.2.4 Biologické vlastnosti kinetinu	24
1.2.5 Efekt kinetinu na buněčné úrovni	25
1.2.6 Efekt kinetinu na úrovni celé rostliny a na oddělených pletivech	27
1.2.7 Působení kinetinu na živočichy	30
1.2.8 N9 substituované deriváty kinetinu: kinetin ribosid.....	31
1.3 Fluorescenční značení cytokininů	33
1.3.1 Fluorescenční značky.....	33
1.4 Mikrovlnný reaktor CEM Discover SP.....	35
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
2.1 Materiál a metody	37
2.1.1 Chemikálie	37
2.1.2 Metody	37
2.1.3 Biotesty připravených látek	38
2.2 Syntéza	41

2.2.1	Syntéza 2-chloro-6-furfurylamino-9H-purinu (A).....	41
2.2.2	Syntéza 2-[(2-aminoethyl)amino]-6-furfurylamino-9H-purinu (B)	41
2.2.3	Syntéza 2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-ethyl-6-furfurylamino-9H-purinu (C)	42
2.2.4	Syntéza 2-[(2-aminobutyl)amino]-6-furfurylamino-9H-purinu (D).....	43
2.2.5	Syntéza 2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-butyl-6-furfurylamino-9H-purinu (E)	43
2.2.6	Syntéza 2-chloro-6-(azepan-1-yl)-9H-purinu (F).....	44
2.2.7	Syntéza 2-(ethan-1,2-diamin)-6-(azepan-1-yl)-9H-purinu (G)	44
2.2.8	Syntéza 2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-ethyl-6-(azepan-1-yl)-9H-purinu (H).....	45
2.2.9	Syntéza 2-(ethan-1,2-diamin)-6-(azepan-1-yl)-9H-purinu značeného Rhodaminem B (I).....	45
2.2.10	Syntéza 2-chloro-6-(azepan-1-yl)-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)purinu (J)	46
2.2.11	Syntéza 2-aminoethyl-6-(azepan-1-yl)-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)purinu (K)	47
2.2.12	Syntéza 2-aminoethanol-6-(azepan-1-yl)-9H-purinu (L)	47
2.2.13	Syntéza 2-chlor-6-(piperidin-1-yl)-9H-purinu (M)	48
2.2.14	Syntéza 2-(ethan-1,2-diamin)-6-(piperidin-1-yl)-9H-purinu (N)	48
3	VÝSLEDKY.....	49
3.1	Syntéza látek	49
3.1.1	Látka A	49
3.1.2	Látka B	49
3.1.3	Látka C	49
3.1.4	Látka D	50
3.1.5	Látka E	50
3.1.6	Látka F	50
3.1.7	Látka G	50

3.1.8	Látka H	50
3.1.9	Látka I	51
3.1.10	Látka J	51
3.1.11	Látka K	51
3.1.12	Látka L	51
3.1.13	Látka M	52
3.1.14	Látka N	52
3.2	Cytokininové biotesty	54
3.2.1	Amarantový biotest.....	54
3.2.2	Senescenční biotest	55
3.2.3	Kalusový biotest	56
3.3	Receptorový test.....	57
3.4	Kinásový test na lidských kožních buňkách a testování cytotoxicity	58
3.5	Testování cytotoxicity na lidských diploidních fibroblastech	59
4	DISKUZE	60
4.1	Cytokininové biotesty	60
4.2	Receptorový test.....	63
4.3	Kinásový test na lidských kožních buňkách a testování cytotoxicity	63
4.4	Testování cytotoxicity na lidských diploidních fibroblastech	64
	ZÁVĚR	65
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67
	INTERNETOVÝ ZDROJ	71
	PŘÍLOHY	72

CÍLE PRÁCE

1. Rešerše zvoleného předmětu diplomové práce v literatuře, zejména rešerše přípravy derivátů aromatických cytokininů a derivátů kinetinu, dále pak biologických vlastností těchto derivátů.
2. Příprava sady fluorescenčně značených látek s konkrétní změnou v C2 a C6 substituentu purinového skeletu a srovnání jejich biologických aktivit a porovnání s volnými bázemi cytokininů a samotného kinetinu.
3. Srovnání efektivity syntézy klasické se syntézou těchto látek a jejich prekurzorů v mikrovlnném reaktoru, zvážení výhod/nevýhod použití těchto reaktorů pro praxi přípravy biologicky aktivních nebo fluorescenčně značených látek.

ÚVOD

Cytokininy, které jsou také označovány jako mobilní fytohormony, jsou zapojeny v mnoha biologických pochodech, jež probíhají v rostlinách. Značně ovlivňují zejména senescenci listů, působí na růst a vývoj rostlin, významný vliv mají také na signalizaci, dělení kořene a apikální dominanci (Hirose a kol., 2008). Dále jsou cytokininy zapojeny v dělení a vývoji chloroplastů, klíčení semen, vývoji plodu a květu a dělení buněk (Griffaut a kol., 2004). Z chemického hlediska je velká skupina přirozeně se vyskytujících cytokininů N6-substituovanými deriváty adeninu. Jako takové byly poprvé objeveny již v průběhu 50. let minulého století (Barciszewski a kol., 2006). Celou skupinu cytokininů lze rozdělit na základě struktury postranního řetězce na isoprenoidní cytokininy, z nichž lze jako významné zástupce jmenovat isopentenyladenin, zeatin a jejich deriváty. Druhou skupinu tvoří aromatické cytokininy, jejichž zástupci jsou zejména kinetin, benzylaminopurin, topolin a také jejich deriváty (Strnad, 1997).

V roce 1995 došlo k izolaci prvního přirozeně se vyskytujícího cytokininu, a to kinetinu. Získán byl jako produkt rozkladu DNA. Vlastní molekulu tohoto cytokininu tvoří adenin, jenž je substituován furfurylem v poloze N6 (Barciszewski a kol., 1997). U kinetinu bylo zjištěno velké množství funkcí, účinkuje jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celé rostliny a určité účinky má i na živočichy. Působí jako anti-oxidant, a to jak *in-vitro* tak *in-vivo*, tím, že inhibuje vznik 8-oxo-dG (Barciszewski a kol., 2006). Významnou funkcí kinetinu je jeho *anti-aging* aktivita. Prokázalo se, že zpomaluje senescenci rostlin a vývoj hmyzu. Zároveň také oddaluje stárnutí lidských fibroblastů a kožních endoteliálních buněk (Bo-Hwa Choi a kol., 2008). Z mnoha dalších rozličných funkcí a vlastností kinetinu lze jmenovat jeho vliv na transkripci rRNA. Při jeho exogenní aplikaci dochází k zvýšené transkripci rRNA, což bylo prokázáno u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Kinetin je schopen ovlivňovat i buněčný cyklus, a to prostřednictvím zvýšení aktivity cyklin-dependentní kinasy cdk2, na níž je buněčný cyklus závislý. Účinkem kinetinu na rostliny dochází k oddálení listové senescence, je schopen chránit rostliny před patogeny a stresovými vlivy, a v neposlední řadě také ovlivňovat otevírání rostlinných průduchů. Jak bylo již uvedeno výše, *anti-aging* aktivita kinetinu zpomaluje vývoj hmyzu, což bylo konkrétně prokázáno u octomilky *Zaprionus parvittiger*, čímž se celkově prodlouží délka života jedince. Dále má kinetin

schopnost pozitivně působit na srdeční sval tzv. inotropním efektem, a je schopen zvýšit srdeční činnost (Barciszewski a kol, 1999). Významným derivátem je také kinetin ribosid, cukerný derivát kinetinu. Díky cukerné bázi se vyznačuje specifickými vlastnostmi oproti kinetinu. Velmi významným je jeho cytotoxický účinek na buněčné linie nádorových buněk (Bo-Hwa Choi a kol., 2008)

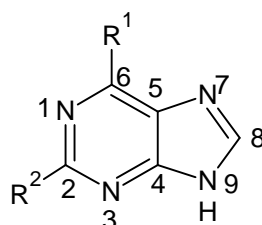
Tato práce by měla sloužit jako shrnutí nejvýznamnějších znalostí o dané problematice, a především k vytvoření skupiny nových derivátů kinetinu se substitucí v poloze C2 a C6 purinového skeletu. Připravené látky budou otestovány v řadě biotestů a bude stanovena jejich biologická aktivita. Výsledkem práce bude porovnání vztahu mezi zjištěnou biologickou aktivitou a strukturou daných látek.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cytokininy

1.1.1 Obecné informace

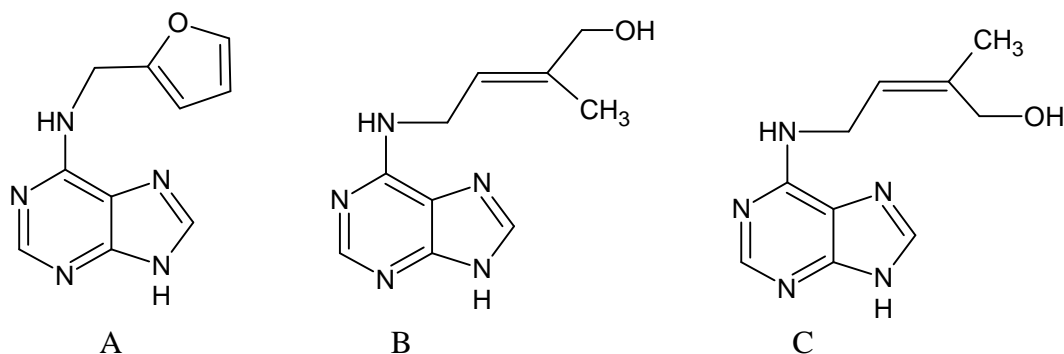
Cytokininy purinového typu byly poprvé objeveny v 50. letech 19. století (Barciszewski a kol., 2006). Jsou to rostlinné hormony, z chemického hlediska se jedná o C6-substituované deriváty purinů (Bo-Hwa Choi a kol., 2008). Přirozeně se vyskytující cytokininy mohou být dále modifikovány substitucí na dusíkových atomech, a to v pozicích N1, N3, N7 a N9, ale také na uhlíkových atomech C2, C6 a C8 (**Obrázek 1**) (Galuzska a kol., 2008).



Obrázek 1: Schéma struktury molekuly purinu s číselným označením jednotlivých atomů.

Bylo prokázáno, že tyto cytokininy hrají velmi důležitou roli v postembryonálním růstu a ve vývoji rostlin. Potvrdil se také jejich vliv na klíčení semen, dělení a vývoj chloroplastů, de-etiolizaci, apikální dominanci, interakce rostlinapato-gen, vývoj plodů a květů, indukci buněčného dělení a tvorbu výhonků. Dále jsou zapojeny v mnoha dalších pochodech, jako je inhibice listové senescence, inhibice prodlužování buněk v kmenech a kořenech, indukce tvorby vedlejších výhonků v přídatných pupenech a také indukce exprese celé řady genů obsažených v chloroplastech (Griffaut a kol., 2004). Jsou také klíčovými faktory při tvorbě tumorů u rostlin (Sugawara a kol., 2007). Všechny zmíněné pochody jsou však ovlivňovány mnoha dalšími stimuly, jako například světlem, jinými hormony atd. Cytokininy působí v kooperaci spolu s těmito jinými hormony (Griffaut a kol., 2004). Přesto, že funkce cytokininů v rostlinách je velmi dobře známa, mechanismus jejich účinku zcela znám není (Małeckí a kol., 2011). Do roku 2008 bylo z různých živých tkání izolováno kolem 50 různých sloučenin s prokázanou cytokininovou aktivitou, a zároveň byly syntetizovány stovky jejich analogů (Galuzska a kol., 2008). Prvním sloučenina, která

patřila mezi cytokininy, byl kinetin (**Obrázek 2**), objevený v roce 1955 jako produkt rozpadu DNA. Prvním objeveným přirozeně se vyskytujícím cytokininem v rostlinách byl zeatin (**Obrázek 2**), který byl izolován podstatně později než kinetin. Zeatin obsahuje isopentenylovou skupinu, která je odvozena od kyseliny mevalonové. Tato je prekurzorem pro více biologicky aktivních látek (Barciszewski a kol., 1997).



Obrázek 2: Schéma struktury molekul A) kinetin B) *trans*-zeatin C) *cis*-zeatin.

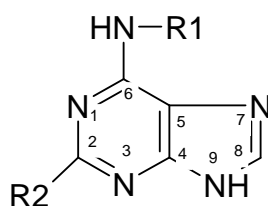
1.1.2 Rozdělení cytokininů

Přirozeně se vyskytující cytokininy se dělí do tří skupin na základě podobnosti chemické struktury. Jedná se o skupinu purinových isoprenoidních cytokininů (**Tabulka 1**), kam patří isopentenyladenin (zkratkou iP), zeatin (Z) a dihydrozeatin (DHZ), dále pak o skupinu aromatických purinových cytokininů, mezi něž náleží například benzyladenin (BA), topolin (lze jej dále dělit na *ortho*-topolin, zkratkou *oT*, *meta*-topolin, zkratkou *mT* a *para*-topolin, zkratkou *pT*) a methoxytopolin, kinetin a kinetin ribosid, třetí skupina je tvořena syntetickými deriváty s cytokininovou aktivitou (Bo-Hwa Choi a kol., 2008, Tarkowski, 2011).

Nejpočetnější skupinou cytokininů u všech zelených rostlin jsou isoprenoidní deriváty (**Tabulka 1**), mezi nimiž jsou nejčastějšími zástupci isopentenyladenin, jenž byl poprvé izolován z rostlinného patogenu *Corynebacterium fascians*. A dále pak zeatin, což je v podstatě hydroxylovaný derivát isopentanyladeninu. Molekula zeatinu tvoří dva geometrické izomery, *trans*-izomer (dlouho považován za aktivnější), a *cis*-izomer (Galuzska a kol., 2008). Bylo prokázáno, že tyto izomery se liší biologickou aktivitou. *trans*-zeatin vykazuje například vyšší efektivitu při oddálení senescence způsobené tmou než *cis*-forma, která naopak prokázala zesílení dělení tabákových

buněk kalusu (vyšší efektivita se prokázala při vyšších koncentracích *cis*-formy, kdy naopak efektivita *trans*-formy klesala) (Gajdošová a kol., 2011). Vyskytuje se i neaktivní forma zeatinu, což je tzv. dihydrozeatin, jenž je jeho analogem s nasyceným postranním řetězcem. Oproti tomu nebyl v přírodě nalezen analog isopentenyladeninu s nasyceným postranním řetězcem (Galuzska a kol., 2008).

Tabulka 1: Strukturní vzorce, názvy a zkratky vybraných isoprenoidních cytokininů (upraveno dle Tarkowski, 2011)

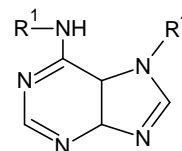
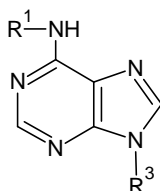
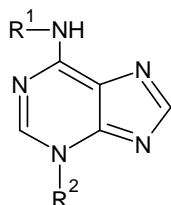


R ₁	R ₂	Název cytokininu	Zkratka
	H	Isopentenyladenin	iP
	H	<i>trans</i> -zeatin	<i>tZ</i>
	H	<i>cis</i> -zeatin	<i>cZ</i>
	H	Dihydrozeatin	DHZ

Aromatické purinové cytokininy (**Tabulka 2**) i jejich deriváty byly dlouhou dobu považovány za čistě syntetické produkty, později však došlo k jejich identifikaci v rostlinných pletivech. Prvním izolovaným cytokininem aromatického typu byl 6-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin, který byl identifikován ve zralých listech topolu, a později také v plodech *Zantedeschia aethiopica* (Strnad, 1997). Následně došlo k identifikaci mnoha dalších podobných látek, jenž dostaly společný triviální název topoliny (výše zmíněné *oT*, *mT* a *pT*) (Stirk & van Staden, 2010). Klíčem k jejich identifikaci bylo vynalezení analytické metody HPLC-ELISA (Strnad,

1997). Od té doby jsou aromatické cytokininy běžně identifikovány v listech, plodech, výhoncích, embryích a semenech rostlin, navíc i v mořských řasách (Stirk & van Staden, 2010). Všechna tato zjištění podpořila myšlenku, že cytokininy nesoucí benzylový kruh v pozici N6 budou daleko více rozšířeny, než se původně předpokládalo (Strnad, 1997).

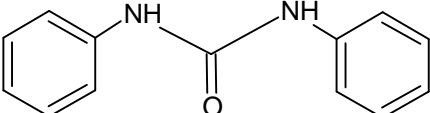
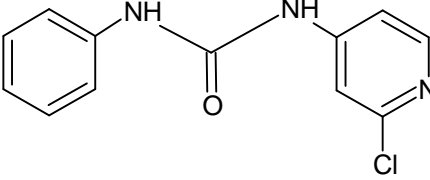
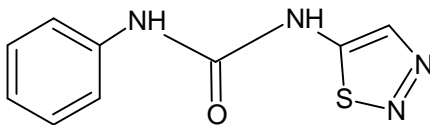
Tabulka 2: Strukturní vzorce, názvy a zkratky aromatických cytokininů. Glukosyl a ribosyl se týkají β -D-glukopyranosylu a β -D-ribofuranosylu (upraveno dle Strnad, 1997)



R1	R2	R3	R4	Triviální název	Zkratka
	-	H	-	6-benzylaminopurin	BA
	-	Ribosyl	-	6-benzylaminopurin ribosid	BAR
	-	Ribotid	-	6-benzylaminopurin ribosid-5'-monofosfát	BAR5'P
	-	Glukosyl	-	6-benzylaminopurin 9-glukosid	BA9G
	-	Glukopyranosyl-1,3-ribosyl	-	6-benzylaminopurin 9-(glukopyranosyl-1,3-ribosyl)	BA9RG
	-	Alanyl	-	6-benzylaminopurin 9-alanin	BA9Ala
	-	-	Glukosyl	6-benzylaminopurin 7-glukosid	BA7G
	Glukosyl	-	-	6-benzylaminopurin 3-glukosid	BA3G
	-	H	-	<i>meta</i> -topolin	<i>m</i> T
	-	Ribosyl	-	<i>meta</i> -topolin ribosid	<i>m</i> TR
	-	Ribotid	-	<i>meta</i> -topolin ribosid-5'-monofosfát	<i>m</i> TR5'P
	-	Glukosyl	-	<i>meta</i> -topolin 9-glukosid	<i>m</i> T9G
	-	Glukopyranosyl-1,3-ribosyl	-	<i>meta</i> -topolin 9-(glukopyranosyl-1,3-ribosyl)	<i>m</i> T9RG
	-	Alanyl	-	<i>meta</i> -topolin 9-alanin	<i>m</i> T9Ala
	-	-	Glukosyl	<i>meta</i> -topolin 7-glukosid	<i>m</i> T7G
	Glukosyl	-	-	<i>meta</i> -topolin 3-glukosid	<i>m</i> T3G
	-	H	-	<i>Meta</i> -topolin O-glukosid	<i>m</i> TOG
	-	Ribosyl	-	<i>Meta</i> -topolin ribosid O-glukosid	<i>m</i> TROG
	-	H	-	<i>Ortho</i> -topolin	<i>o</i> T
	-	Ribosyl	-	<i>Ortho</i> -topolin ribosid	<i>o</i> TR
	-	Glukosyl	-	<i>Ortho</i> -topolin 9-glukosid	<i>o</i> T9G

Byla připravena také celá řada syntetických látek s cytokininovou aktivitou a odlišnou strukturou než je purinový základ, patří mezi ně například difenylmočovina, thidiazuron, jež vykazuje vysokou aktivitu, a také N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridin)močovina (**Tabulka 3**) (Mok a kol., 1982).

Tabulka 3: Strukturální vzorce, názvy a zkratky cytokininových derivátů močoviny (upraveno dle Mok a kol., 1982).

Vzorec	Název	Zkratka
	N, N'-difenylmočovina	DPU
	N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)močovina	CPPU
	N-fenyl-N'-(1,2,3-thiazol-5-yl)močovina; thidiazuron	TDZ

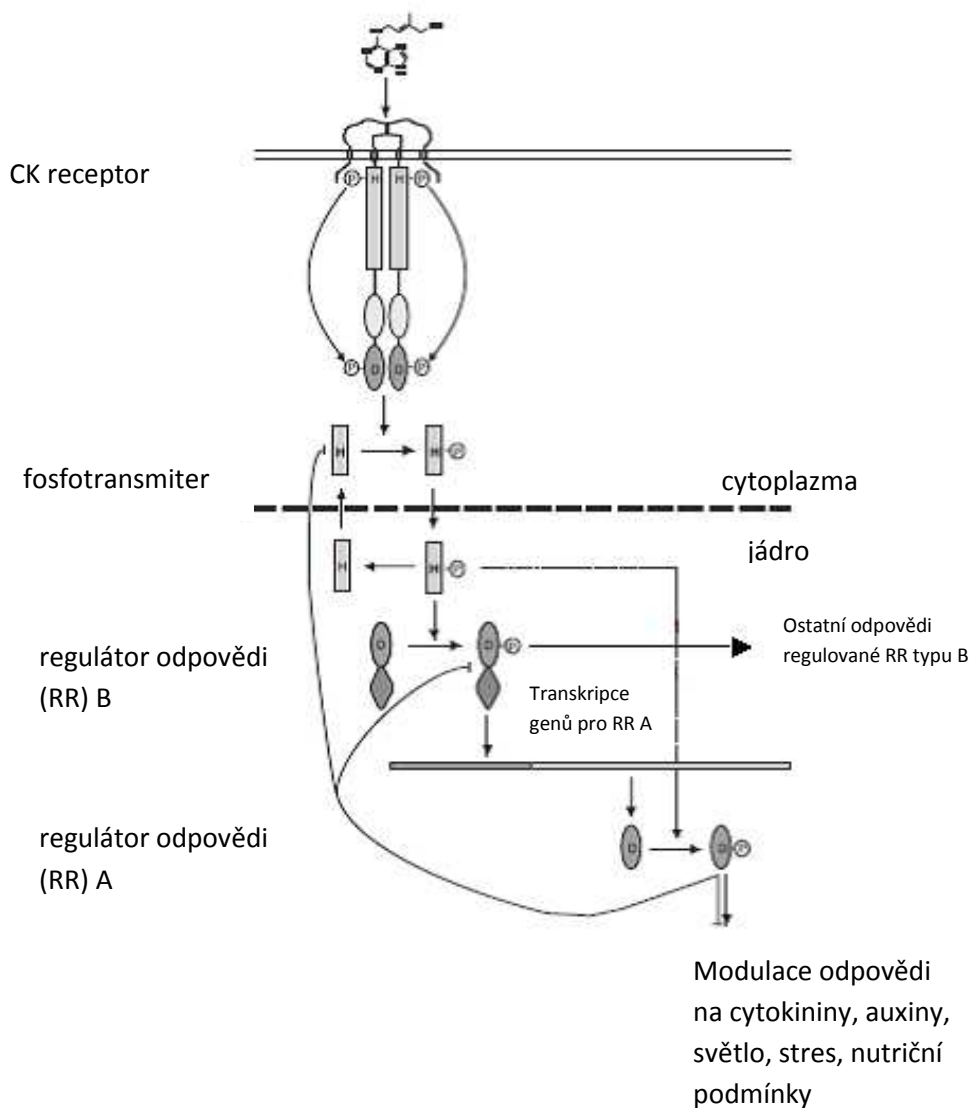
1.1.3 Cytokininový „signalling“

Výrazný průlom v pochopení cytokininové signalizace poskytly molekulární, genetické a biochemické studie na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Došlo k identifikaci genů primární cytokininové odpovědi, genů kódujících cytokininové receptory a nejzákladnější dráhy prvků, jež zprostředkovávají signalizaci mezi těmito složkami (Hutchison & Kieber, 2002).

V *Arabidopsis* byly prokázány tři typy cytokininových receptorů, histidinkináz, AHK2, AHK3 a AHK4. Všechny patří do jedné genové rodiny obsahující právě cytokininové receptory, ethylenové receptory a fytochromy. Cytokininové receptory se nacházejí například v plazmatické membráně. AHK2 a AHK3 se podařilo lokalizovat

v různých rostlinných orgánech, oproti tomu AHK4 se nejčastěji vyskytuje v kořeni. Samotná histidinkináza obsahuje dvě domény, extracelulární vstupní doménu, která je také označována jako tzv. CHASE (*cyclases/histidine kinases-associated sensory extracellular*), a intracelulární přijímací doménu (Hutchison & Kieber, 2002; Ueguchi a kol., 2001).

Cytokininová signalizace (**Obrázek 3**) probíhá tzv. dvousložkovým systémem skrze přenos fosfátu mezi histidinem a asparátem (Griffaut a kol., 2004; Müller & Sheen, 2008). Tento dvousložkový systém je tvořen cytokininovým receptorem (histidinkinásou, HK) v cytoplazmatické membráně a regulátorem odpovědi (RR) v jádře. Další potřebnou složkou je ještě histidinový přenašeč fosforu, tzv. fosfotransmitter (HPT). Při signalizaci dojde k navázání cytokininu na receptor (histidinkinázu), konkrétně jeho vstupní (CHASE) doménu (Hutchison & Kieber, 2002). Poté dojde k dimerizaci receptoru. Následuje autofosforylace receptoru. Tento receptor předá fosfát na asparát druhé intracelulární domény. Následuje přenos fosfátu pomocí fosfotransmitteru (HPT) do jádra, kde reaguje s regulátory odpovědi (RR) typu B, který je pozitivním regulátorem cytokinové odpovědi a iniciuje transkripci genu primární cytokinové odpovědi. Součástí této exprese je i exprese genů pro regulátory odpovědi (RR) typu A, které způsobují negativní regulaci cytokininového signálu (Sakakibara, 2006; Tarkowski, 2011).



Obrázek 3: Model cytokininové signalizace (upraveno dle Schmölling, 2004).

1.1.4 Transport cytokininů

Cytokiny jsou v rostlinách vysoce mobilní. Skrze xylem a floem dochází k transportu rozličných cytokininů, majících specifické účinky v signalizaci na dlouhé vzdálenosti (Stirk & van Staden, 2010). Je pravděpodobné, že rozdílný výskyt cytokininů v xylemu a floemu může být důležitý pro akropetální a systematický transport cytokininů (Sakakibara, 2006)

A) Transport skrze xylem

Funkcí CK transportovaných xylemem je předávat informace o environmentálním stresu (význam živin, nízká teplota, salinita, sucho) z kořenů do apikálních meristémů (root-to-shoot signalizace) (Stirk & van Staden, 2010). Tento transport se děje transpiračním tokem (Kudo, Kiba & Sakakibara, 2010). Celková koncentrace CK v xylemu se zvýší při nástupu kvetení, nebo třeba při vodním stresu (Stirk & van Staden, 2010). Hlavní formou CK v xylemu je *tZR*, jenž rostliny zřejmě používají jako akropetálního posla. Obsah *tZR* v xylemu je zvýšen přidavkem nitrátů (NO_3^-), což napovídá, že *tZR* funguje jako posel pro nitrátovou signalizaci, jenž indukuje akumulaci genových transkriptů cytokininové odpovědi v listech (Kudo, Kiba & Sakakibara, 2010).

B) Transport skrze floem

Cytokininy jsou samozřejmě přemísťovány také skrze floem, hlavní formou CK pro tento transport je iP. CK ve floemu mohou pocházet z: (i) exportu CK syntetizovaných ve zralých listech, (ii) recirkulace CK z kořenů prostřednictvím transpiračního proudění, (iii) cílené výměny z xylemu (malá pravděpodobnost) (Stirk & van Staden, 2010). Funkcí CK ve floemu je bazipetální a systémová signalizace (Hirose a kol., 2008). Také je navrženo, že je transport CK floemem mechanismem k redistribuci CK do spodních meristémů a zásobních orgánů, které nemají přímý kontakt s transpiračním proudem (Stirk & van Staden, 2010).

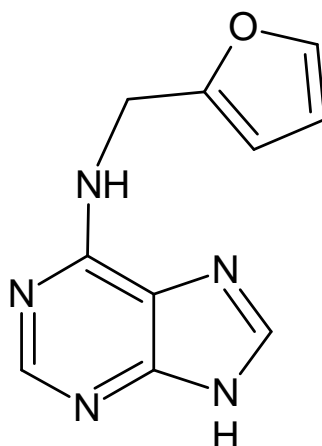
1.2 Kinetin

1.2.1 Obecné informace a výskyt

Byl prvním objeveným cytokininem. V roce 1955 skupina vědců z Botanického a Biochemického oddělení Univerzity ve Wisconsinu oznámila izolaci, krystalizaci, charakterizaci a syntézu N⁶-furfuryladeninu. Tato látka dostala triviální název kinetin. Prvním popsanou funkcí nové sloučeniny byl její vliv na podporu buněčného dělení, což bylo prokázáno testováním na pletivu tabáku (Amasino, 2005). Kinetin byl získán jako produkt degradace DNA a z autoklávované DNA sledě, což vedlo k názoru, že jde o produkt uměle vytvořený rozkladem DNA (Barciszewski a kol., 1997). Přítomnost kinetinu byla prokázána v DNA rostlin, ale také bakterií a zvířat. Kinetin byl prokázán i jako sekundární produkt DNA oxidace. Dále byla jeho přítomnost potvrzena v prokaryotické tRNA, kinetin je zabudováván do prokaryotické i eukaryotické tRNA ve výměnné reakci, která je katalyzována tRNA-kinetin transglykosylasou, jež však nebyla s určitostí identifikována. Zde je domnělou funkcí kinetinu stimulace ribosomální transkripce (Griffaut a kol., 2004). V poslední době se kinetin a jeho ribosid získávají extrakcí zkapalněného endospermu z mladých, čerstvých kokosových ořechů (Bo-Hwa Choi a kol., 2008). Dlouhou dobu byl kinetin považován za nepřirodní syntetický produkt, teprve v roce 1996 se však zjistilo, že lze kinetin nalézt v komerčně dostupné DNA, čerstvě extrahované DNA lidských buněk, v rostlinném buněčném extraktu a v lidské moči (Barciszewski a kol., 2006).

1.2.2 Struktura kinetinu

Z chemického hlediska je kinetin N⁶-furfuryladenin (**Obrázek 4**), jedná se tedy o derivát purinu, který může jednoduše vzniknout štěpením DNA v mírně kyselém prostředí. Kinetin se chová jako amfoterní sloučenina, jeho pK_A dosahuje hodnot v rozmezí 4 až 10. Vykazuje slabou rozpustnost v etanolu, butanolu, acetonu a dalších rozpouštědlech. Lepší rozpustnosti lze dosáhnout v silných kyselinách, zásadách a koncentrované kyselině octové, naopak skoro nerozpustný je v destilované vodě. Za atmosférického tlaku sublimuje při 220°C. Krystaly kinetinu pro rentgenostrukturní analýzu je možné získat pomalým chlazením horkého alkoholického roztoku (Barciszewski a kol., 1999).



Obrázek 4: Schéma struktury molekuly kinetinu.

Kinetin v přírodě vzniká reakcí adeninu a furfuralu. Molekula kinetinu je označována za dvou-planární, jedna rovina prochází skrze adeninovou polovinu, druhá skrze furfurylovou skupinu. Vzájemný úhel mezi oběma rovinami je 79° . Prokázalo se, že v důsledku vzdálenosti N6 substituentu od imidazolového kruhu, nedochází k typické vodíkové vazbě Watson-Crickova typu v krystalu báze. Tato orientace N6 substituentu, s ohledem na imidazolový kruh, je podobná jako u jiných N6 adeninů (Barciszewski a kol, 1999).

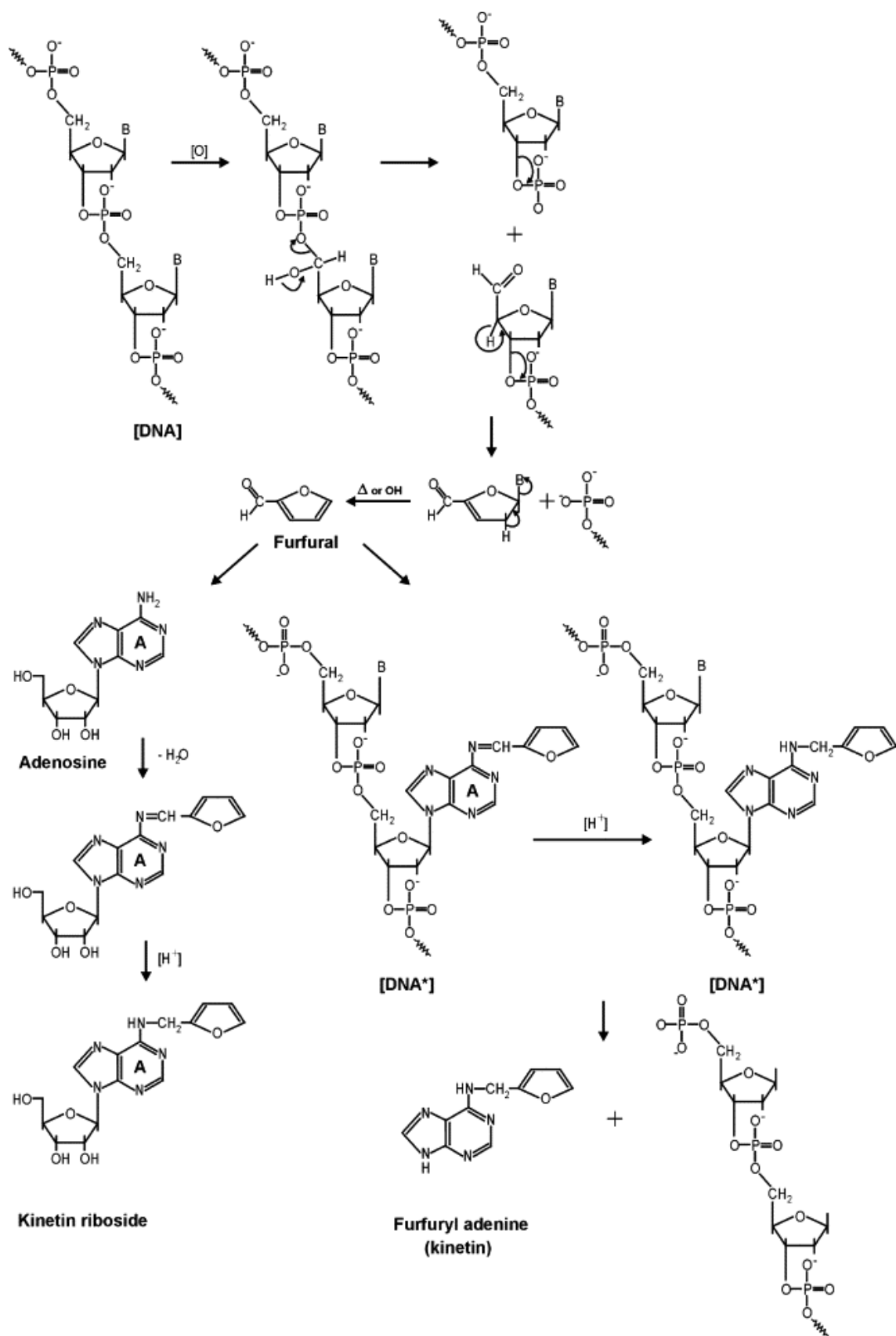
N6-substituenty adeninu, jako kinetin, existují v neutrálních podmínkách jako tautomer 9H-amin, avšak v kyselém prostředí proběhne přeskupení na 7H-amin. Takovéto přeskupení je výsledkem změn v délkách vazeb a hodnot vybraných úhlů v rámci adeninového kruhu. Výsledkem substituce v poloze N6 adeninu je indukce, která zvýší specifickou biologickou aktivitu, která je výsledkem změn chemických a fyzikálních vlastností (Barciszewski a kol., 2006). U kinetinu byly také objeveny elektrochemické vlastnosti, jež významně zlepšily možnosti jeho identifikace v přirozených produktech. Díky této vlastnosti bylo možné nalézt první postup pro chromatografickou analýzu kinetinu v DNA a buněčných extraktech, za použití HPLC s elektrochemickým detektorem. Elektrochemické hodnoty 650-900 mV jsou způsobeny přítomností furfurylového substituentu na exocyklické amino skupině purinu. Naproti tomu báze nukleových kyselin nejsou elektrochemicky aktivní (Barciszewski a kol, 1999).

1.2.3 Biosyntéza kinetinu

V poslední době byla již téměř objasněna biosyntéza kinetinu (**Obrázek 5**). Momentálně, je tedy furfural považován za jeho domnělý prekursor (Barciszewski a kol, 1999). Furfural byl také potvrzen v lidské plazmě, moči a v homogenátu srdeční tkáně (Barciszewski a kol., 1997). Vzniká během radikálové oxidace hydroxyly na uhlíku C5' deoxyribosy v DNA a spontánním štěpením kostry DNA procesem β -eliminace. Vznikne nově vytvořený aldehyd, který se vyskytuje mezi mnoha reakčními produkty metalloporfyrinů s DNA. Vzniklý aldehyd poté reaguje s amino skupinou adeninu za vzniku Schiffovy base, což je následováno intramolekulárním přeskupením vedoucím ke vzniku kinetinu *in vivo*. Tyto nové poznatky napovídají, že N6-furfuryladenin je velmi důležitou součástí nové ochranné dráhy hydroxylového radikálu tvořící tzv. volný radikálový proud. Pokud je tato domněnka správná, buňka našla cestu jak (Barciszewski a kol., 2006; Barciszewski a kol, 1999):

- a) Neutralizovat škodlivé vlastnosti produktů reakce hydroxylového radikálu, jehož příkladem může být právě furfural
- b) Reagovat na oxidativní stres indukci obranných mechanismů udržování a oprav.

Bylo také zjištěno, že degradace cukerných zbytků v DNA je, ve spojení s dalšími změnami bází nukleových kyselin, jednou z hlavních cest buněčného poškození, což je prokázáno vzájemnou přítomností furfuralu v buněčném extraktu, spolu s primárními oxidačními produkty deoxyribosy. Velmi podobný mechanismus je prokázán také při formování zeatinu u bakterií (Barciszewski a kol., 2006; Barciszewski a kol., 1999).



Obrázek 5: Schéma syntézy kinetinu a jeho ribosidu. Furfural znázorněn jako výsledek produktu DNA oxidace reagujícího s ribo- a deoxyadenosinem (převzato z Barciszewski a kol., 2006).

1.2.4 Biologické vlastnosti kinetinu

První zjištěnou biologickou vlastností kinetinu - byla podpora buněčného dělení. Poté následovalo mnoho biochemických, fyziologických a genetických studií, které prokázaly další rozmanité vlastnosti kinetinu. Byl prokázán jeho vliv na celou řadu důležitých životních procesů ovlivňujících růst a vývoj rostlin, jako jsou vývoj cévního systému, diferenciace chloroplastů, apikální dominance nebo také zpomalení senescence. Všechny tyto pochody mohou být výsledkem společného působení s dalšími rostlinnými hormony a v kooperaci s vnějšími vlivy (Barciszewski a kol., 2006). Kinetinu a zejména jeho ribosidu jsou dále přičítány vlastnosti růstového inhibitoru a anti-tumorigenního faktoru. Samotná volná báze pak oddaluje nástup mnoha typických procesů, které jsou spojené se stárnutím lidských kožních fibroblastů (Griffaut a kol., 2004). Kinetin zpomaluje vývoj a stárnutí hmyzu tím, že redukuje jejich plodnost a zvyšuje aktivitu enzymu katalasy (EC 1.11.1.6) (Barciszewski a kol., 1997). Tímto procesem lze celkově prodloužit život tohoto hmyzu. Látky odvozené od kinetinu, jako například jeho ribosid, se vyznačují, jak bylo zmíněno výše, zajímavými vlastnostmi, mezi něž patří:

- inhibice růstu
- indukce apoptózy
- působení při redukcii intracelulárního ATP a mitochondriálního membránového potenciálu
- indukce reaktivních forem kyslíku (ROS)
- cytotoxické působení na myši ošetřené ribosidem kinetinu

Obecně cytokininy chrání před rozkladem mitochondrií a apoptózou v buňkách HL-60. Naopak právě jejich ribosidy mohou hrát důležitou roli v indukci buněčné smrti u různých typů rakoviny (Bo-Hwa Choi a kol., 2008).

1.2.5 Efekt kinetinu na buněčné úrovni

1.2.5.1 Kinetin jako antioxidant

Bylo popsáno, že kinetin působí jako antioxidant *in vitro* a *in vivo* (Barciszewski a kol., 2006). Je schopen ochránit DNA proti oxidativnímu poškození 8-oxodeoxyguanosinem (8-oxo-dG). Tato schopnost se projeví při provedení *in vitro* Fentonovy reakce (Mik a kol., 2011). Kinetin inhibuje tvorbu 8-oxo-dG v závislosti na dávce, s maximální účinností 50%-ní ochrany zkoumané při koncentraci 100 μM kinetinu. Při inhibici tvorby v pomalém a rychlém glykolačním/glykoxidačním modelu proteinového poškození hovězí sérový albumin (BSA)-pentosidinu měl vyšší účinnost inhibice (82%) než adenin (49%). Navíc kinetin také inhiboval tvorbu BSA-karbonylů po oxidaci, a při koncentraci 200 μM snižoval hromadění BSA v průběhu glykace. Prokázalo se, že kinetin působí jako silný inhibitor oxidativního a glykooxidativního poškození (Barciszewski a kol., 2006).

1.2.5.2 Role kinetinu při konformačních změnách DNA

Bylo prokázáno, že kinetin je odstraňován z DNA opravným mechanismem, avšak takováto modifikace může vést k vzniku konformačních změn DNA, jež způsobí špatné párování a mutace. Důkaz byl proveden pomocí analýzy rozlišovacích vlastností u chemicky syntetizovaného oligonukleotidu (AAAAGTCCGTCCTGAKGAT), jenž obsahoval kinetin a byl podroben polymerázové řetězové reakci (PCR) na templátovém plasmidu pEW1 ukrývající v sobě 210-bp fragment DNA, který byl odvozený od 5' konce mRNA z HIV. Sekvencovaný PCR produkt prokázal schopnost DNA polymerasy (EC 2.7.7.7) správně přiřadit thymin ke kinetinu, v komplementárním řetězci. Neb špatné přiřazení se objevilo v blízkosti modifikované báze. Podobně působí také 8-Oxo-dG, způsobující chyby při výměně bází na sousedící části templátu ve chvíli, kdy je kopírován DNA polymerázou. (Barciszewski a kol., 2006).

1.2.5.3 Ovlivnění transkripce rRNA

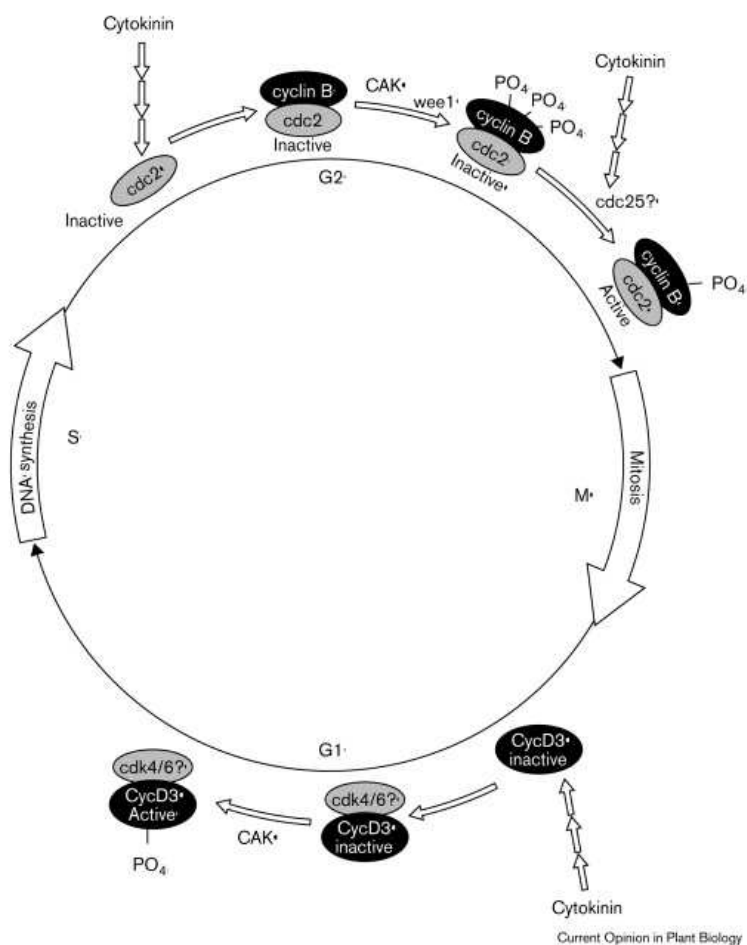
Schopnost kinetinu ovlivnit transkripci rRNA byla prokázána u *Arabidopsis*, kde po exogenní aplikaci stimuluje iniciaci transkripce rRNA, kterou katalyzuje RNA polymerasa I (EC 2.7.7.6) (Barciszewski a kol., 2006). Dojde k výraznému zvýšení nascentního transkriptu této polymerasy v závislosti na dávce a čase (Barciszewski a kol., 1999). Polymerasa I zajišťuje v normálních buňkách okolo 34% celkové

transkripce, po aplikaci kinetinu se její účinnost zvýší na zhruba 60%. Kinetin up-reguluje transkripci v rostoucích buňkách a down-reguluje ji v buňkách klidové fáze (Barciszewski a kol., 2006). Transkripce rRNA je indukována jak v kořenech, tak v květu a celkově celé rostlině, což ukazuje, že působení kinetinu není tkáňově specifické. Navíc oproti kinetinu nemají ostatní rostlinné růstové regulátory, jako jsou gibbereliny, kyselina abscisová, auxin ani ethylen žádný zjistitelný efekt na transkripci rRNA, což poukazuje na roli kinetinu jako hlavního molekulárního regulátoru transkripce a tudíž jeho důležitost pro růst rostlinných buněk. V souladu s tímto tvrzením je i fakt, že kinetin aktivuje hlavní jadernou organizační oblast (*nuclear organiser region*, NOR) v bazálních, ekvatoriálních a téměř apikálních tkáních zvýšením jejich velikosti a celkovou změnou morfologie, která vede k přestavbě od oválného tvaru přes podlouhle-oválnému až ke tvaru činky (Barciszewski a kol, 1999).

Dále je také kinetin zabudováván místně-specificky do tRNA, a to jak u prokaryot, tak eukaryot. Důkaz této reakce byl proveden za pomoci radioaktivně značeného kinetinu. Při inkorporaci zaujme kinetin místo 37, což je hned vedle tripletu pro antikodon na 3' konci, jenž je za normálního stavu obsazen modifikovanou adeninovou bází s cytokininovou aktivitou. Katalyzátorem této reakce je zřejmě tRNA-transglykosylasa. Kinetin také dokáže podpořit zabudování 8-¹⁴C-adeninu do DNA a RNA v embryích a kotyledonech. Tímto lze zvýšit kapacitu klíčení u semen (Barciszewski a kol, 1999).

1.2.5.4 Kontrola buněčného cyklu

Aplikace kinetinu zvyšuje aktivitu cyklin-dependentní kinasy (cdk2, EC 2.7.11.22), právě na aktivitě těchto kinas je závislý buněčný cyklus u rostlin (**Obrázek 6**). Aktivita cdk2 je závislá na fosforylaci pomocí tyrosinu. Kinetin účinkuje konkrétně v G2 fázi cyklu, kde stimuluje odstranění fosfátu z cdk2, což způsobí aktivaci cdk2 a rychlý synchronní vstup do mitozy (Barciszewski a kol, 1999). Také bylo prokázáno, že cytokininy celkově indukují expresi genu pro cdk2.



Obrázek 6: Stručný model buněčného cyklu s vyznačenou možnou rolí cytokininů. Postup cyklu je závislý na aktivaci serinu v protein kinase. Aktivace cyklin dependentních kinas (*cdk2*, *cdk4* a *cdk6*) je dosaženo pomocí spojení se specifickými cykliny (D'Agostino & Kieber, 1999).

1.2.6 Efekt kinetinu na úrovni celé rostliny a na oddělených pletivech

1.2.6.1 Senescence listů

Senescence listů tvoří koncové stádium vývoje listů, což zahrnuje změny chlorofylu (změna integrity). Je řízen změnou hladin hormonů, jakož i katabolickými reakcemi proteinů, lipidů a nukleových kyselin, a toto vše je spojeno s přemístěním živin. Celkově takovéto buňky v senescenci prochází vysoce koordinovaným procesem změn jejich struktury, metabolismu a genové exprese. Domněnka, že by exogenní cytokininy mohly kontrolovat senescenci byla prokázána pomocí výsledků z experimentu z transgenními rostlinami tabáku, pro něž byla charakteristická exprese genu pro biosyntézu cytokininů, isopentenyltransferasy (*ipt*), jenž byl pod promotorem

z genu spojeného z senescencí (SAG12). Takovéto transgenní rostliny poté vykazovaly značné oddálení senescence a prodloužení životnosti květů (Mik a kol., 2011).

V dalším výzkumu bylo prokázáno, že vnější aplikace kinetinu na oddělené listy *Xanthium* (rostlina řepěň) způsobila oddálení senescence listu. Toto vedlo k dalšímu testování jiných cytokininů, jako jsou *trans*-zeatin, 6-benzylaminopurin, 6-benzylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin nebo také 2-methylthio-6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin. Proběhlo testování jejich schopnosti a účinnosti na oddálení senescence listů různých rostlinných druhů, mezi nimiž byla např. sója nebo pšenice. I kinetin byl testován na další rostlinné druhy, oddálení senescence listů proběhlo u ovsu, pšenice, ječmene a rýže. Zároveň došlo k prodloužení životnosti řezaných rostlin karafiátu (Mik a kol., 2011).

Také N9 substituované deriváty kinetinu prokazují anti-senescenční aktivitu. Mezi tyto substituované látky patří aromatické cytokininy, jako jsou ribosidy, a tetrahydropyran-2-yl nebo tetrahydrofuran-2-yl. Například vytvoření derivátu 6-benzylaminopurinu (benzyladeninu, BAP), u něž byl do pozice N9 substituován tetrahydropyran-2-yl nebo tetrahydrofuran-2-yl zdvojnásobilo zpomalení listové senescence proti BA s volnouází. Dalším derivátem BA, který zpomalil senescenci listu o trochu více než samotný BA byl 6-benzyl-9-(4-chlorobutyl)purin. Naproti tomu derivát 6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin prokázal markantně zvýšenou efektivitu při udržení obsahu chlorofylu v listových discích tabáku než cytokinin, ze kterého byl odvozen (6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]purin). Dospělo se tedy k závěru, že vnesení tetrahydropyran-2-ylu do N9 pozice kinetinu také zesílí jak anti-senescenční vlastnosti, tak aktivitu látky zpomalující stárnutí na lidských kožních fibroblastech (anti-aging aktivita) (Mik a kol., 2011).

1.2.6.2 Účinek na tok vápníku

Aplikace kinetinu na buňky mechu *Physcomitrella patens* způsobí předčasnou tvorbu pupenů, které jsou nedílnou součástí životního cyklu mechu a vedou k vývoji zralého gametoforu potřebného pro pohlavní rozmnožování, a lokální zvýšení Ca^{2+} iontů z 250 nM na 750nM. Prokázalo se, že cytokininy-modulovaný vstup vápníku probíhá skrze kanály v plazmatické membráně citlivé k dihydropyridinu (DHP). Pokud je obsah kinetinu nízký dochází k stimulaci vazby azidopinu (arylazid 1,4-dihydropyridin), což je blokátor kanálů (Barciszewski a kol., 1999).

1.2.6.3 Antistresové efekty a ochrana proti patogenům

Enviromentální stres z prostředí, jako třeba vysoký obsah solí nebo nízká teplota, způsobují zvýšení obsahu kyseliny abscisové (ABA). Tato kyselina je zodpovědná za indukci akumulace cDNA TUR2 transkriptů ve všech částech rostliny *Spirodela polyrrhiza*. TUR2 transkripty kódují ATP-vázající kazetové transportéry, jež jsou homologní ke kvasinkovým, a které zajišťují výtok různých strukturně nepříbuzných cytotoxických sloučenin. Uvolňování takovýchto sloučenin je závislé na spotřebě ATP. Zvýšení hladiny TUR2 transkriptů vede k tvorbě klidových pupenů, nazývajících se turiony. Kinetin je schopen potlačit akumulaci TUR2 transkriptů zprostředkovanou ABA, a zároveň také zmírnit inhibici růstu, kterou ABA také indukuje. Kinetin také způsobuje snížení aktivity lipooxygenasy (EC 1.13.11.12), což je v antagonistickém vztahu k ABA. Aktivita zmíněné lipooxygenasy hraje významnou roli v přeměně linolenové kyseliny na kyselinu jasmonovou. Smyslem účinku kinetinu je ochrana proti vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) (Barciszewski a kol, 1999).

Možnou ochranou rostlin proti útokům patogenů je produkce sekundárních metabolitů, a to zejména fytoalexinů. Jejich produkce je spjata právě s výše zmíněnou kyselinou jasmonovou. Kinetin vycytává volné radikály a působí tak proti vzniku fytoalexinů, a takto může zabránit hypersenzitivní odpovědi (Barciszewski a kol, 1999).

Z uvedených faktů vyplývá, že zvýšení celkové hladiny cytokininů vede k indukci resistance. Na tomto základě lze kinetin, a zřejmě i ostatní cytokininy, považovat za antistresový hormon rostlin (Barciszewski a kol, 1999).

1.2.6.4 Otevírání průduchů

Bylo prokázáno, že kinetin indukuje otevírání průduchů. Tento pochod byl prokázán při pokusech s rostlinou *Tradescantia albiflora*. Proces otevírání průduchů je řízen skrze up-regulaci guanylát cyklasy (EC 4.6.1.2). Kinetin, a také benzylaminopurin, zvyšují 2x-4x aktivitu uvedené guanylát cyklasy, což bylo prokázáno u kryš v tkáni plic, tenkého střeva, jater a kůry ledvin. Otevírání průduchů je také specificky, reverzibilně inhibováno, a to prostřednictvím inhibitorů LY 83583 a methylenové modře (Barciszewski a kol., 2006; Barciszewski a kol., 1999).

1.2.7 Působení kinetinu na živočichy

1.2.7.1 Anti-aging aktivita

Kinetin vykazuje efekt proti stárnutí. Tato aktivita byla prokázána na lidské kožní buňky a životní cyklus hmyzu mouchy octomilky. Konkrétně u octomilky *Zaprionus paravittiger* kinetin zpomaluje její vývoj a stárnutí, a prodlužuje její život redukcí věkově specifické úmrtnosti po celou dobu života dospělého. Navíc během vývoje hmyzu, i u dospělých, byla zjištěna zvýšená specifická aktivita katalasy (EC 1.11.1.6) (Barciszewski a kol., 1999). Kinetin také podporuje proliferaci buněk a zanechává tak méně buněk zastavených v G0/G1 fázi, oddaluje stárnutí endotelových buněk a zvyšuje metabolickou kapacitu (Barciszewski a kol., 2006). Efekt proti stárnutí také zahrnuje změny morfologie, zvyšuje se obsah proteinů v buňce a akumulace konjugátů protein-lipid-peroxid v cytoplazmě. Objevily se i zprávy, že inhibuje růst lidských epitelů a karcinomu prsu. Hlavně poznatky o efektu na stárnutí buněk lidské kůže, spojené s dermatologickými testy proti stárnutí způsobeného zářením, došlo k vyvinutí několika potenciálních kosmetických a o pokožku pečujících produktů obsahujících kinetin (Barciszewski a kol., 1999).

1.2.7.2 Inotropní efekt

Inotropie je ovlivnění síly svalového stahu a většinou se týká svalu srdečního. Pozitivní inotropie srdeční stah zesílí, negativní stah zeslabí (Švíglerová, 2009). Právě pozitivní inotropní efekt vykazuje kinetin v působení na srdeční předsíň u krysy. Toto působení je zprostředkováno skrze P2-purinoreceptory a modifikaci cGMP (Barciszewski a kol., 1999). Podobně působí také BA (Barciszewski a kol., 2006).

1.2.7.3 Arteriální trombóza

Při pokusech na myších se ukázalo, že nitrožilní aplikace kinetinu v dávce 4-6 mg/kg, snižuje úmrtnost při akutní plicní embolii indukované ADP. Došlo k výraznému prodloužení průtoku krve v oddělených mezenterálních artériích uložených ve fyziologickém roztoku. Takovéto ošetření kinetinem by mohlo snižovat nebezpečí vzniku trombo-embolických onemocnění (Barciszewski a kol., 2006).

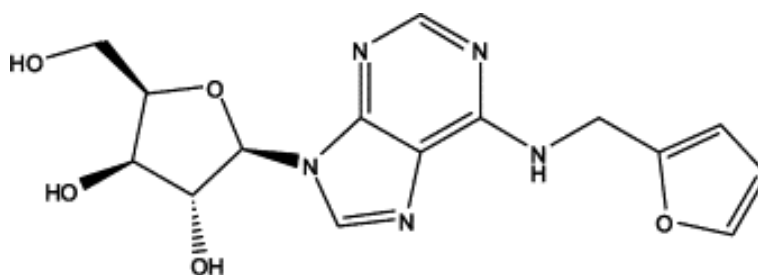
Kinetin má také vliv na krevní destičky. Vykazuje inhibiční vlastnosti na shlukování destiček, na mobilizaci intracelulárních iontů Ca^{2+} , na rozpad fosfoinositidu

v destičkách (stimulováno kolagenem), na vznik thromboxanu A₂ (stimulováno kolagenem) a kyseliny arachidonové v lidských krevních destičkách, a výrazně zvyšuje vznik cAMP. Také značně inhibuje vzestup pH způsobený thrombinem. Efekt kinetinu je tedy zřejmě založen na výše zmíněných inhibičních vlastnostech, a také na inhibici aktivity fosfolipasy C (EC 3.1.4.3) (fosforyluje proteiny krevních destiček) (Barciszewski a kol., 2006).

Z dvou výše uvedených skutečností vyplývá, že kinetin by mohl být možným terapeutikem pro arteriální trombózu (Barciszewski a kol., 2006).

1.2.8 N₉ substituované deriváty kinetinu: kinetin ribosid

Jedná se o cukerný derivát kinetinu obsahující ribosu v poloze N₉ (**Obrázek 7**). Byly u něj prokázány zajímavé vlastnosti.



Obrázek 7: Strukturální vzorec kinetin ribosidu (převzato z Bo-Hwa Choi a kol., 2008).

Ribosid umožňuje vazbu kinetinu do specifických míst v rostlinných a živočišných nádorových buňkách a zároveň také zesiluje inhibiční efekt kinetinu (Griffaut a kol., 2004).

Kinetin ribosid má prokázaný cytotoxický účinek na buňky HeLa (buněčná linie lidských epiteliálních nádorových buněk). Po jejich ošetření ribosidem (48 hodin při koncentracích 5, 10 a 20 μM) bylo možno sledovat pokles životaschopnosti těchto buněk, závislý na koncentraci. Při nejnižší koncentraci došlo k poklesu životaschopnosti o 50%. Cytotoxický efekt na buněčné linie CCL-116 při stejných koncentracích ukázal účinnost pouze u nejvyšší koncentrace, navíc došlo k poklesu životaschopnosti buněk méně než 20% (Bo-Hwa Choi a kol., 2008).

Kinetin ribosid má také cytotoxické účinky na celou řadu dalších lidských a myších nádorových buněk. Lidské M4 Beu buňky (buněčná linie lidských nádorových buněk získána 1975 z pacienta s invazivním melanomem), a myší B16 nádorové buňky (buněčná linie získána ze spontánního kožního nádoru z myšího kmene C57B1/6 roku 1954) byly redukovány v růstu z 50 % při koncentraci 1,5 a 0,2 μM (Barciszewski a kol., 2006). Podobně bylo prokázáno u myších nádorových buněk B16F-10 (buněčná linie myších kožních nádorových buněk), kde byla studována jejich životnost po aplikaci kinetin ribosidu. Tato aplikace, v závislosti na koncentraci, způsobila zvýšení úmrtnosti buněk. Například koncentrace 1 mM způsobila smrt více než 80% buněk (Bo-Hwa Choi a kol., 2008).

Bylo prokázáno, že kinetin ribosid je schopen účinně redukovat obsah vnitrobuněčného ATP, narušit potenciál mitochondriální membrány a hromadění reaktivních forem kyslíku (ROS). Samotný kinetin a celkově cytokininy tuto vlastnost nemají. V buněčných liniích HeLa ribosidy indukují apoptózu (Griffaut a kol., 2004, Barciszewski a kol., 2006).

Kinetin ribosid má také vliv na fungování mitochondrií, které je typické pro apoptické buňky. Ribosid v mitochondriích ovlivňuje membránový potenciál. Aplikace ribosidu vedla k velkému zvýšení depolarizace membrány mitochondrií v buňkách HeLa, což je spojeno s difúzí cytochromu c do cytosolu. Ribosid přímo snižuje obsah cytochromu c, jenž by měl zůstat v prostoru mezi vnitřní a vnější membránou (Bo-Hwa Choi a kol., 2008).

Kinetin ribosid funguje jako velmi účinný aktivátor caspasy-3, jež je zahrnuta v procesu buněčné smrti. Úplnou blokaci caspasy-3 je poté možné provést pan-kaspázovým inhibítorem (z-VAD-fmk). Přenos signálu pro apoptózu probíhá právě pomocí kaspáz, které prostřednictvím přeměny pro-kaspáz na kaspázy zprostředkovávají specifické štěpení v buněčných liniích HeLa. Závěrem lze říct, že apoptóza rakovinových buněk probíhá cestou přes kaspázy, indukované ribosidem kinetinu (Bo-Hwa Choi a kol., 2008).

1.3 Fluorescenční značení cytokininů

Zvýšený význam fluorescenčního značení přinesla potřeba určit nebo charakterizovat stále větší množství biologicky aktivních molekul a zmapovat jejich vstup do buněk (Meng a kol., 2007). Fluorescenční detekce je založena na použití sloučeniny s absorpcí fluorescence od ultrafialového po blízkou infra červenou oblast spektra. V současnosti došlo k velkému pokroku, a to jak v oblasti přístrojového vybavení pro fluorescenci, tak v syntéze nových fluoroforů (Gonçalves, 2009). Nejčastěji jsou dnes připravovány fluorofory s vlnovou délkou excitace a emise v rozmezí 480 a 780 nm (Meng a kol., 2007). U přirozeně se vyskytujících cytokininů není možné nalézt fluorescenci. Pro jejich detekci založenou na fluorescenci je nutné na molekulu cytokininu navázat vhodnou fluorescenční značku (Brault, 1997). Organické fluorofory mohou vytvářet kovalentní nebo nekovalentní značky se analyzovanou molekulou za tvorby konjugátů nebo komplexů, jež vykazují fluorescenci ve vlnových délkách, v závislosti na použitém fluoroforu, od krátkých až po velmi dlouhé (Gonçalves, 2009).

1.3.1 Fluorescenční značky

Mezi tyto značky je možné zařadit organické fluorofory a fluorescenční proteiny. Fluorofory je možné rozdělit na základě jejich absorpce a emise vlnových délek. Proto existují dvě skupiny, fluorofory s absorpcí do 500 nm, jež zahrnují oxobenzopyrany, naftofurany, oligothiofeny, 4,7-fenantrolin-5,6-diony, benzoxadiazoly, dansyl chlorid, naftalen 2,3-dikarboxyaldehyd a 6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen, a fluorofory s absorpcí nad 500 nm, obsahující fluoresceiny, rhodaminy, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceny, squarainy a kyaniny (Gonçalves, 2009).

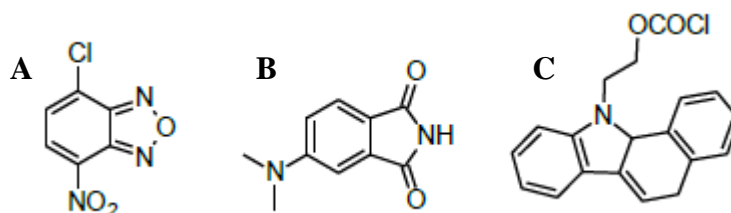
Níže jsou uvedeny pouze skupiny fluoroforů z jejichž zástupci jsem prakticky pracoval při syntézách.

Fluorofory s dusíkatými heterocykly

Jsou to fluorescenční značky s emisí do 500 nm. Pro aminokyseliny a peptidy jsou známy dvě skupiny derivatizačních činidel, a to 4,7-fenantrolin-5,6-diony

(phanquinony) a benzooxadiazoly. První jmenovaný lze použít v derivatizaci pro LC separaci aminokyselin.

Do skupiny benzooxadiazolů se řadí 4-chloro-7-nitrobenzooxadiazol (NBD-Cl) (**Obrázek 8**), což je značka široce používaná pro aminokyseliny, proteiny, primární a sekundární aminy. Excitační maximum této látky je při vlnové délce 470 nm a emisní při 530 nm (Gonçalves, 2009; Haggag, Belal & Shaalan, 2008).

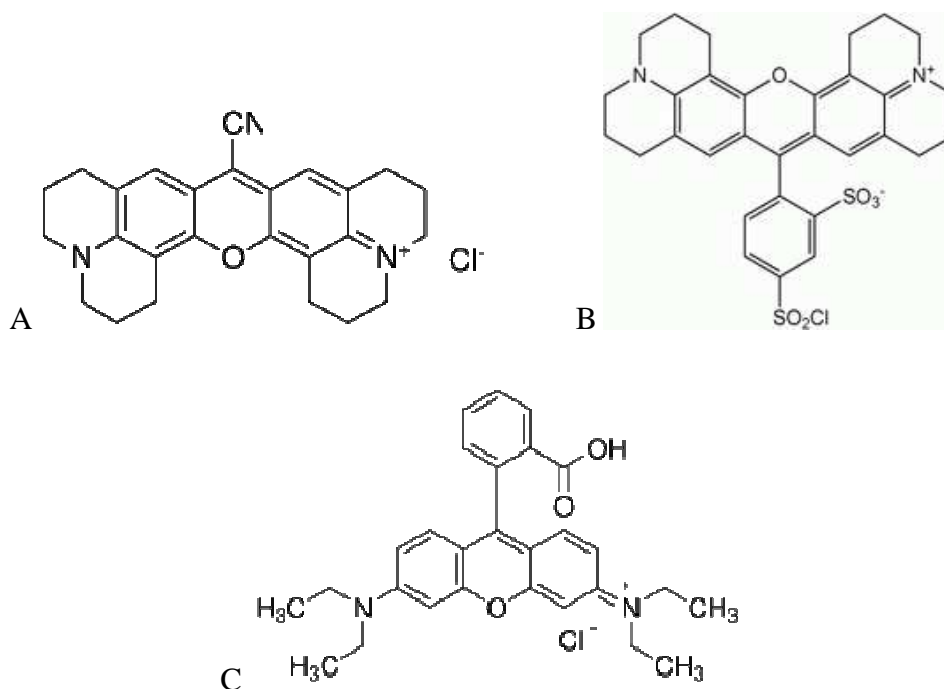


Obrázek 8: Strukturní vzorce A) NBD-Cl B) 4-DMAP C) BCEOC (převzato z Gonçalves, 2009)

Dále do skupiny fluoroforů s dusíkatými heterocykly lze zařadit 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl chloroformát (BCEOC), který byl použit na značení aminokyselin z krevního séra krys. Fluoroprobou, s velmi vysokou citlivostí, je 4-(N,N-dimethylamino)ftalimid (4-DMAP) (**Obrázek 12**). Optické vlastnosti této molekuly se mění v závislosti na polaritě a viskozitě prostředí (Gonçalves, 2009).

Rhodaminy

Rhodaminy patří do třídy xanthenových barviv. Jedná se fluorofory s emisí nad 500 nm. Jde o nejdéle a nejběžněji používaná barviva ze všech syntetických barviv. Jejich hlavní výhodou je nízká cena, takže se často používaly i k barvení látek (Meng a kol., 2007). Vyznačují se vysokou molární absorpcí ve viditelné oblasti a jejich deriváty vykazují vysoký stupeň fluorescence. Hodnota absorpce a emise je u nich ovlivněna substituenty na xanthenovém jádře. Významné je jejich použití při strukturní analýze v mikroskopu (Gonçalves, 2009).



Obrázek 9: Strukturní vzorce A) Rhodamine 800 B) Texaská červeň C) Rhodamine B (převzato z Gonçalves, 2009)

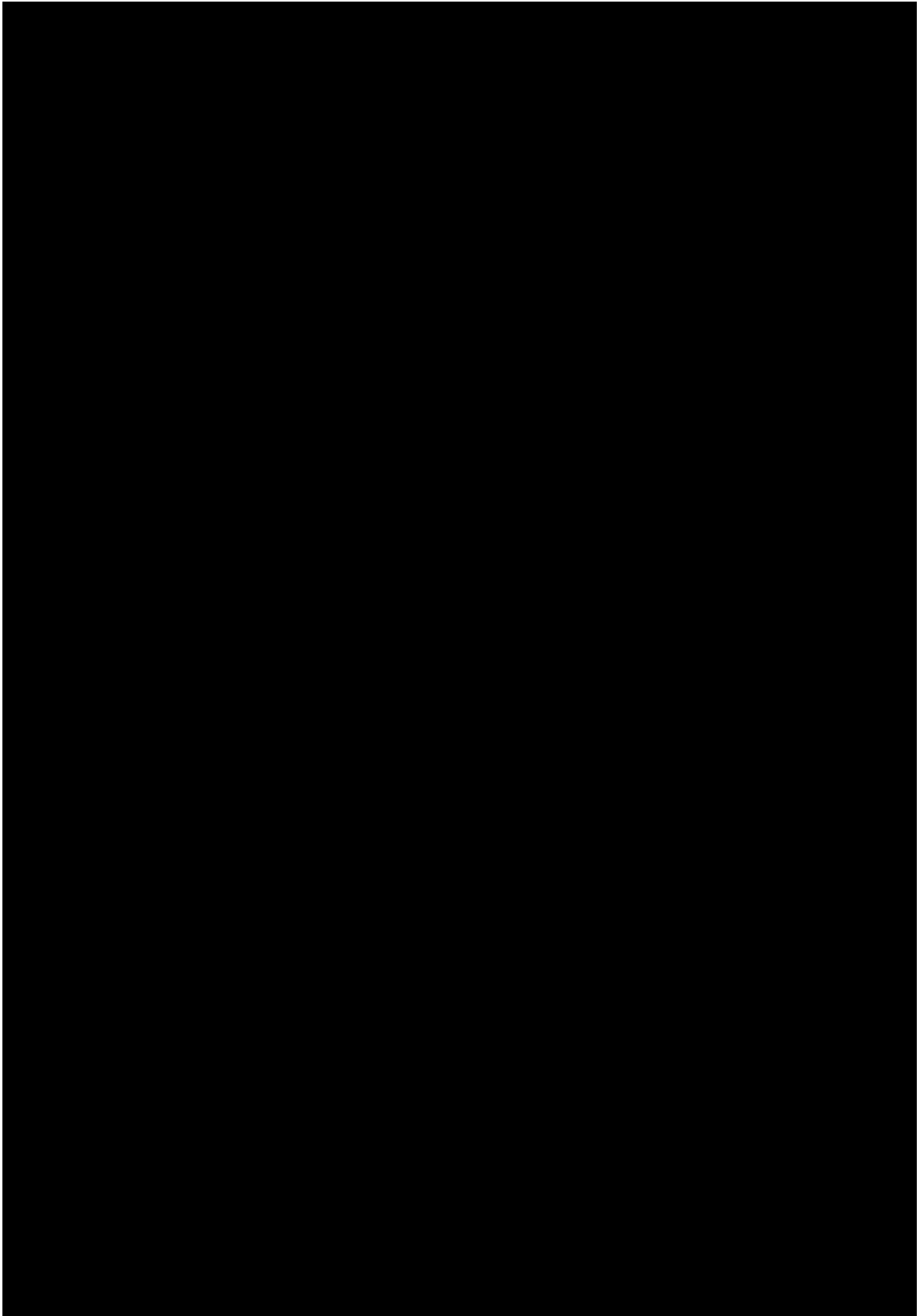
Jako zástupce těchto fluoroforů lze jmenovat Rhodamin 6G, Rhodamin 123, Rhodamin B, Rhodamin 110, jenž se používá při stanovení enzymové aktivity. Dále pak Rhodamine 800 a Texaská červeň (**Obrázek 9**), jenž jsou hojně využívány v bioanalytice, a to hlavně pro svou schopnost fungovat jako nekovalentní, tak i kovalentní značka (Gonçalves, 2009).

1.4 Mikrovlnný reaktor CEM Discover SP

Mikrovlnný reaktor poskytuje možnost mikrovlnně asistované syntézy. Při využití mikrovlnného reaktoru se využívá vlastností mikrovln, jež jsou schopny interagovat s materiály, které lze rozdělit na transparentní (např. sklo), reflexní (např. kovy) a absorpční (voda, polární rozpouštědla). Právě interakce s absorpčními materiály, které jsou v organické syntéze používány jako rozpouštědla, tvoří základ mikrovlnného reaktoru, dochází totiž k absorpci mikrovln rozpouštědlem a k přeměně energie mikrovln na teplo v rozpouštědle. Molekuly, jež jsou polární, mají neuspořádanou orientaci molekul. Pokud je taková látka umístěna do mikrovlnného pole, kde se polarita mění více než miliardkrát za sekundu, musí se molekuly dané látky

přizpůsobovat takovýmto změnám a vzniká oscilační pohyb. Výsledkem tohoto "divokého" pohybu je nevyhnutelně tření molekul a jejich srážky. Tento proces nakonec vyústí vznikem tepla (dojde k přeměně mikrovlnné energie na teplo rozpouštědla) (Pokorný, 2008). Přístroj je založen na využití fuzzy systému, což poskytuje lepší kontrolu parametrů reakce. Mikrovlnný reaktor CEM Discover SP dovoluje provádět tlakové syntézy v nádobách 10 ml, 35 ml a v otevřených nádobách 125 ml. Systém je opatřen 650W magnetronem, což je zařízení tvořené silným magnetem vytvářející mikrovlny. Magnetron lze nastavit v rozmezí 0 – 300W, po kroku 1W. Reakce prováděné v mikrovlnném reaktoru je možné řídit programovatelnou teplotou. Nastavitelný teplotní rozsah je 0 – 300 °C. Rychlost ohřevu je programovatelná a maximální rychlost ohřevu dosahuje 6 °C/sekundu (zdroj: manuál přístroje).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

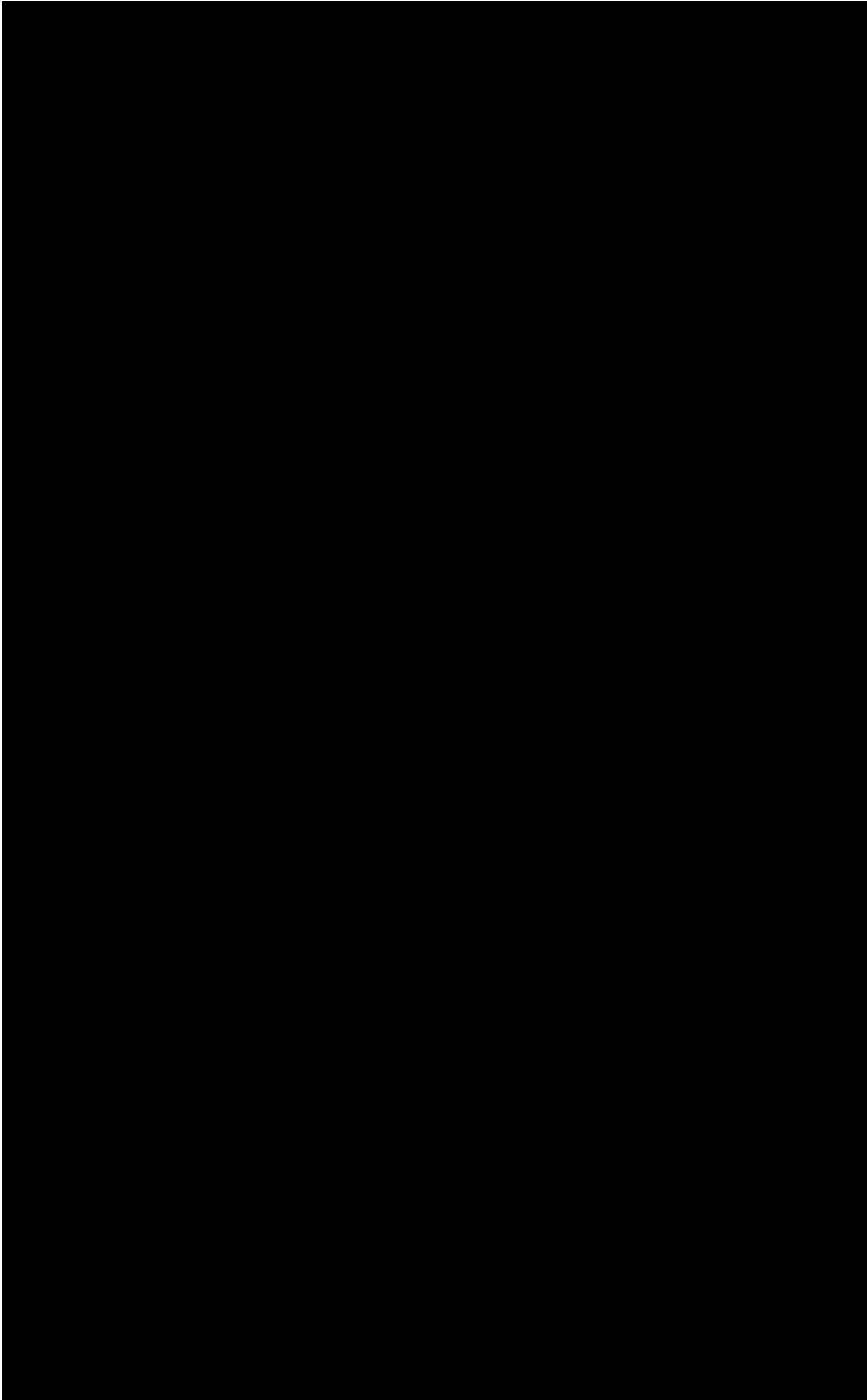
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



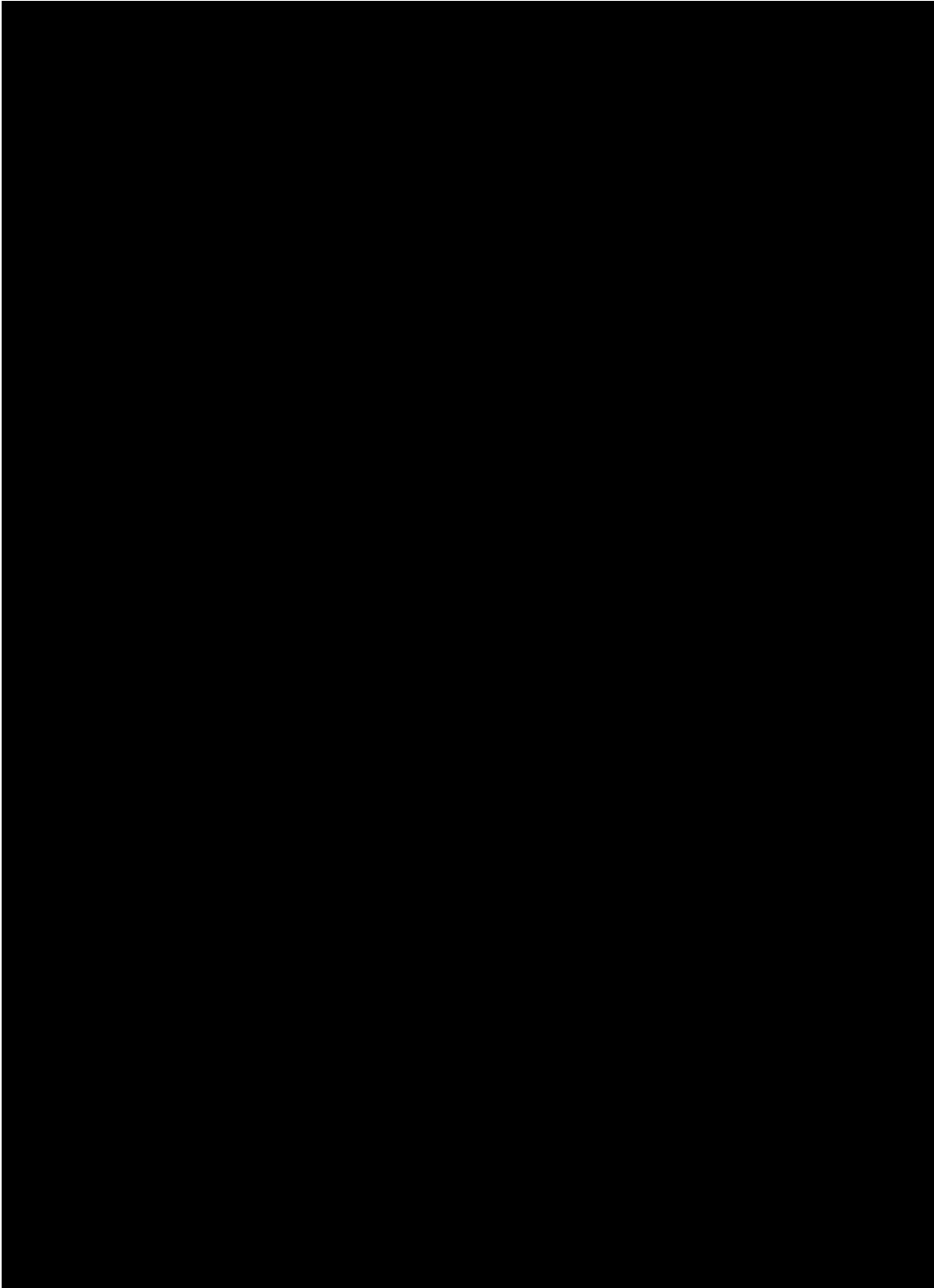
[REDACTED]

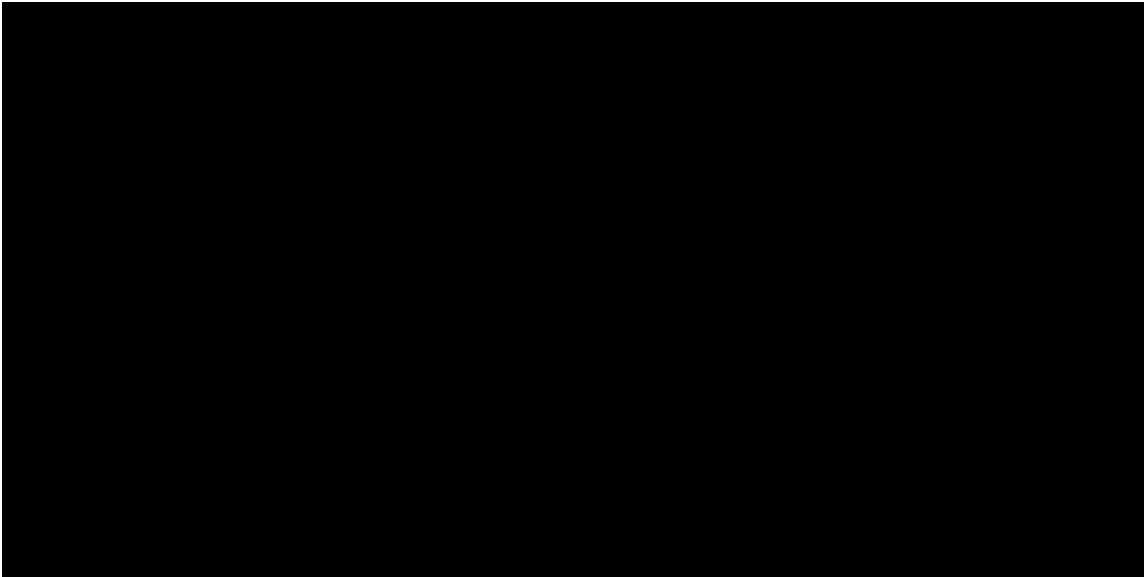
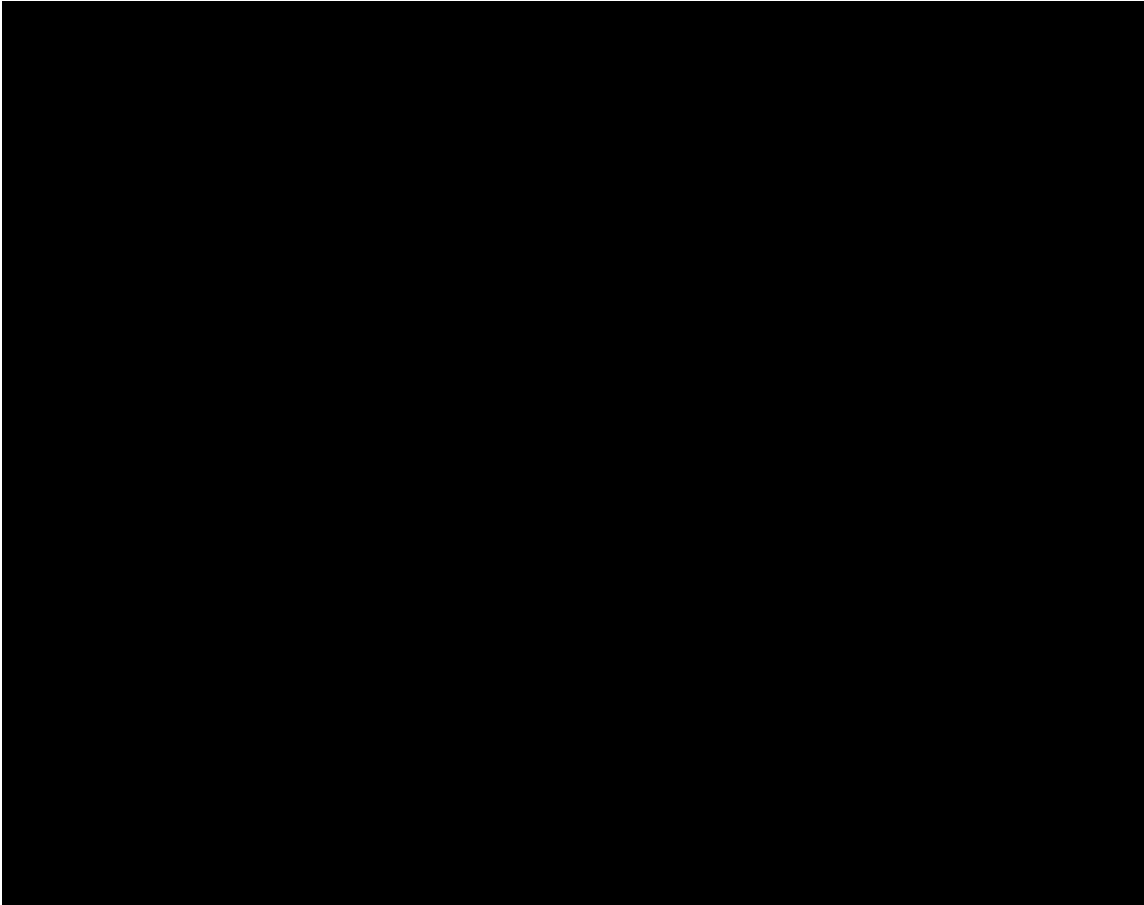
[REDACTED]

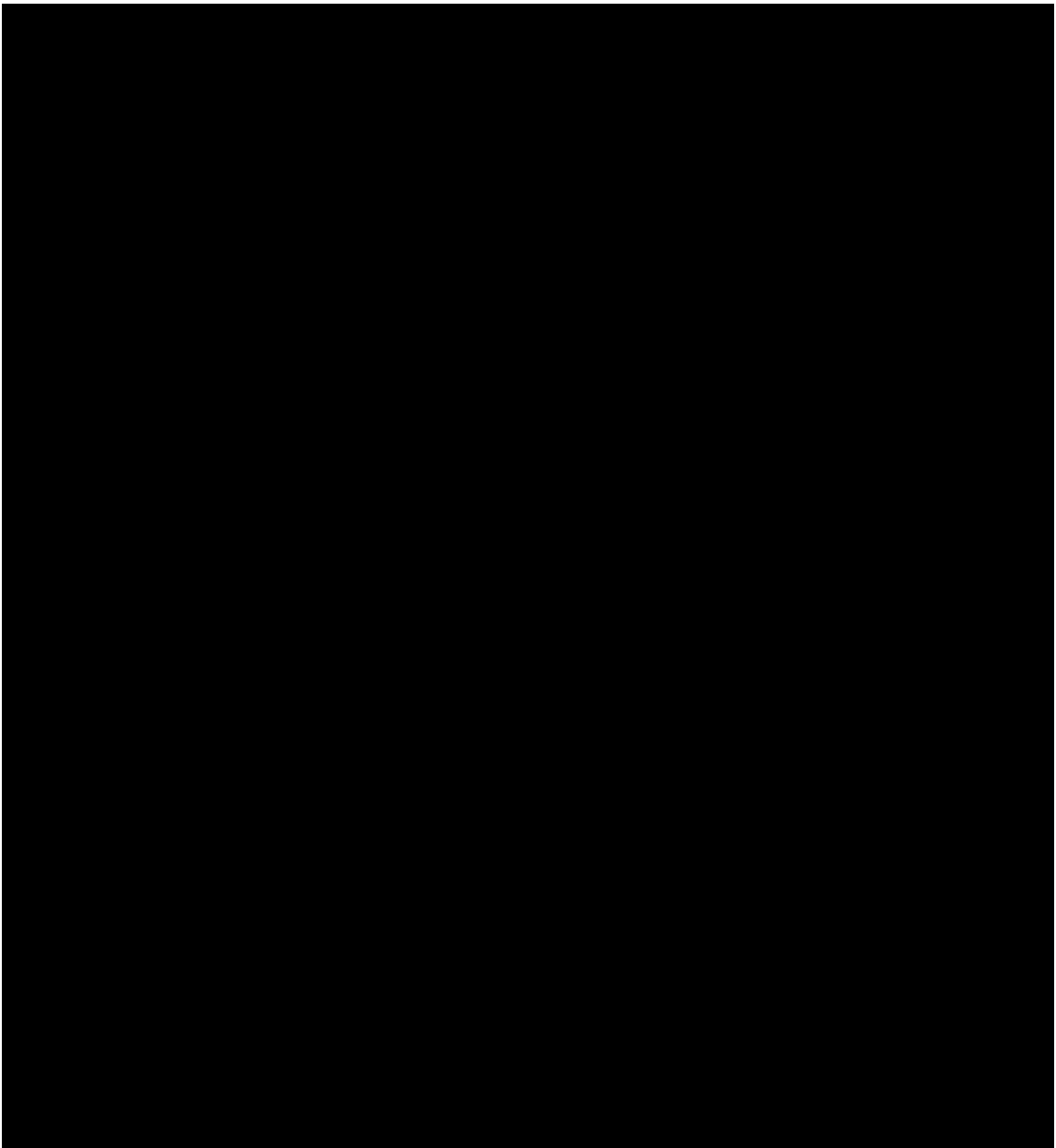
[REDACTED]

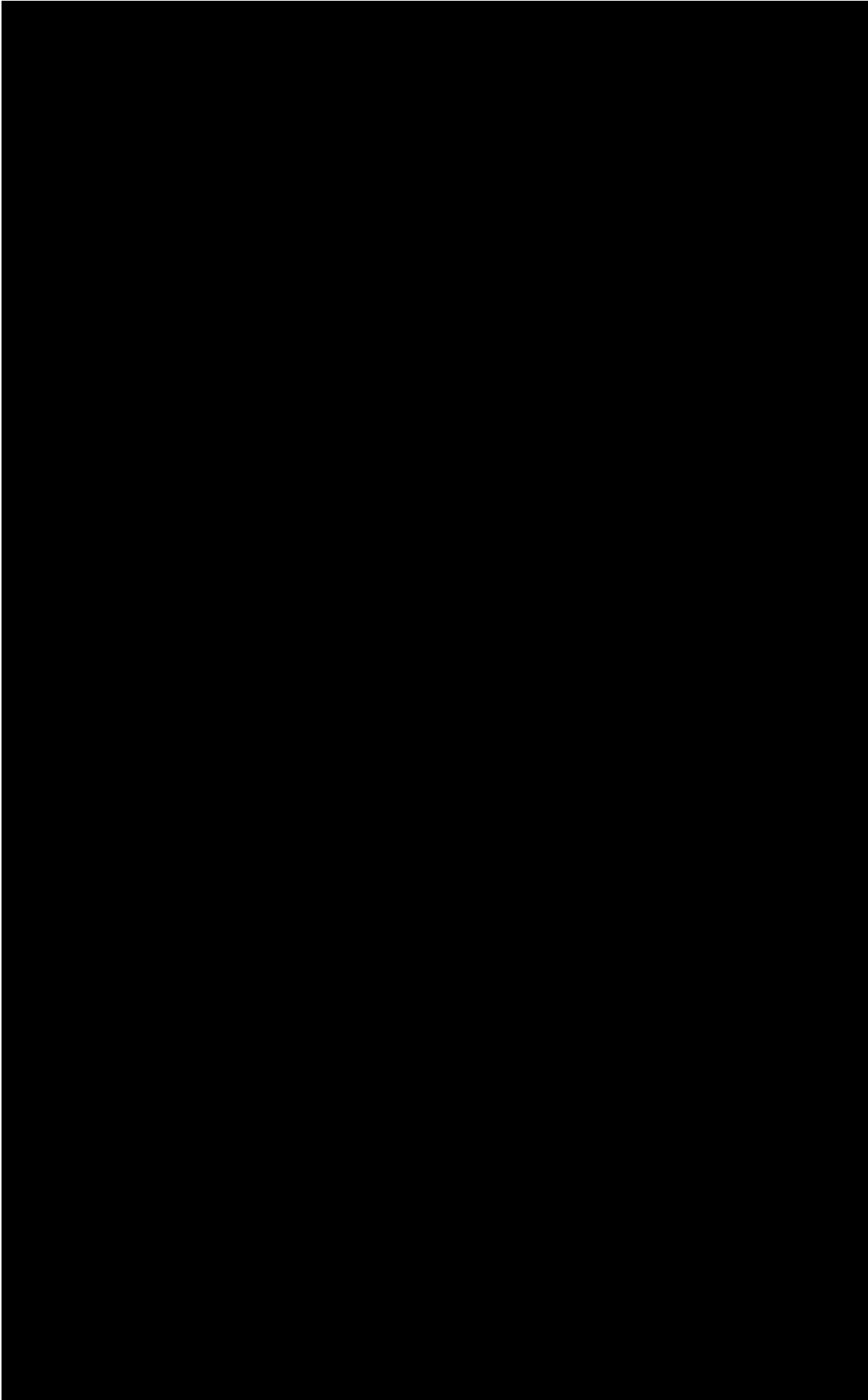
[Redacted]

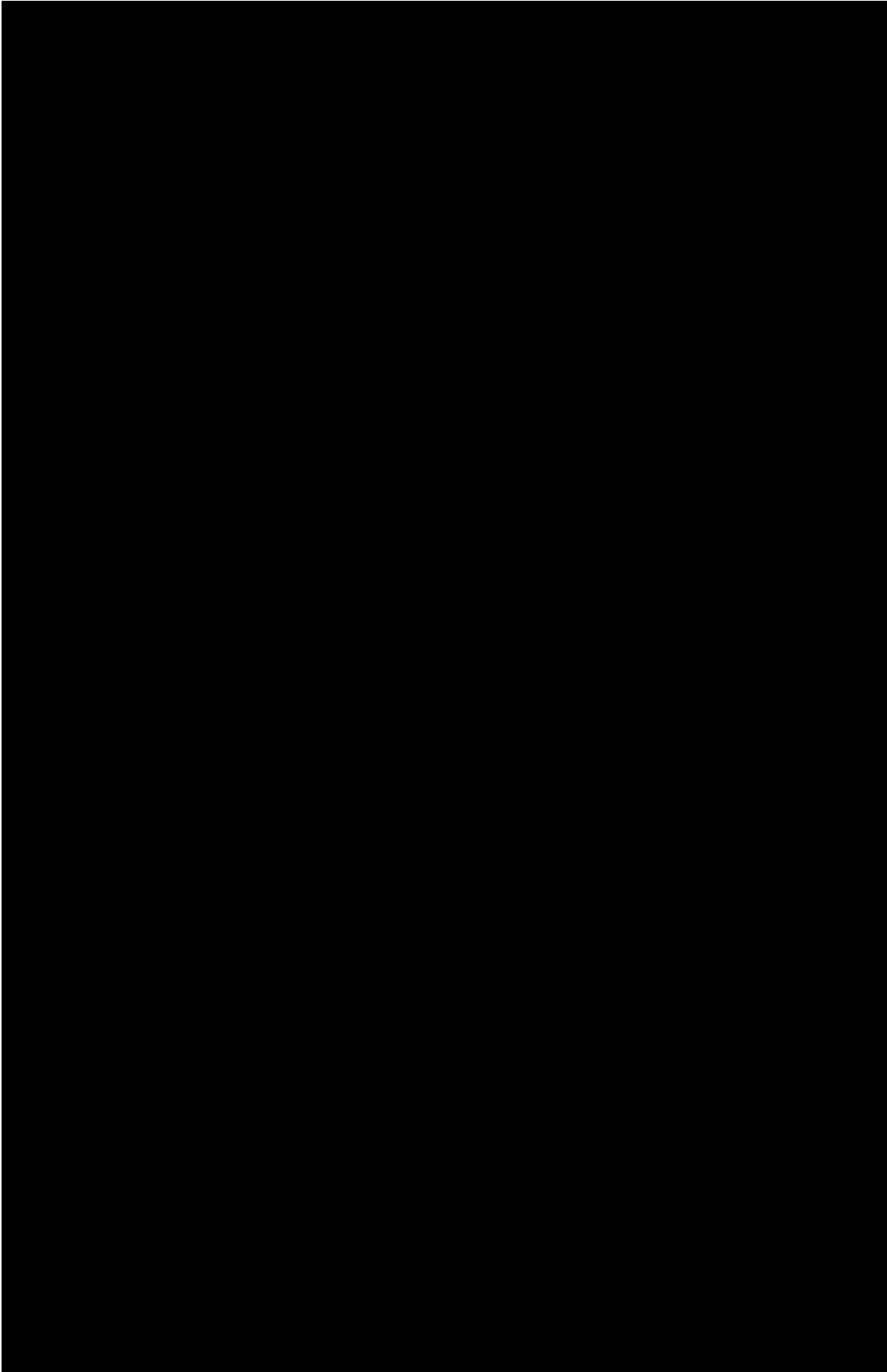
[Redacted]

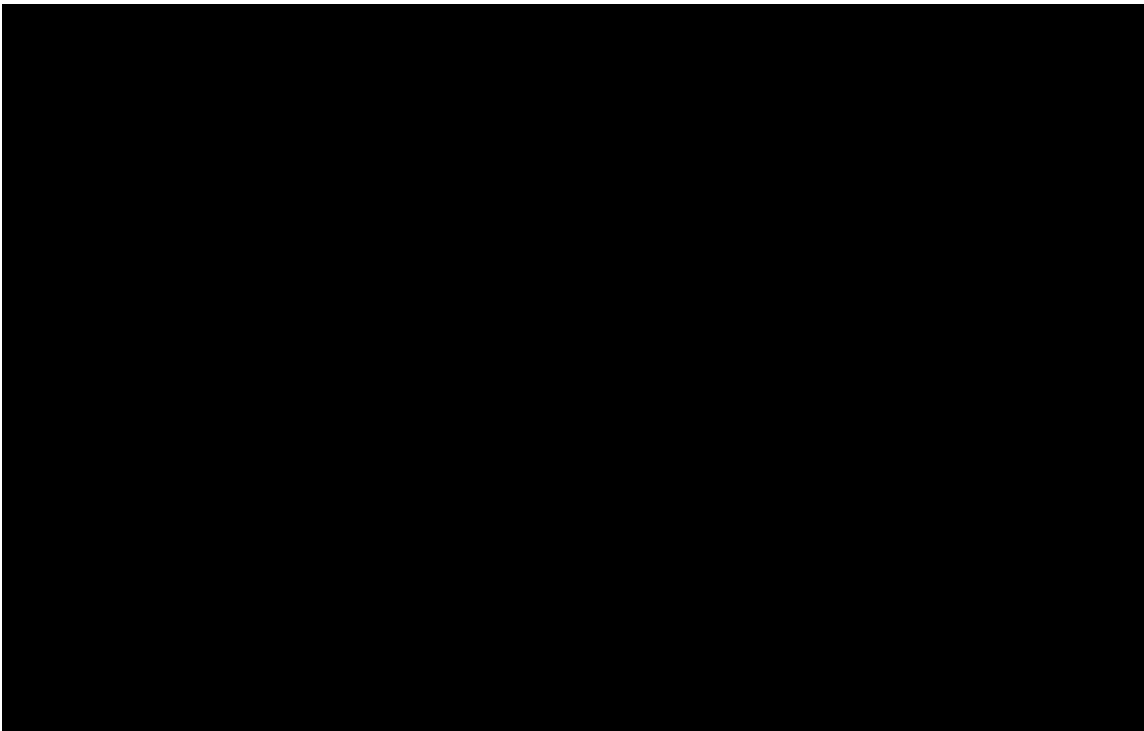
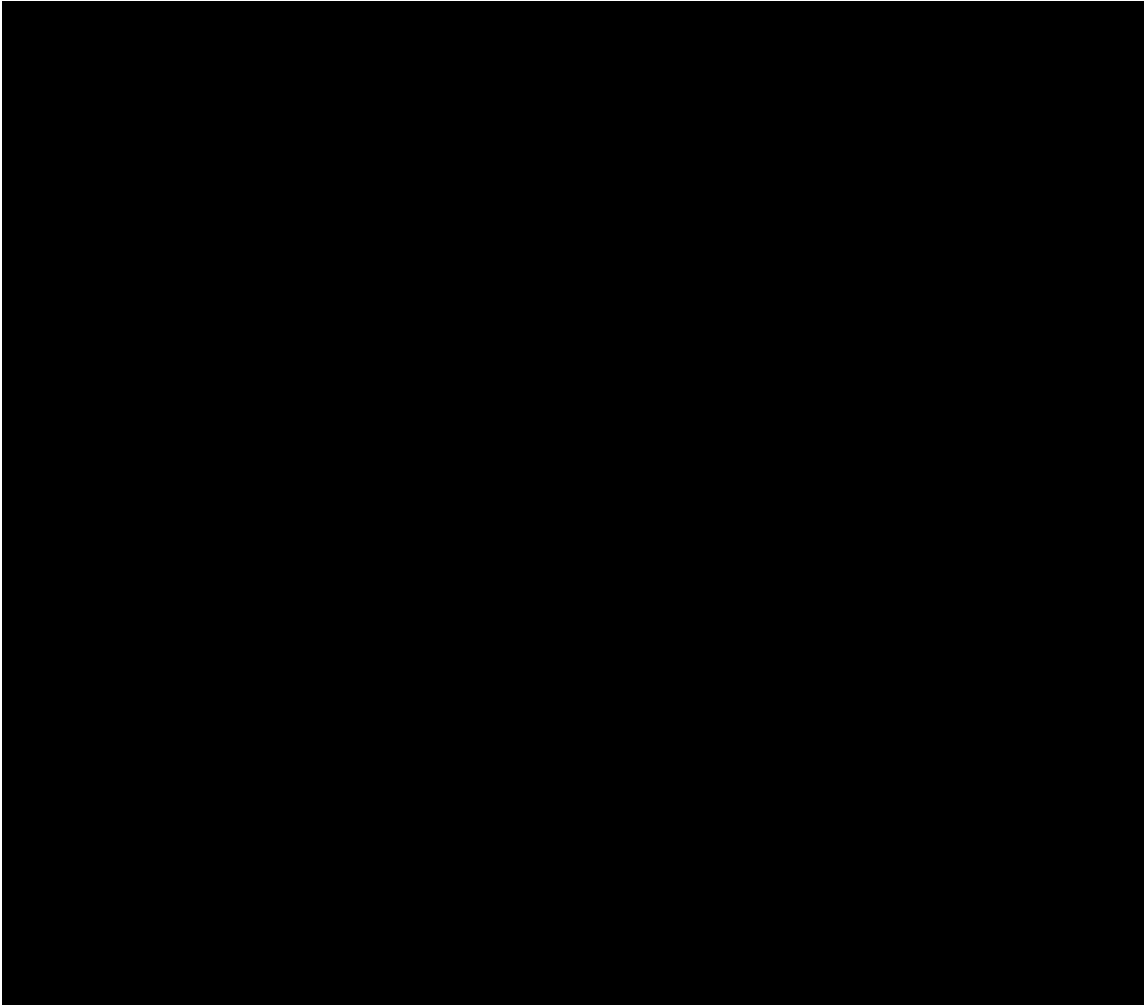


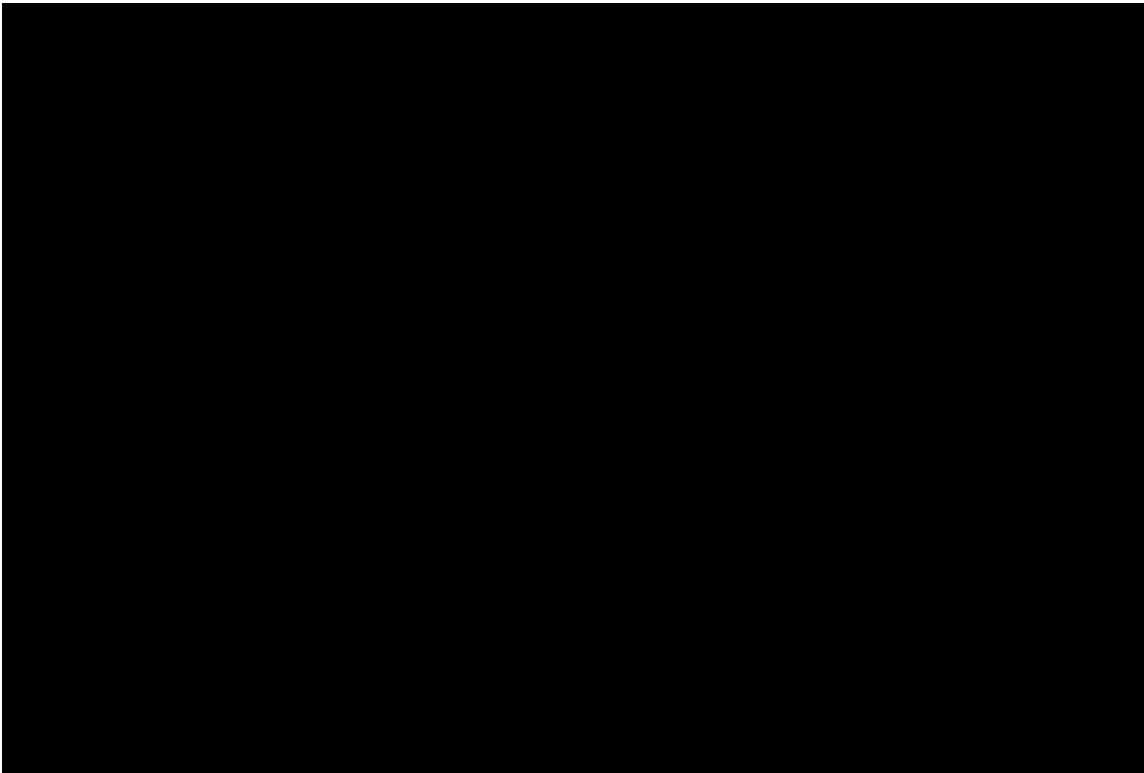
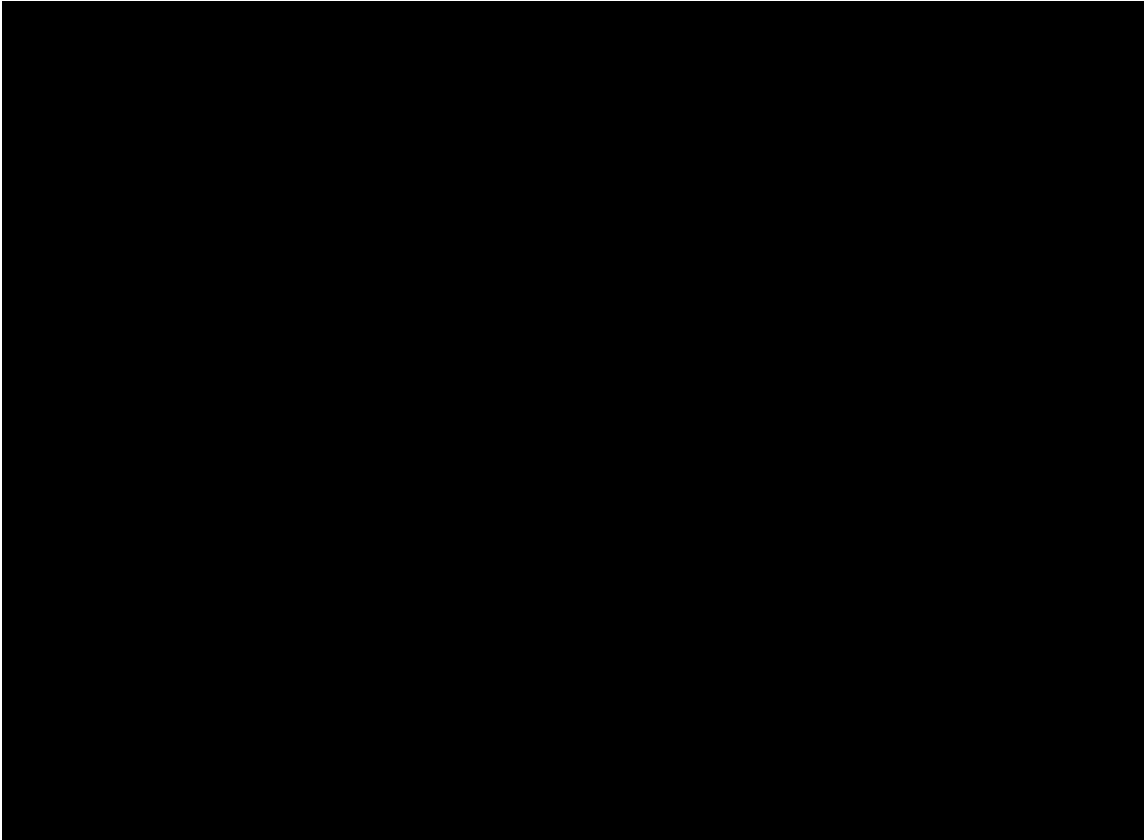












3 VÝSLEDKY

3.1 Syntéza látek

Připravené látky byly identifikovány pomocí NMR, dále byly podrobeny elementární analýze a byl stanoven jejich bod tání. Tyto výsledky jsou pro každou připravenou látku uvedeny níže.

3.1.1 Látka **A**

Výtěžek této reakce byl 1,983 g látky **A**, což odpovídá 74,94 % teoretického výtěžku. Naměřené NMR spektrum potvrdilo úspěšnou syntézu látky **A**. Bod tání připravené látky byl stanoven na 179,6 °C. Výsledky elementární analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 4,63 (2H), 5,15 (1H), 6,38 (2H), 7,56 (1H), 8,14 (1H), 8,61 (1H), 13,12 (1H)

3.1.2 Látka **B**

Výtěžek reakce byl 339,4 mg látky **B**, což odpovídá 61,71 % teoretického výtěžku. Syntéza látky **B** byla úspěšná, což potvrdilo NMR spektrum. Bod tání byl stanoven na 177 – 178,9 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2,67 (1H), 3,22 (1H), 4,64 (1H), 6,24 (1H), 7,66 (1H)

3.1.3 Látka **C**

Výtěžek reakce byl 214 mg látky **C**, což odpovídá 64,782 % teoretického výtěžku. Cílová látka **C** byla syntézou připravena. Předložené NMR spektrum toto potvrzuje. Při stanovení bodu tání bylo zjištěno, že testovaná látka taje za rozkladu, a to při dosažení teploty 171,7 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3,37 (6H), 3,68 (6H), 4,67 (3H), 6,39 (4H), 7,57 (1H), 7,69 (1H), 8,21 (1H), 8,45 (1H), 9,50 (2H)

3.1.4 Látka **D**

Výtěžek reakce byl 29,5 mg látky **D**, což odpovídá 4,836 % teoretického výtěžku. Látka **D** byla také potvrzena, její syntéza byla úspěšná, což dokládá NMR spektrum. Bod tání této látky byl stanoven na 142,1 - 144-6 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,305 (1H), 1,47 (1H), 3,16 (1H), 4,59 (1H), 6,19 (1H), 6,325 (1H), 7,49 (1H), 7,61 (1H)

3.1.5 Látka **E**

Při této syntéze nedošlo k vytvoření hnědých krystalů, pomocí TLC byla ve výsledné směsi identifikována pouze výchozí látka. Ani po změně reakčních podmínek nedošlo ke změně situace, pomocí TLC byla stále identifikována jen výchozí látka. Syntéza této sloučeniny tedy nebyla úspěšná a nebylo provedeno měření pomocí NMR, elementární analýza a nebyl ani stanoven bod tání.

3.1.6 Látka **F**

Výtěžek reakce byl 2,0851 g látky **F**, což odpovídá 78,28 % teoretického výtěžku. Syntéza látky **F** byla úspěšná, což se potvrdilo NMR spektrem. Bod tání byl stanoven na 248,3 – 249,1 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,45 (4H), 1,73 (4H), 3,31 (1H), 3,73 (2H), 4,285 (2H), 8,06 (1H), 13,07 (1H)

3.1.7 Látka **G**

Výtěžek reakce byl 0,5258 g látky **G**, odpovídající 96,16 % teoretického výtěžku. Předložené NMR spektrum potvrzuje přípravu a izolaci látky **G**. Bod tání této látky byl stanoven na 176,9 – 179,3 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,44 (4H), 1,71 (4H), 2,63 (1H), 3,176 (2H), 3,72 (1H), 4,21 (1H), 6,075 (1H), 7,59 (1H)

3.1.8 Látka **H**

Výtěžek reakce byl 92,7 mg látky **H**, což odpovídá 56,291 % teoretického výtěžku. Látka **H** byla připravena a její struktura potvrzena pomocí NMR. Následně bylo při stanovení bodu tání zjištěno, že látka taje za rozkladu, a to při teplotě 240,6 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,43 (5H), 1,70 (5H), 3,58 (5H), 4,23 (2H), 6,43 (2H), 7,66 (1H), 8,56 (1H), 9,59 (1H), 12,19 (1H)

3.1.9 Látka **I**

Z NMR spektra pro látku **I** je patrné, že připravená látka není cílenou látkou dle reakčního schématu. Nejspíše se jedná o výchozí reaktant Rhodamin B. Z toho důvodu nebyla provedena elementární analýza a ani nebyl stanoven bod tání.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,44 (5H), 1,71 (5H), 2,64 (2H), 3,17 (2H), 3,725 (2H), 4,21 (2H), 6,07 (1H), 7,59 (1H)

3.1.10 Látka **J**

Výtěžek reakce byl 1,7772 g látky **J**, což odpovídá 72,27 % teoretického výtěžku. Látka **J** byla identifikována pomocí NMR jako cílová dle reakčního schématu. Bod tání této látky má hodnoty v rozmezí 137,2 – 137,6 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,46 (3H), 1,53 (2H), 1,73 (4H), 1,905 (2H), 3,298 (1H), 3,65 (1H), 3,75 (2H), 3,95 (1H), 4,27 (2H), 5,55 (1H), 8,33 (1H)

3.1.11 Látka **K**

Syntetizovaná látka **K** nebyla v této syntéze připravena, pomocí TLC byla ve výsledné směsi identifikována pouze výchozí látka **J**. Ani po změně reakčních podmínek nedošlo k vytvoření cílového produktu. NMR spektrum, jakožto i elementární analýza a bod tání, nebyly stanoveny.

3.1.12 Látka **L**

Výtěžek reakce byl 326,4 mg látky **L**, což odpovídá 56,4 % teoretického výtěžku. Struktura připravené látky byla potvrzena pomocí NMR spektra. Pomocí bodotávku bylo zjištěno, že připravená látka taje za rozkladu při dosažení teploty 211,6 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,44 (6H), 1,70 (6H), 3,26 (3H), 3,32 (1H), 3,49 (3H), 3,71 (2H), 4,22 (2H), 4,64 (1H), 5,95 (1H), 7,6 (1H), 12,12 (1H)

3.1.13 Látka **M**

Výtěžek reakce byl 1,583 g látky **M**, což odpovídá 59,511 % teoretického výtěžku. Struktura potvrzena NMR. Bod tání byl stanoven v rozmezí 268,2 – 268,4 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,54 (6H), 1,615 (3H), 3,3 (1H), 3,87 (1H), 4,4 (1H), 8,07 (1H), 13,11 (1H)

3.1.14 Látka **N**

Cílová látka **N** nebyla připravena, pomocí TLC byla ve výsledné směsi identifikována pouze výchozí látka **M**. Ani změna reakčních podmínek nevedla ke vzniku produktu. NMR spektrum, jakožto i elementární analýza a bod tání, nebyly stanoveny.

Tabulka 4: Výsledky elementární analýzy připravených látek.

Látka	Vypočteno		Prvek	Naměřeno	
	Počet atomů	%		%	Poměr atomů
A	10	56,1	C	35,8	2
	8	3,7	H	1,48	2
	5	32,7	N	30,8	1
	1	7,5	O	31,9	1
B	12	52,7	C	48,6	5
	15	5,5	H	5,5	6
	7	35,9	N	32,1	3
	1	5,9	O	13,7	1
C	9	49,5	C	43,5	2
	8	3,7	H	4,0	2
	5	32,1	N	25,5	1
	2	14,7	O	27,1	1
D	14	55,8	C	52,4	7
	19	6,3	H	6,73	10
	7	32,5	N	30,5	3
	1	5,3	O	10,4	1
F	11	61,1	C	54,8	2
	14	6,5	H	5,9	3
	5	32,4	N	28,9	1
G	13	56,7	C	52,2	1
	21	7,6	H	10,1	3
	7	35,6	N	44,0	1
H	19	52,1	C	48,3	3
	22	5,0	H	4,7	4
	10	32,0	N	27,8	2
	3	11,0	O	19,2	1
J	16	64,0	C	54,8	4
	22	7,3	H	6,0	5
	5	23,3	N	19,6	1
	1	5,3	O	19,5	1
L	13	56,5	C	55,4	9
	20	7,3	H	7,3	14
	6	30,4	N	28,7	4
	1	5,8	O	8,6	1
M	10	59,4	C	52,7	6
	12	5,9	H	5,4	7
	5	34,6	N	30,5	3

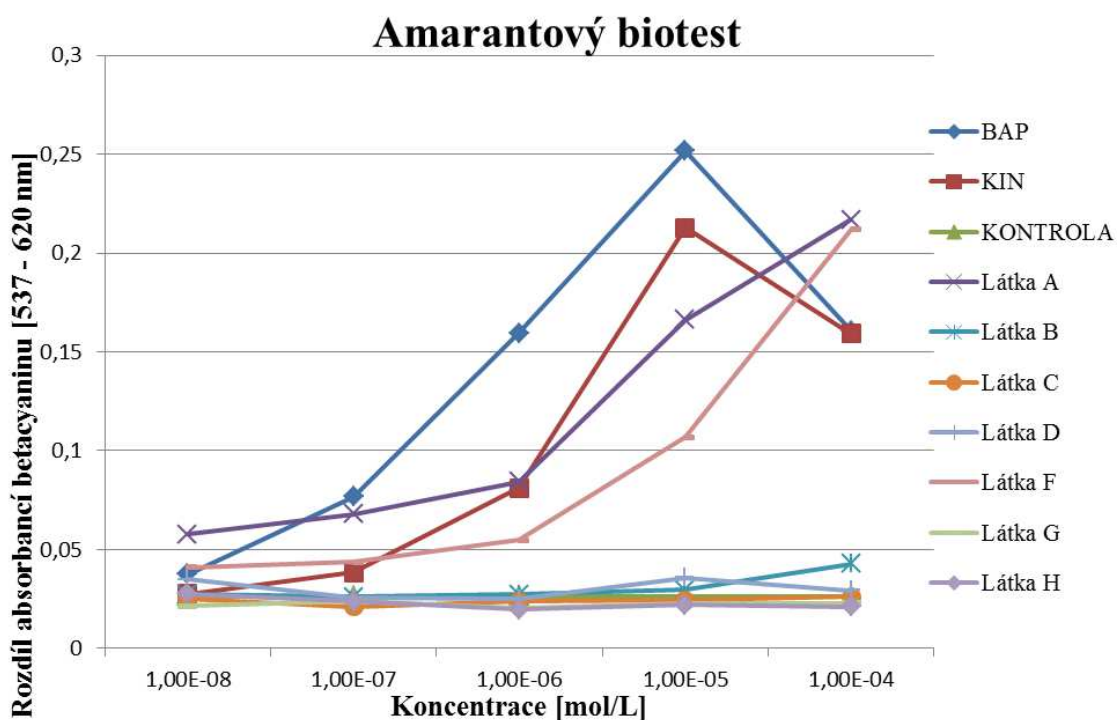
I přes vysokou čistotu testovaných látek je možné ve výsledcích elementární analýzy pozorovat odchylky ve vypočtených a naměřených výsledcích, což lze pravděpodobně dát za vinu nespecifikovaným nečistotám ve vzorku.

3.2 Cytokininové biotesty

3.2.1 Amarantový biotest

LÁTKA	OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE (mol.l-1)	RELATIVNÍ AKTIVITA (%)
BAP	10^{-5}	100
KIN	10^{-5}	85,54
A	10^{-4}	77,93
B	10^{-4}	15,41
C	10^{-4}	17,39
D	10^{-4}	12,52
F	10^{-4}	98,81
G	10^{-7}	8,29
H	10^{-8}	9,21

Tabulka 5: Biologická aktivita připravených látek testovaných v amarantovém biotestu. Optimální koncentrace uvádí koncentraci, při které má látka nejvyšší aktivitu. Relativní aktivita udává průměr procentových hodnot nejvyšších aktivit vůči aktivitě standardu BAP, je vypočtena na základě 2 testů, v němž každém bylo provedeno 5 opakování.

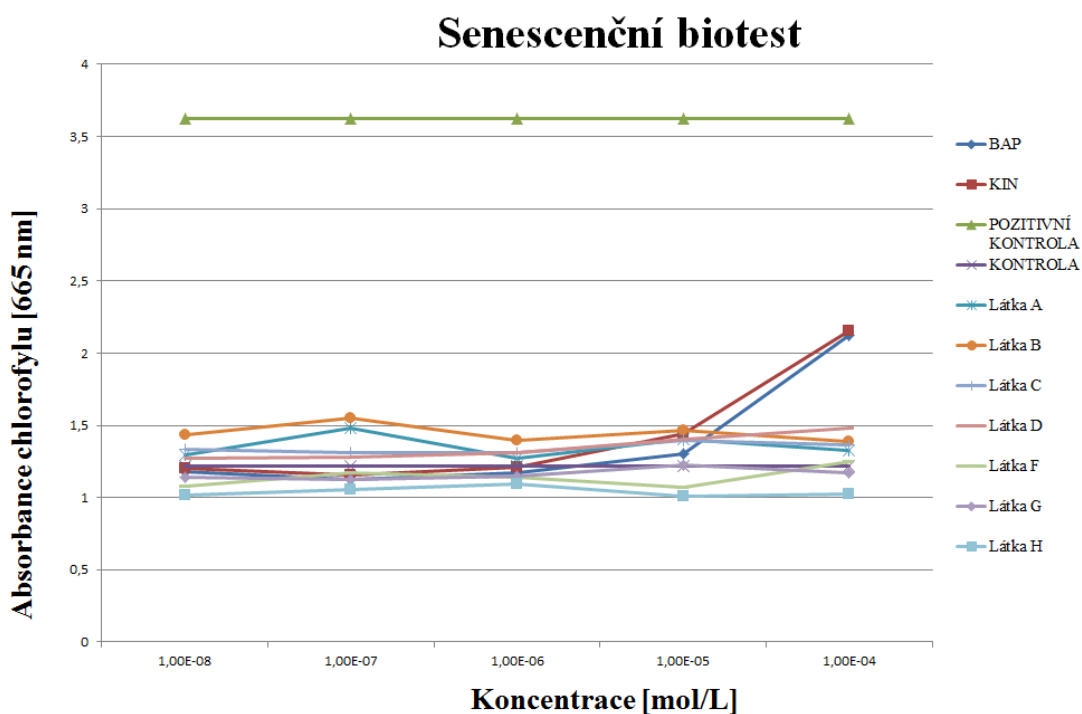


Graf 1: Průměrné aktivity látek testovaných v amarantovém biotestu.

3.2.2 Senescenční biotest

LÁTKA	OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE (mol.l-1)	RELATIVNÍ AKTIVITA (%)
BAP	10^{-4}	100
KIN	10^{-4}	97,86
A	10^{-7}	11,3
B	10^{-7}	19,62
C	10^{-5}	15,84
D	10^{-4}	23,36
F	10^{-4}	19,95
G	10^{-4}	19,51
H	10^{-6}	9,35

Tabulka 6: Biologická aktivita připravených látek testovaných v amarantovém biotestu. Optimální koncentrace uvádí koncentraci, při které má látka nejvyšší aktivitu. Relativní aktivita udává průměr procentových hodnot nejvyšších aktivit vůči aktivitě standardu BAP, je vypočtena na základě 2 testů, v němž každém bylo provedeno 5 opakování.



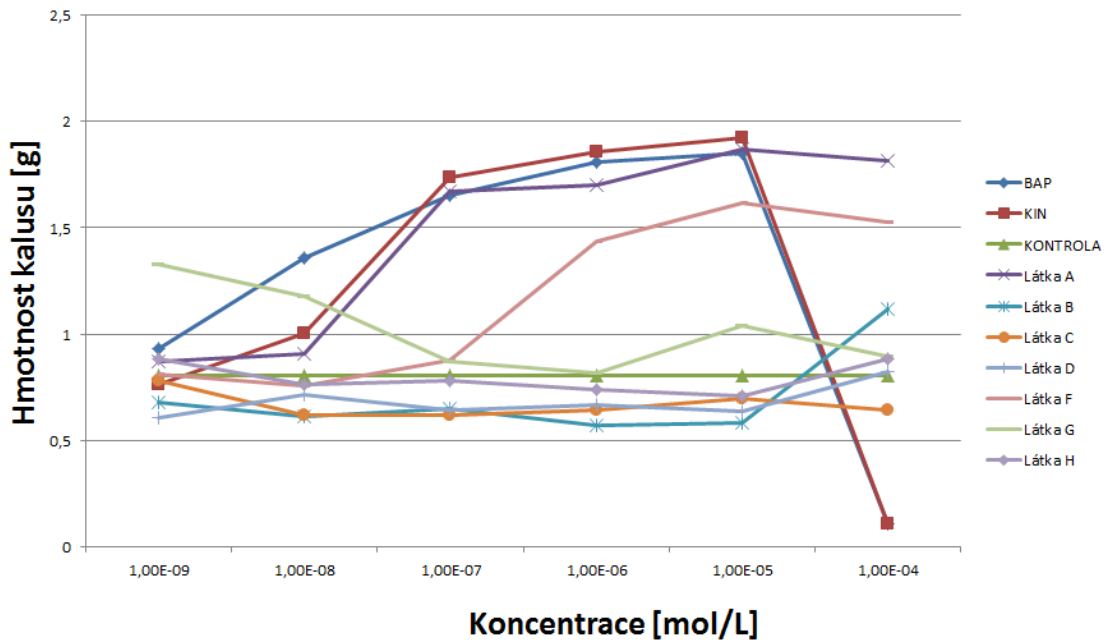
Graf 2: Průměrné aktivity látek testovaných v senescenčním biotestu.

3.2.3 Kalusový biotest

LÁTKA	OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE (mol.l-1)	RELATIVNÍ AKTIVITA (%)
BAP	10^{-6}	100
KIN	10^{-5}	99,91
A	10^{-5}	99,54
B	10^{-4}	38,27
C	10^{-9}	5,14
D	10^{-4}	10,3
F	10^{-5}	63,11
G	10^{-9}	35,49
H	10^{-4}	1,36

Tabulka 7: Biologická aktivita připravených látek testovaných v kalusovém biotestu. Optimální koncentrace uvádí koncentraci, při které má látka nejvyšší aktivitu. Relativní aktivita udává průměr procentových hodnot nejvyšších aktivit vůči aktivitě standardu BAP, je vypočtena na základě 2 testů, v němž každém bylo provedeno 5 opakování.

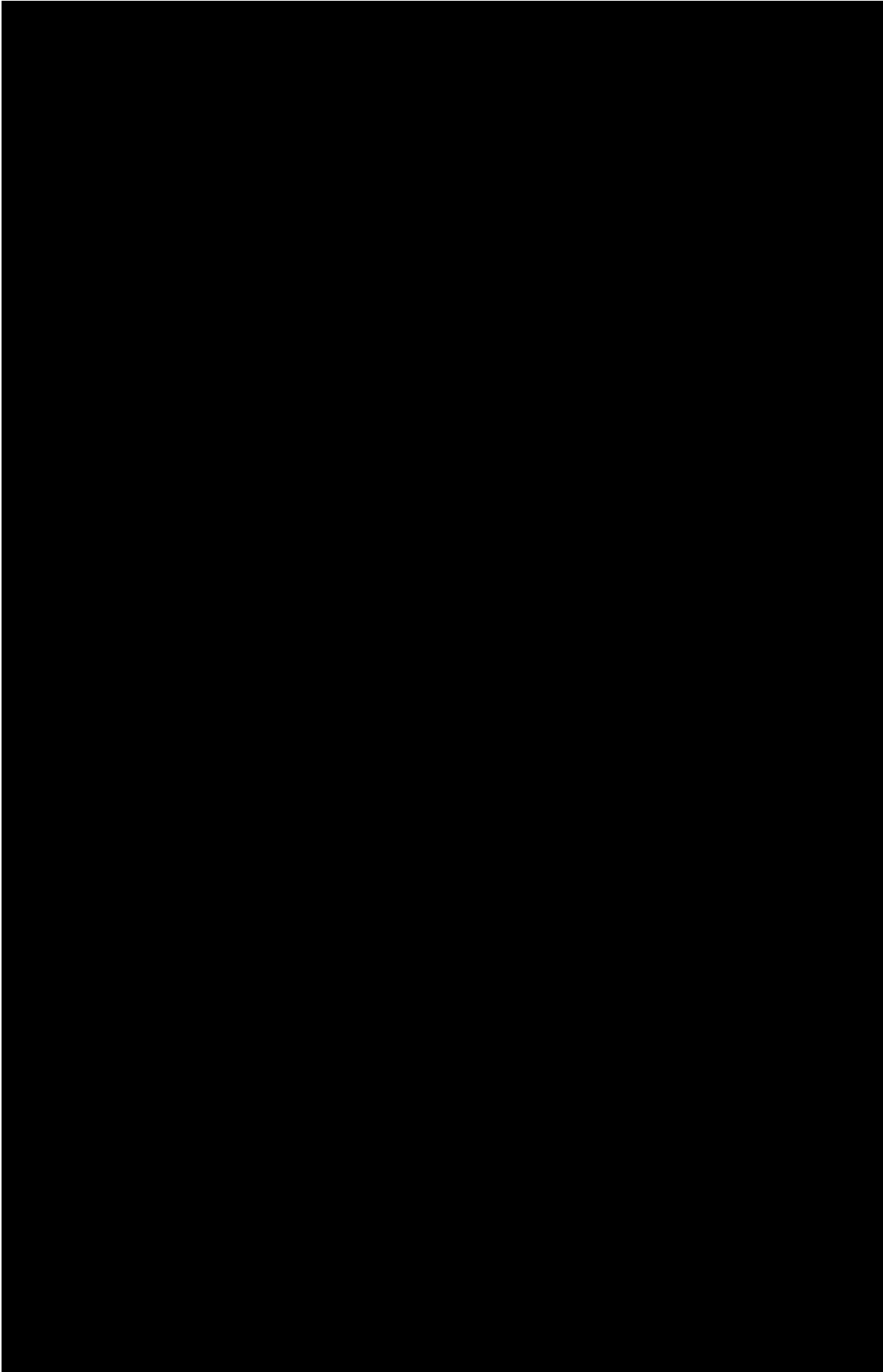
Kalusový biotest



Graf 3: Průměrné aktivity látek testovaných v kalusovém biotestu.

3.3 Receptorový test

Cílem tohoto testu bylo porovnat schopnost vazby připravených látek (C a H) a standardů (kinetin a iP) na receptor (ZmHK1 nebo ZmHK3), jež spouští signální dráhu vedoucí k expresi lacZ genu. Ani jedna z testovaných látek však signální dráhu ani v jednom z testovaných receptorů nespouštěla.



Tabulka 7: Cytotoxicita testovaných látek. IC_{50} udává v μM koncentraci látky, při níž dojde k 50 % inhibici aktivity mitochondriálních enzymů.

3.5 Testování cytotoxicity na lidských diploidních fibroblastech

Výsledkem tohoto biotestu je životaschopnost buněk stanovena pomocí hodnoty IC_{50} , která udává koncentraci testované látky (v μM) při níž dojde k 50% inhibici mitochondriálních enzymů.

Látka	IC_{50} (μM)
A	>50
B	>100
C	>25
D	>100
F	>25
G	86,83
H	>25

Tabulka 8: Cytotoxicita testovaných látek. IC_{50} udává v μM koncentraci látky, při níž dojde k 50 % inhibici aktivity mitochondriálních enzymů.

4 DISKUZE

4.1 Cytokinové biotesty

Ve všech třech výše uvedených cytokinových biotestech byly testovány připravené látky **A**, **B**, **C**, **D**, **F**, **G** a **H**.

Ve výsledcích amarantového biotestu lze pozorovat zajímavé skutečnosti. Testované látky **A** a **F** vykazují vysoký rozdíl absorbancí barviva betacyaninu. Křivky stanovené z hodnot naměřených pro tyto dvě látky mají vzrůstající trend, jenž je podobný jak zvyšující se křivce BAP, tak křivce Kinetinu. Na rozdíl však od křivky pro BAP a pro Kinetin, jež dosahují nejvyšší hodnoty a tedy i aktivity při koncentraci 10^{-5} mol/L, dosahují testované látky **A** a **F** nejvyššího rozdílu absorbancí betacyaninu, a zároveň i aktivity při vyšší koncentraci, a to 10^{-4} mol/L. Lze tedy říci, že tyto dvě látky jsou svou aktivitou srovnatelné s BAP a Kinetinem, a při zvýšení koncentrace nad 10^{-5} mol/L vykazují dokonce vyšší biologickou aktivitu než tyto dvě standardní látky. Lze předpokládat, že při dalším zvýšení koncentrace těchto testovaných látek **A** a **F** by mohlo dojít k ještě výraznějšímu vzrůstu biologické aktivity, jež dosáhla u látky **A** téměř 78 % standardu BAP, a u látky **F** bylo dokonce naměřeno téměř 99 % aktivity standardu BAP. S ohledem na strukturu látky **A** lze odvodit, že takovéto hodnoty aktivity látka dosáhla, jelikož se jedná o analog samotného kinetinu, jehož molekula obsahuje navíc pouze atom chloru v poloze C2. Struktura látky **F** je podobná, jedná se o purin obsahující opět atom chloru v poloze C2, a azepan jako substituent v poloze C6 purinového skeletu. Je možné tedy odvodit souvislost mezi přítomností chloru v poloze C2 a zvýšení aktivity, která může být u látky **F** dále podpořena přítomností azepanu v poloze C6. Ostatní testované látky **B**, **C**, **D**, **G** a **H** nevykazovaly v tomto testu znatelné zvýšení aktivity. Látky **B**, **C** a **D** vykázaly hodnoty aktivity standardu BAP v rozmezí 12 – 17 %. U všech těchto tří byla nejvyšší aktivita naměřena při koncentraci 10^{-4} mol/L, je možné tedy předpokládat, že při dalším zvyšování koncentrace by jejich aktivita mohla ještě stoupat. Lze však uvažovat, že substituent v poloze C2 výrazně ovlivňuje výslednou aktivitu testované látky. Substituent v poloze C6 je v těchto třech případech vždy stejný, a to furfurylamin. V případě látky **B** je substituentem v poloze C2 ethandiamin, a v případě látky **C** ethandiamin tvořící raménko na němž je navázána fluorescenční značka NBD-Cl. U látky **D** je substituentem polohy C2 butandiamin. Všechny tyto substituenty výrazně snížily aktivity těchto látek v porovnání s aktivitou

látky **A**. Aktivity látek **G** a **H** nedosáhly výrazných hodnot, v obou případech se pohybovaly pod 10 % aktivity standardu BAP. Jejich hodnoty při všech testovaných koncentracích kolísaly kolem hodnoty kontroly. Je tedy možné usoudit, že opět změna substituentu v poloze C2 z atomu chloru na ethandiamin v případě látky **G**, a na ethandiamin s navázaným fluorescenčním barvivem NBD-Cl, vedla k výraznému poklesu aktivity látky jak vůči standardu BAP, tak Kinetinu, tak i látky **F**, jenž je látkám **G** a **H** strukturně blízká.

Z výsledků senescenčního testu lze vyvodit, že nejlepších výsledků z testovaných látek dosáhla, v poměru ke standardům BAP a Kinetin, látka **D**. Bylo u ní naměřeno v průměru 23 % aktivity standardu BAP, jehož aktivita je srovnatelná s aktivitou Kinetinu. U látky **D** stoupá křivka se zvyšující se koncentrací, a nelze pozorovat její výraznější výkyv. Křivka této látky kolísá v rozmezí hodnot absorbance chlorofylu 1 – 1,5. Nejvyšší aktivitu tato látka vykazuje při koncentraci 10^{-4} mol/L, což odpovídá standardům BAP a Kinetinu, jejichž aktivita rapidně vzrůstá při zvýšení koncentrace z 10^{-5} mol/L na 10^{-4} mol/L. Charakter výsledné křivky látky **D** napovídá, že při dalším zvyšování koncentrace této látky by mohlo dojít i k dalšímu zvyšování aktivity. Mírnou podobu křivky látky **D** lze pozorovat u křivky testované látky **C**, která má podobný charakter a v části grafu se křivkou látky **D** překrývá, má také stoupající charakter a dosahuje nejvyšší aktivity při koncentraci 10^{-5} mol/L, což je rozdíl od standardů BAP a Kinetinu. Při dalším zvýšení koncentrace na 10^{-4} má však křivka látky **C** klesající charakter. Z ostatních výsledků tohoto biotestu je možné zmínit látky **A** a **B**, jejichž výsledné křivky v grafu kopírovaly stejný trend, a které dosáhly nejvyšší aktivity při velmi nízké koncentraci 10^{-7} mol/L. Procentuálně tyto dvě látky vykazovaly aktivitu v rozmezí 10 – 20 % standardu BAP. Poslední testované látky **F**, **G** a **H** nevykázaly přílišnou aktivitu v tomto biotestu. Křivky grafu pro tyto látky se při všech testovaných koncentracích pohybovaly kolem hodnoty pro kontrolu, a vykazovaly velmi nízkou hladinu absorbance chlorofylu, i když v průměru obou testů dosáhly látky **F** a **G** shodně přes 19 % aktivity standardu BAP. Vzhledem ke struktuře těchto látek lze uvažovat, že v tomto biotestu hraje výrazný vliv na aktivitu testovaných látek jak substituent v poloze C2, tak substituent v poloze C6 uhlíkového skeletu. Obecně testované látky **A**, **B**, **C** a **D**, jejichž molekula obsahuje v poloze C6 substituent furfurylamin, což je analogie k samotnému kinetinu, vykazují vyšší aktivity než testované látky **F**, **G** a **H**, v jejichž struktuře je v poloze C6 substituent azepan. Lze říci, že azepan, jako

substituent v poloze C6, způsobuje velmi nízkou aktivitu, a to nehledě na změnu substituentu v poloze C2. Naopak vhodná kombinace substituentu v poloze C2 s furfurylaminem v poloze C6 výsledně zvýší aktivitu dané látky. Lze pozorovat, že se vzrůstající velikostí molekuly, která je substituována v poloze C2 uhlíkového skeletu, roste i výsledná aktivita látky. Jako důkazem jsou již zmíněné výsledky při substituci atomu chloru u látky **A**, ethandiminu u látky **B**, ethandiaminu s fluorescenční značkou NBD-Cl u látky **C** a butandiaminu v případě látky **D**.

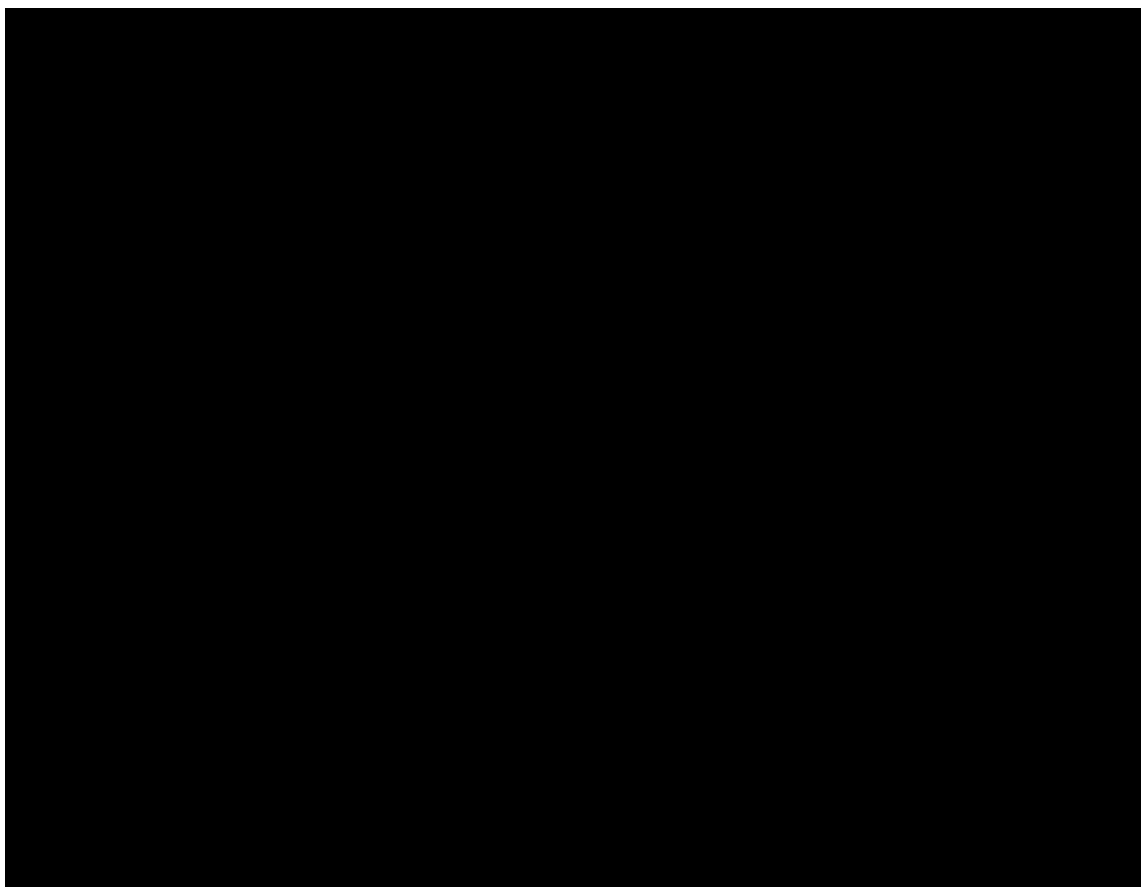
Z výsledků kalusového biotestu je nutné vyzdvihnout zejména výsledky látek **A** a **F**. Hlavně testovaná látka **A** vykazovala velmi pozitivní výsledky, nejvyšší aktivitu dosáhla při koncentraci 10^{-5} mol/L, což stejná koncentrace při jaké vykazuje nejvyšší aktivitu standard BAP. Odpovídá i koncentraci, při které dosahuje nejvyšší aktivitu Kinetin, který dle grafu dosáhl v tomto biotestu srovnatelnou aktivitu jako standard BAP, a to téměř 100 % aktivity standardu BAP. Aktivita testované látky **A** dosáhla dle výsledků také téměř 100 % aktivity standardu BAP, došlo tedy ke vzniku srovnatelného množství kalusu. Příčinou takového působení testované látky **A** je nejspíše analogická struktura s molekulou Kinetinu. Základem struktury látky **A** je molekula Kinetinu, jež obsahuje v poloze C2 uhlíkového skeletu jako substituent atom chloru. Lze však zmínit, že oproti standardu BAP a Kinetinu, jejichž aktivita se zvýšením koncentrace z 10^{-5} mol/L na 10^{-4} mol/L prudce klesne pod hranici kontroly, aktivita testované látky **A** klesne jen velmi mírně. Je možné tedy říci, že látka **A** i při vyšší koncentraci než 10^{-5} mol/L způsobuje výraznou tvorbu kalusu. Dále stojí za zmínku data, získaná pro látku **F**. Tato látka dosáhla 63 % aktivity standardu BAP, nejvyšší aktivitu látka prokázala při koncentraci 10^{-5} mol/L což také odpovídá koncentraci, při které má nejvyšší aktivitu jak standard BAP, tak i Kinetin. Avšak podobně jako testovaná látka **A**, i látka **F** prokazuje pouze mírný pokles své aktivity při zvýšení koncentrace z 10^{-5} na 10^{-4} mol/L. Tvar křivky pro látku **F** je srovnatelný s křivkou pro látku **A**. U těchto dvou látek lze pozorovat analogii v jejich struktuře. U obou je substituentem v poloze C2 atom chloru. Změna je pouze v substituentu v poloze C6, jenž je v případě látky **A** furfurylamin, v případě látky **F** azepan. Je tedy možné říci, že furfurylamin jako substituent vykáže vyšší výslednou aktivitu látky, než azepan jako substituent. Z dalších výsledků je patrné, že změna substituentu v poloze C2 výrazně sníží výslednou aktivitu vzniklé látky. Ze zbylých testovaných látek, pouze látka **G** vykazovala aktivitu při všech testovaných koncentracích nad hodnotou kontroly. Zajímavé je však zmínit, že tato

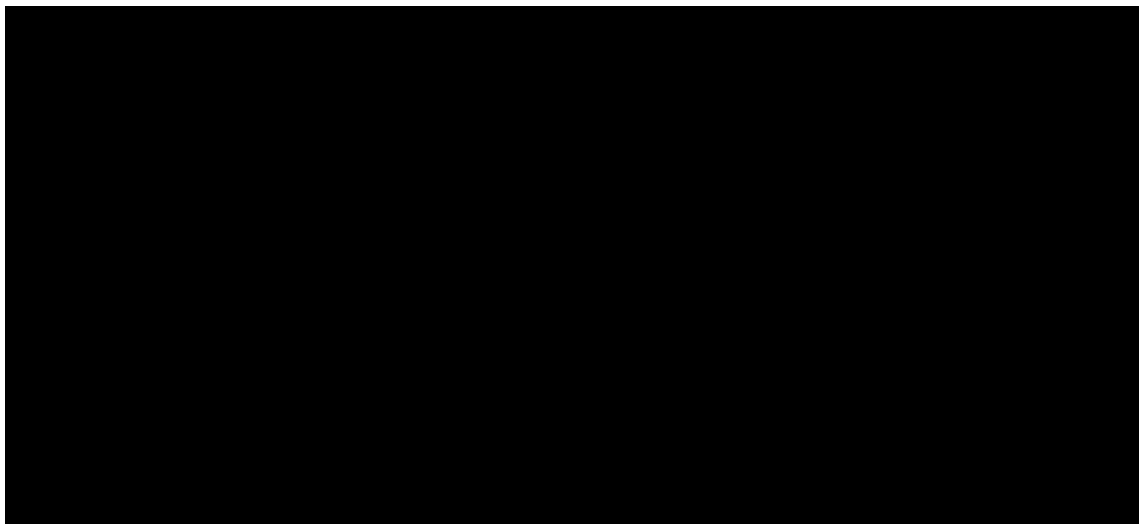
zmíněná látka vykazala nejvyšší aktivitu při nejnižší testované aktivitě, tedy 10^{-9} mol/L. Ostatní testované látky **B**, **C**, **D** a **H** nevykázaly žádné výrazné výsledky v tomto kalusovém biotestu. Jejich výsledné křivky se většinou při všech testovaných koncentracích pohybovalo pod hodnotou kontroly. Z tohoto je možné uzavřít, že se zvětšováním molekuly substituentu v poloze C2 dochází k výraznému poklesu aktivity vzniklých látek, a že diaminy s různě dlouhým uhlíkovým řetězcem nejsou vhodné pro zvýšení aktivity vzniklých látek, naopak jejich navázání způsobí výrazné snížení aktivity oproti standardu BAP i Kinetinu.

4.2 Receptorový test

Ani jedna z testovaných látek (**C** a **H**) nespouštěla cytokininovou signální dráhu, jelikož nebylo možné pozorovat znatelnou fluorescenci. Nedošlo tedy k navázání testovaných látek na receptory (ZmHK1 a ZmHK3). Ani jedna z testovaných látek nezpůsobila puštění signální dráhy.

4.3 Kinásový test na lidských kožních buňkách a testování cytotoxicity





4.4 Testování cytotoxicity na lidských diploidních fibroblastech

V tabulce 8 jsou shrnuty výsledky cytotoxicity jednotlivých připravených látek. Z výsledků je patrné, že látky **C**, **F** a **H** jsou pro lidské diploidní fibroblasty vysoce toxické. Jejich koncentrace, při které dojde k 50% inhibici mitochondriálních enzymů, překročila pouze 25 μM . Mezi toxické lze zařadit také testovanou látku **A**, jelikož její koncentrace nad 50 μM způsobuje 50% inhibici mitochondriálních enzymů. Naopak připravené látky **B** a **D** je možné dle výsledků testu označit jako netoxické pro lidské diploidní fibroblasty, protože jejich hodnota IC_{50} překračuje koncentraci 100 μM . Jako netoxická by se nejspíše dala označit i látka **G**, jejíž až koncentrace přes 86 μM způsobila 50% inhibici mitochondriálních enzymů. Ohledem na strukturu testovaných látek lze říci, že pro netoxicitu látky strukturně založené na molekule kinetinu je významný substituent v poloze C2 uhlíkového skeletu. Netoxické látky **B** a **D** obsahují jako základ struktury kinetinu a substituent C2 ethandiamin, resp. butandiamin. Tyto alifatické řetězce zřejmě způsobují netoxicitu těchto látek. Podobná situace je také u látky **G**, jejímž C2 substituentem je také alifatický ethandiamin. Snížení toxické koncentrace této látky oproti látkám **B** a **D** způsobuje nejspíše azepan, jako C6 substituent této látky. Ostatní testované látky, **A**, **C**, **F** a **H**, buď alifatický substituent ve své struktuře neobsahují, nebo je na tento substituent navázána molekula fluorescenčního barviva NBD-Cl. Lze tedy říci, že alifatické diaminové řetězce substituované v poloze C2 uhlíkatou kostru kinetinu způsobují snížení toxicity vzniklých látek.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium aromatických cytokininů, s hlavním zaměřením na kinetin, a jejich fluorescenční značení. Jednalo se především o jejich přípravu a testování jejich biologické aktivity v řadě biotestů.

Teoretická část je shrnutím dosavadních znalostí o celé skupině cytokininů. Dále tato část obsahuje dosavadní poznatky o kinetinu. Je zde popsána jeho struktura, výskyt, biosyntéza a funkce a vlastnosti, jimiž ovlivňuje jak buňky, tak celé rostliny a živočichy. Jedna z kapitol je zde také věnována derivátům kinetinu, konkrétně kinetin ribosidu, a to pro jeho význačné vlastnosti, kterými se liší od samotného kinetinu. Teoretická část je zakončena kapitolou o fluorescenčním značení a fluorescenčních značkách. Zde jsou uvedeny fluorescenční značky, jež jsem prakticky použil.

V experimentální části je práce zaměřena především na přípravu derivátů kinetinu v poloze C2 a C6 purinového skeletu. Pro tuto přípravu byla použita klasická syntéza ve varné baňce. Je zde uveden výčet provedených syntéz. K samotnému testování v cytokininových biotestech byla připravena série látek **A**, **B**, **C**, **D**, **F**, **G** a **H**, které byly také otestovány na cytotoxicitu na lidských diploidních fibroblastech, pro receptorový test byly připraveny dvě látky (**C** a **H**). Jejich struktura byla potvrzena pomocí NMR. Ostatní látky, které měly být syntetizovány a testovány ve stejných testech, se nepodařilo připravit. Důvodem bylo nereagování dle reakčního schématu a vznik neznámých sloučenin nebo nemožnost izolovat sloučeniny z roztoku za daných podmínek. U těchto látek nebyla struktura potvrzena pomocí NMR. Dále byly také dva připravené deriváty kinetinu (látky **G** a **L**) testovány na cytotoxicitu na lidských fibroblastech a keratinocytech, a podstoupily kinásový test. Byly provedeny pokusy o syntézu stejných látek i pomocí mikrovlnného reaktoru. Tento postup pomocí reaktoru však nebyl úspěšný a nedocházelo k reakci a vzniku cílových látek. S ohledem na tyto fakta bylo od syntéz v mikrovlnném reaktoru upuštěno a reakce byly prováděny klasickou syntézou ve varné baňce. Tudíž není možné porovnat výhody a nevýhody reaktoru při přípravě biologicky aktivních a fluorescenčně značených látek.

Připravené látky byly postoupeny testování v cytokininových biotestech (zahrnující amarantový, senescenční a kalusový biotest), což mělo prokázat, zda látky vykazují cytokininovou aktivitu. Při porovnání všech testovaných látek napříč všemi biotesty lze vyvodit, že nejlepších výsledků dosáhly testované látky **A** a **F**. V amarantovém a kalusovém biotestu dosáhla nejlepších výsledků látka **A**, naopak

v senescenčním biotestu byla tato látka na úrovni negativní kontroly, s výjimkou koncentrace 10^{-7} mol/L. V těchto dvou biotestech měla nejlepší výsledky, hned po látce **A**, testovaná látka **F**. Důvodem takovýchto výsledků těchto dvou látek je zřejmě jejich podobná struktura, jejíž velká část je tvořena molekulou Kinetinu obsahující změny substituentů v polohách C2 a C6 uhlíkového skeletu. V senescenčním biotestu dosáhla nejlepších výsledků látka **D**, což napovídá pozitivní vliv delšího diaminového substituentu v poloze C2.

Negativních výsledků bylo dosaženo i v receptorovém testu, kdy ani jedna z testovaných látek (**C** a **H**) nebyla schopná navázání na receptor a nespouštěla cytokininovou signální dráhu. Látky **G** a **L** prošly testem na cytotoxicitu, jehož výsledky naznačují, že látka **L** je pro testované buňky velmi toxickou, a látka **G** se dá nejspíše za toxickou pro lidské buňky považovat také.

Cytotoxicita na lidských diploidních fibroblastech byla stanovena pro látky **A**, **B**, **C**, **D**, **F**, **G** a **H**. Za netoxické pro lidské buňky lze na základě tohoto testu označit látky **B**, **D** a **G**, což je nejspíše spojeno s jejich strukturou, jelikož všechny tyto látky obsahují ve své molekule v poloze C2 alifatický diamin (ethandiamin a butandiamin), je tedy možno říci, že takovýto diamin způsobuje netoxicitu vzniklé sloučeniny nehledě na substituent v poloze C6. Oproti tomu látky **A**, **C**, **F** a **H** lze považovat za toxické pro lidské buňky, což lze nejspíše spojit s jejich strukturou molekuly, jelikož obsahují v poloze C2 substituovaný chlor nebo diamin s fluorescenční značkou NBD-Cl.

Závěrem lze říci, že testované látky **A** a **F** sice vykazovaly nejlepší výsledky ve všech třech cytokininových biotestech, ale z výsledků cytotoxicity je jasné, že tyto látky jsou toxické pro lidské buňky.

Celkově bylo v průběhu této diplomové práce připraveno 8 derivátů kinetinu, a to se substitucí jak v poloze C2, tak v poloze C6.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AMASINO, Richard. 1955: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone. *Plant Physiology*. 2005, roč. 138, č. 3, s. 1177-1184. DOI: 10.1104/pp.104.900160. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.900160>
- BAMBERGER, E. a A. M. MAYER. Effect of Kinetin on Formation of Red Pigment in Seedlings of *Amaranthus retroflexus*. *Science*. 1960, roč. 131, č. 3407, s. 1094-1095. DOI: 10.1126/science.131.3407.1094. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.131.3407.1094>
- BARCISZEWSKI, Jan, Frank MASSINO a Brian F.C. CLARK. Kinetin-A multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2006, č. 40, s. 182-192. DOI: 10.1016/j.ijbioma.2006.06.024. Dostupné z: www.elsevier.com
- BARCISZEWSKI, Jan, Gunhild E. SIBOSKA, Bent O. PEDERSEN, Brian F.C. CLARK a Suresh I.S. RATTAN. A mechanism for the in vivo formation of N6-furfuryladenin, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA. *FEBS Letters*. 1997, roč. 414, č. 2, s. 457-460.
- BARCISZEWSKI, Jan, Suresh I.S. RATTAN, Gunhild E. SIBOSKA a Brian F.C. CLARK. Kinetin - 45 years on. *Plant Science*. 1999, roč. 148, č. 1, s. 37-45.
- BRAULT, M., Maldiney, R. and Miginiac, E. Cytokinin-binding proteins. *Physiologia Plantarum*. 1997, roč. 100, s. 520-527. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03056.x
- BRESHEARS, S. R., S. S. WANG, S. G. BECHTOLT a B. E. CHRISTENSEN. Purines. VIII. The Aminolysis of Certain Chlorosubstituted Purines 1. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1959, roč. 81, č. 14, s. 3789-3792 [cit. 2012-04-22]. DOI: 10.1021/ja01523a075. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01523a075>
- CHOI, Bo-Hwa, Wanil KIM, Qiuxia Chelsia WANG, Dong-Chan KIM, Swee Ngim TAN, Jean Wan Hong YONG, Kyong-Tai KIM a Ho Sup YOON. Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells. *Cancer Letters*. 2008, roč. 261, č. 1, s. 37-45. DOI:

10.1016/j.canlet.2007.11.014.

Dostupné

z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383507005393>

D'AGOSTINO, Ingrid B. a Joseph J. KIEBER. Molecular mechanism of cytokinin action. *Current Opinion in Plant Biology*. 1999, roč. 2, č. 5, s. 359-364. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00005-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00005-9)

GAJDOŠOVÁ, Silvia, Lukáš SPÍCHAL, Miroslav KAMÍNEK, Klára HOYEROVÁ, Ondřej NOVÁK, Petre I. DOBREV, Petr GALUSZKA, Petr KLÍMA, Alena GAUDINOVÁ, Eva ŽIŽKOVÁ, Jan HANUS, Martin DANČÁK, Bohumil TRÁVNÍČEK, Bedřich PEŠEK, Martin KRUPÍČKA, Radomíra VAŇKOVÁ, Miroslav STRNAD a Václav MOTYKA. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2011, roč. 62, č. 8, s. 2827-2840. DOI: 10.1093/jxb/erq457. Dostupné z: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erq457>

GALUSZKA, Petr, Lukáš SPÍCHAL, David KOPEČNÝ, Petr TARKOWSKI, Jitka FRÉBORTOVÁ, Marek ŠEBELA a Ivo FRÉBORT. Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2008, roč. 34, s. 203-264. Dostupné z: www.sciencedirect.com

GONÇALVES, M. Sameiro T. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chemical Reviews*. 2009, roč. 109, č. 1, s. 190-212. DOI: 10.1021/cr0783840. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr0783840>

GRIFFAUT, Bernard, Romain BOS, Jean-Claude MAURIZIS, Jean-Claude MADELMONT a Gérard LEDOIGT. Cytotoxic effects of kinetin ribosid on mouse, human and plant tumour cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2004, roč. 34, č. 4, s. 271-275. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2004.06.004.

HAGGAG, Rim, Saied BELAL a Rasha SHAALAN. Derivatization with 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole for the Spectrophotometric and Differential Pulse Polarographic Determination of Acetylcysteine and Captopril. *Scientia Pharmaceutica*. 2008, roč. 76, č. 1, s. 33-48. DOI: 10.3797/scipharm.0711-02. Dostupné z: <http://www.scipharm.at/2008/1/33>

- HIROSE, Naoya, Kentaro TAKEI, Takeshi KUROHA, Tomoe KAMADANOBUSADA, HAYASHI a Hitoshi SAKAKIBARA. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany: Transport of Plant Growth Regulators Special Issue* [online]. 2008, roč. 59, č. 1, s. 75-83 [cit. 2013-01-22]. DOI: 10.1093/jxb/erm157. Dostupné z: www.jxb.oxfordjournals.com
- HOLUB, Jan, Jan HANUŠ, David E. HANKE a Miroslav STRNAD. Biological activity of cytokinins derived from Ortho- and Meta-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*. 1998, roč. 26, č. 2, s. 109-115. DOI: 10.1023/A:1006192619432. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1006192619432>
- HUTCHINSON, Claire E. a Joseph J. KIEBER. Cytokinin Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2002, roč. 14, č. 1, s. 47-59. DOI: 10.1105/tpc.010444. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.010444>
- KUDO, Toru, Takatoshi KIBA a Hitoshi SAKAKIBARA. Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010, roč. 52, č. 1, s. 53-60. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x>
- MAŁECKI, Piotr H., Wojciech RYPNIEWSKI, Maciej SZYMAŃSKI, Jan BARCISZEWSKI a Arne MEYER. Binding of the plant hormone kinetin in the active site of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2012, roč. 1824, č. 2, s. 334-338. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.10.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963911002822>
- MENG, Qinghua, Meijuan YU, Haifeng ZHANG, Jicun REN a Deyin HUANG. Synthesis and application of N-hydroxysuccinimidyl rhodamine B ester as an amine-reactive fluorescent probe. *Dyes and Pigments*. 2007, roč. 73, č. 2, s. 254-260. DOI: 10.1016/j.dyepig.2005.12.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143720806000155>
- MIK, Václav, Lucie SZÜČOVÁ, Mária ŠMEHILOVÁ, Marek ZATLOUKAL, Karel DOLEŽAL, Jaroslav NISLER, Jiří GRÚZ, Petr GALUSZKA, Miroslav STRNAD a Lukáš SPÍCHAL. N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence

agents. *Phytochemistry*. 2011, roč. 72, č. 8, s. 821-831. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.02.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942211000719>

MOK M. C., MOK D. W. S., ARMSTRONG D. J., SHUDO K., ISOGAI Y., OKAMOTO T. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron). *Phytochemistry*. 1982, roč. 21, s. 1509–1511.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1983, roč. 65, 1-2, s. 55-63 [cit. 2013-12-16]. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>

POKORNÝ, Ondřej. Regulace teploty mikrovlnného reaktoru [online]. Brno, 2008 [cit. 2013-12-13]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/xmlui/bitstream/handle/11012/13178/diplomov%C3%A1%20pr%C3%A1ce.pdf?sequence=1>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.

SAKAKIBARA, Hitoshi. Cytokinins: Activity, Biosynthesis and Translocation. *Plant Biology*. 2006, roč. 57, s. 431-449. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231. Dostupné z: <http://arjournals.annualreviews.org>

SCHMÜLLING, Thomas (2004) Cytokinin. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.) Academic Press/Elsevier Science.

STIRK, W. A. a J. STADEN. Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regulation*. 2010, roč. 62, č. 2, s. 101-116. DOI: 10.1007/s10725-010-9481-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10725-010-9481-x>

STRNAD, Miroslav. The aromatic cytokinins. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*. 1997, roč. 101, s. 674-688. ISSN: 0031-9317

SUGAWARA, Hajime, Nanae UEDA, Mikiko KOJIMA, Nobue MAKITA, Tomoyuki YAMAYA a Hitoshi SAKAKIBARA. Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, roč. 105, č. 7, s. 2734-2739. DOI: 10.1073/pnas.0707374105. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707374105>

ŠVÍGLEROVÁ, Jitka. *Inotropie* [online]. Poslední revize 18. 2. 2009, [cit. 11.11.2010]. Dostupné z: <http://wiki.lfp-studium.cz/index.php/Inotropie>

TARKOWSKI, Petr. Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace. Olomouc, 2011. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.

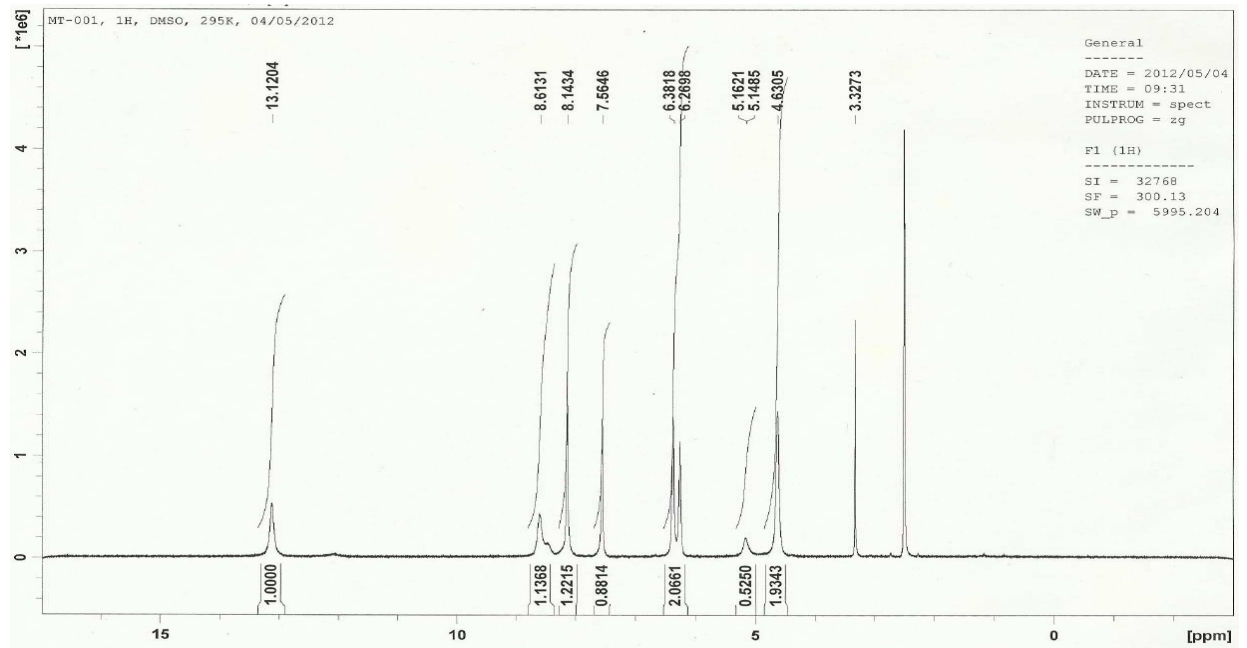
UEGUCHI, Chiharu, Hiromi KOIZUMI, Tomomi SUZUKI a Takeshi MIZUNO. Novel Family of Sensor Histidine Kinase Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 2001, roč. 42, č. 2, s. 231-235. DOI: 10.1093/pcp/pce015. Dostupné z: <http://pcp.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pce015>

INTERNETOVÝ ZDROJ

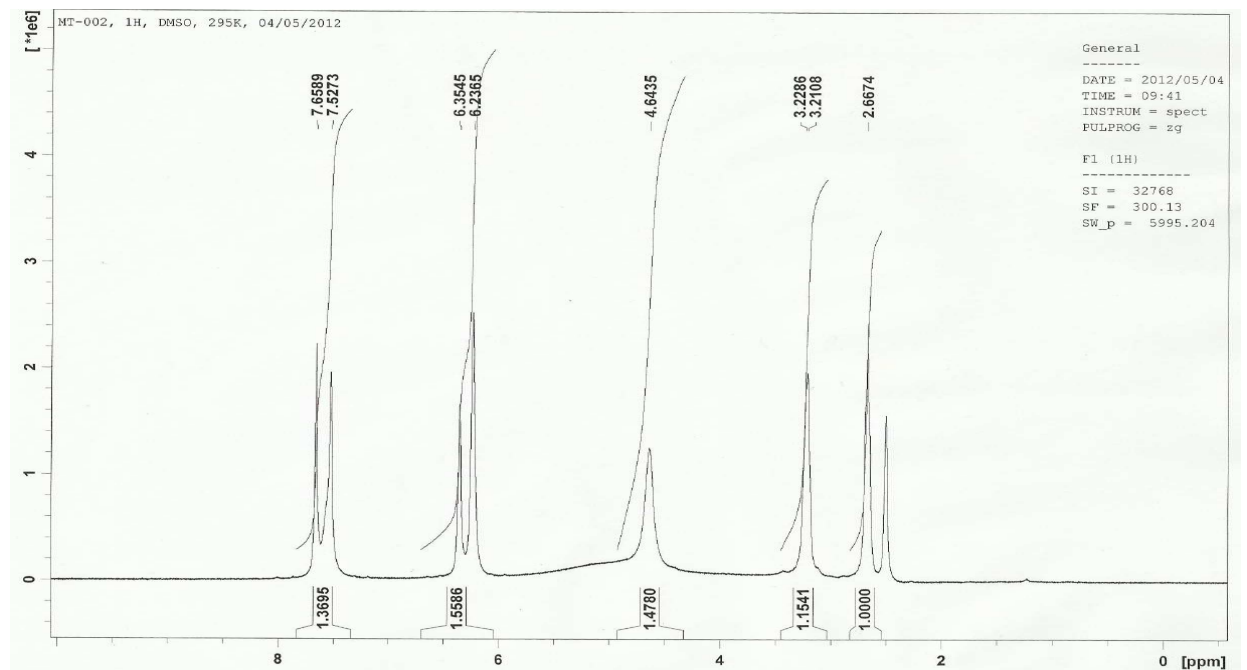
AeScuLab, 2009, systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, Univerzita Palackého v Olomouci, Ligandová specifita cytokininového receptoru (kvantitativní test), online: <http://portal.aesculab.cz/ModuleView.aspx?Id=634332402605448870X>, cit: 24.4.2013

PŘÍLOHY

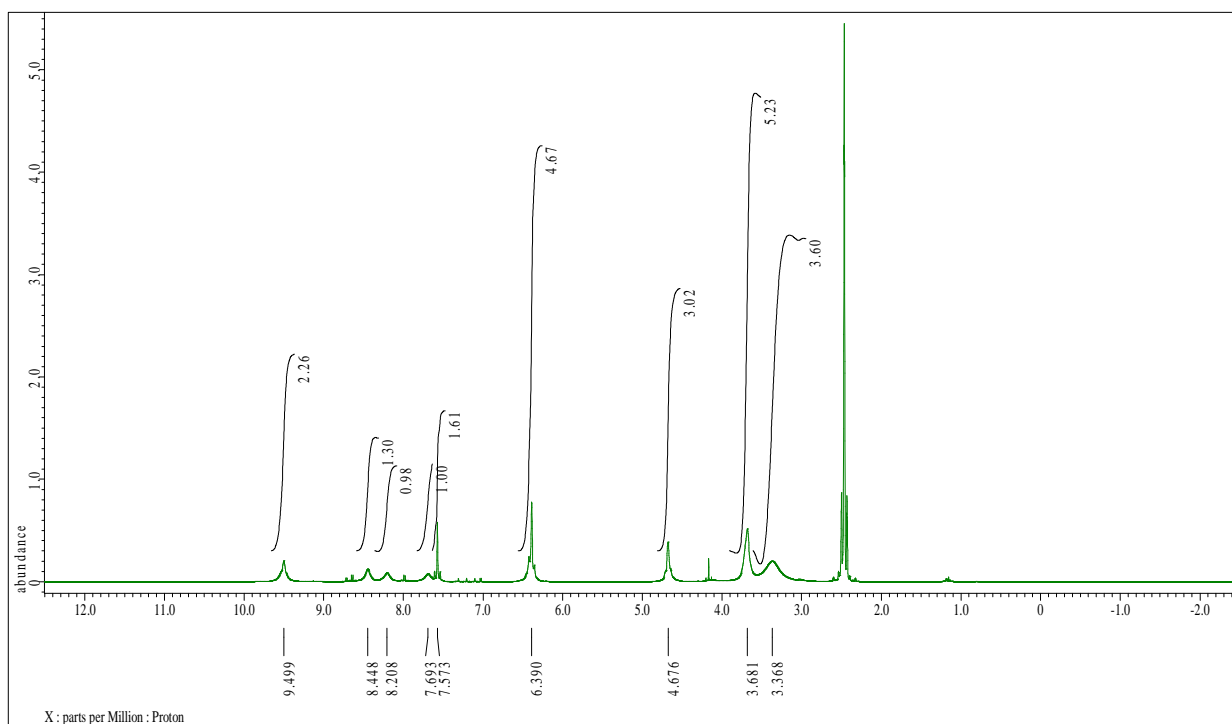
Příloha 1: NMR spektrum potvrzující strukturu látky A.



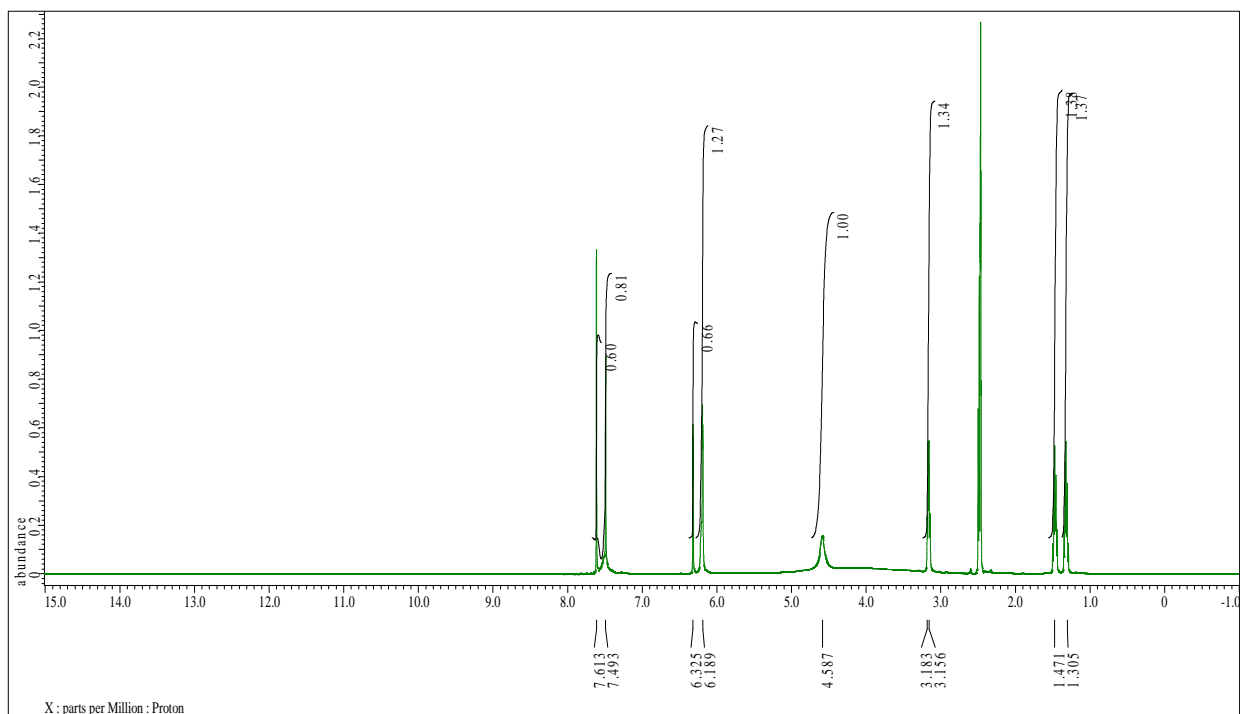
Příloha 2: NMR spektrum potvrzující strukturu látky B.



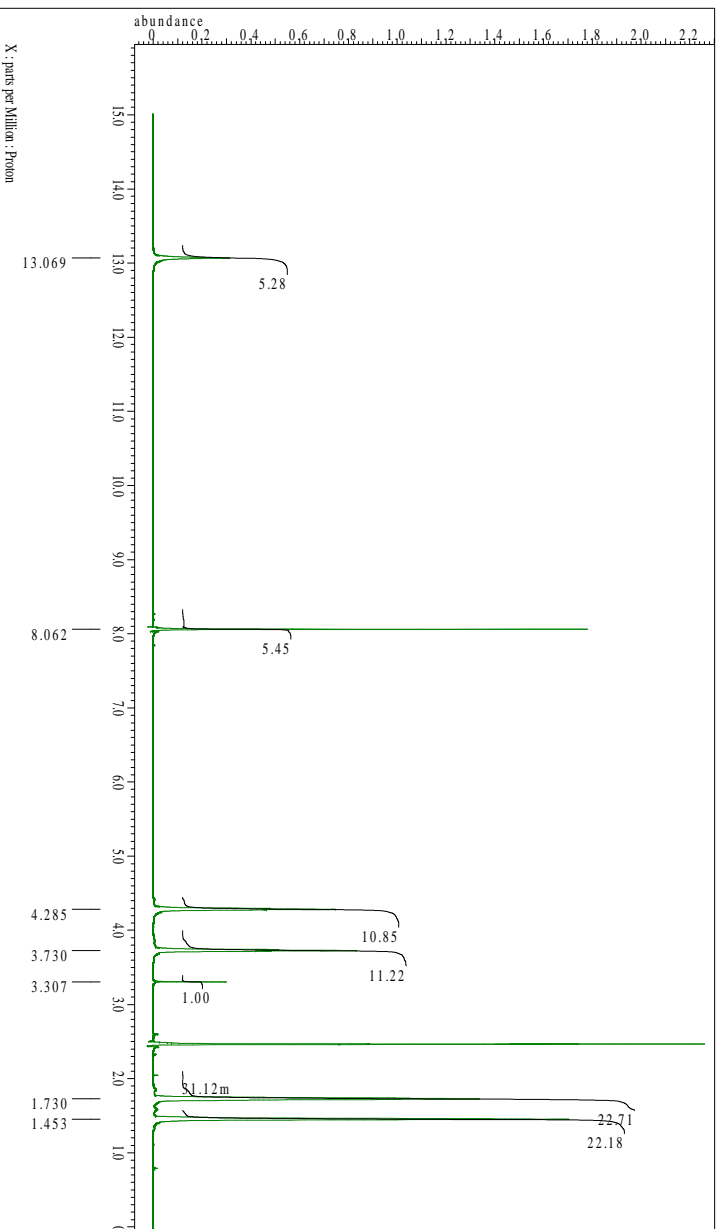
Příloha 3: NMR spektrum potvrzující strukturu látky C.



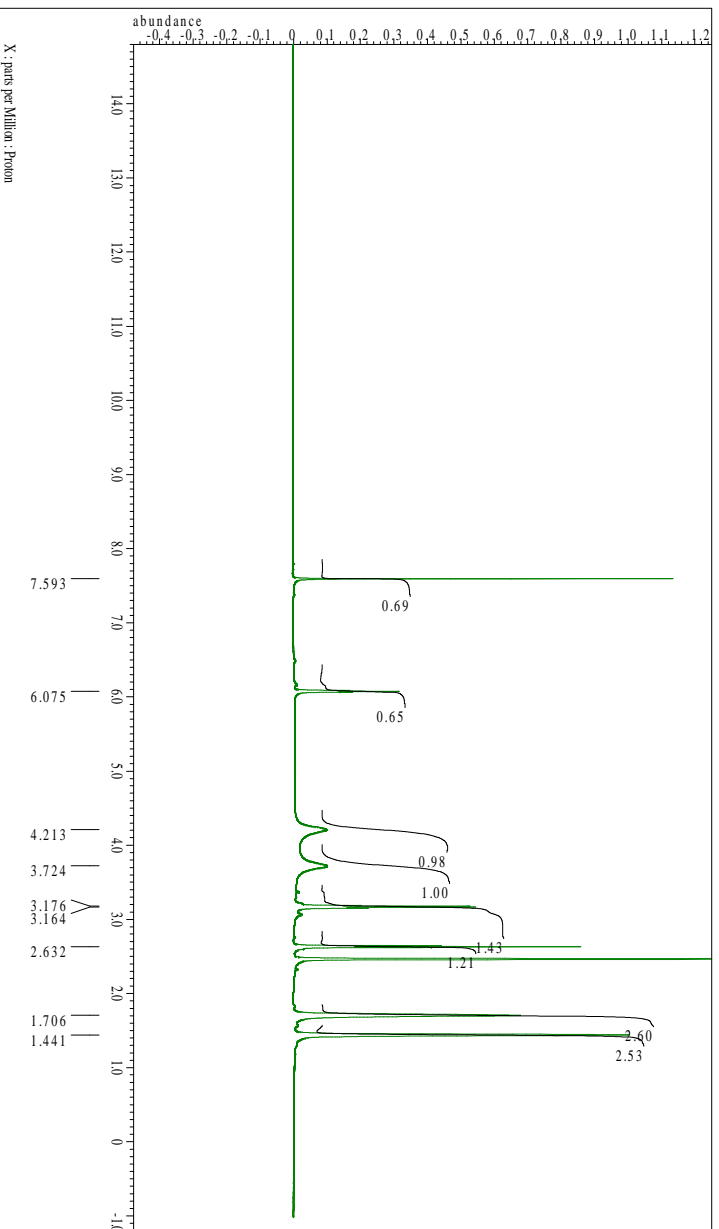
Příloha 4: NMR spektrum potvrzující strukturu látky D.



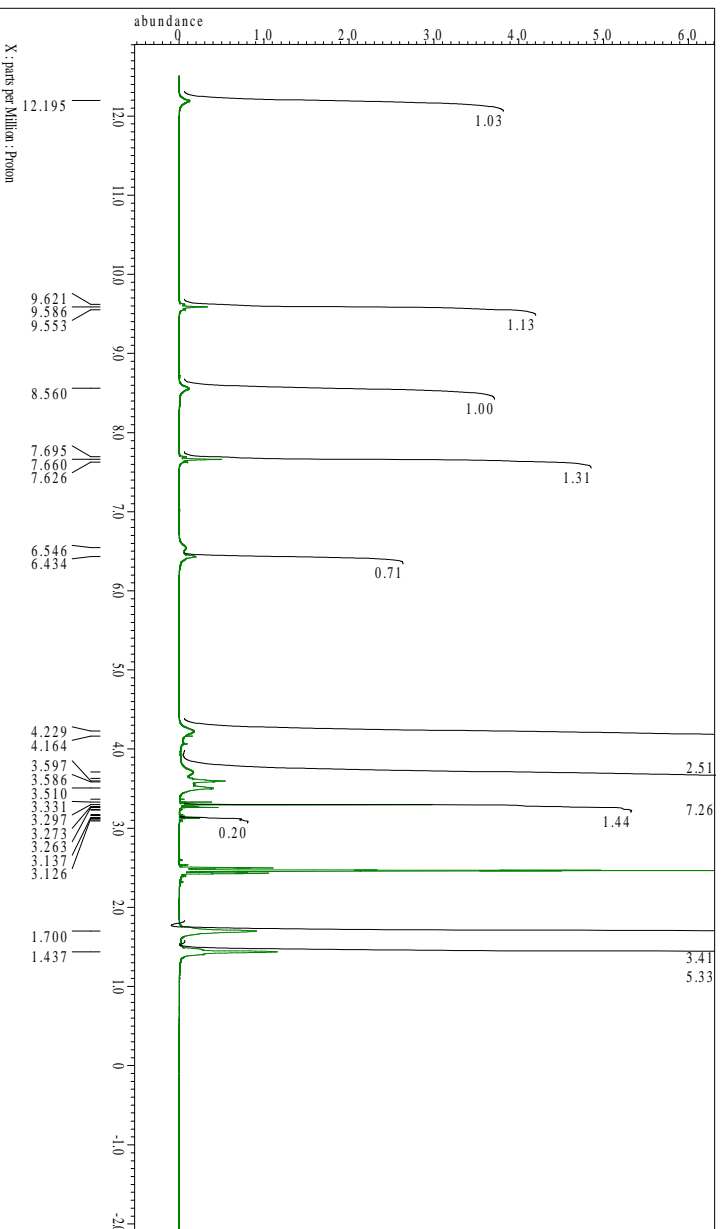
Příloha 5: NMR spektrum potvrzující strukturu látky F.



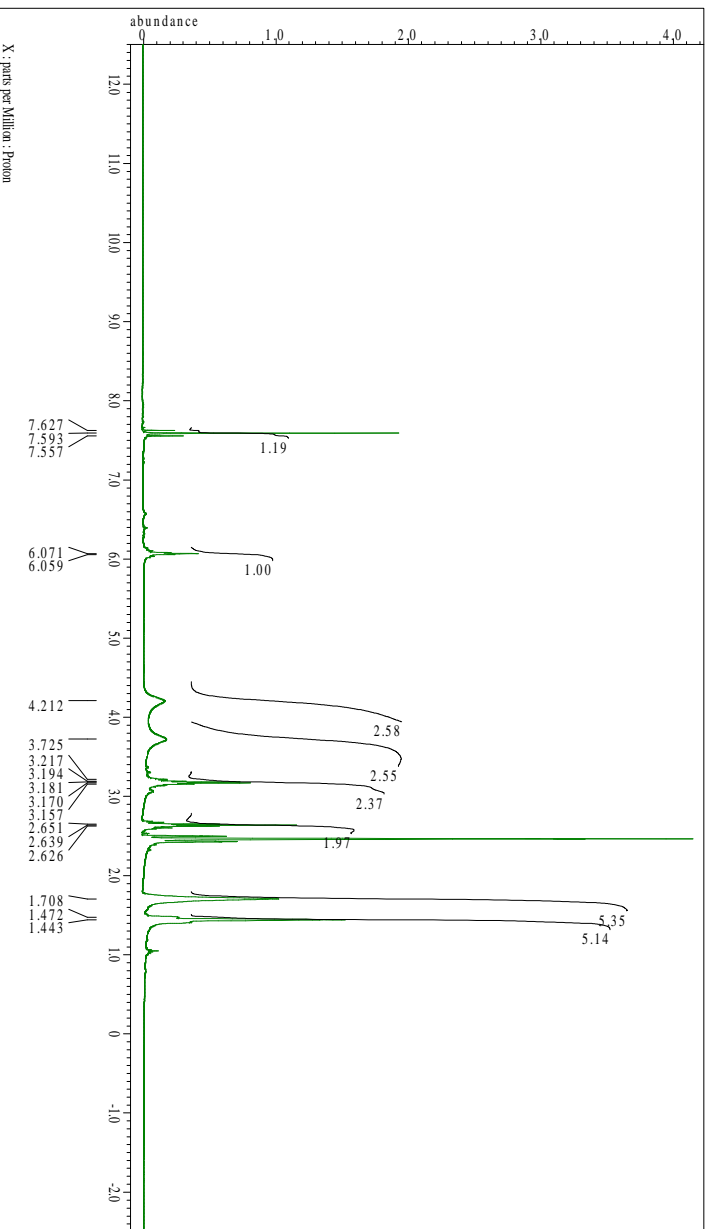
Příloha 6: NMR spektrum potvrzující strukturu látky G.



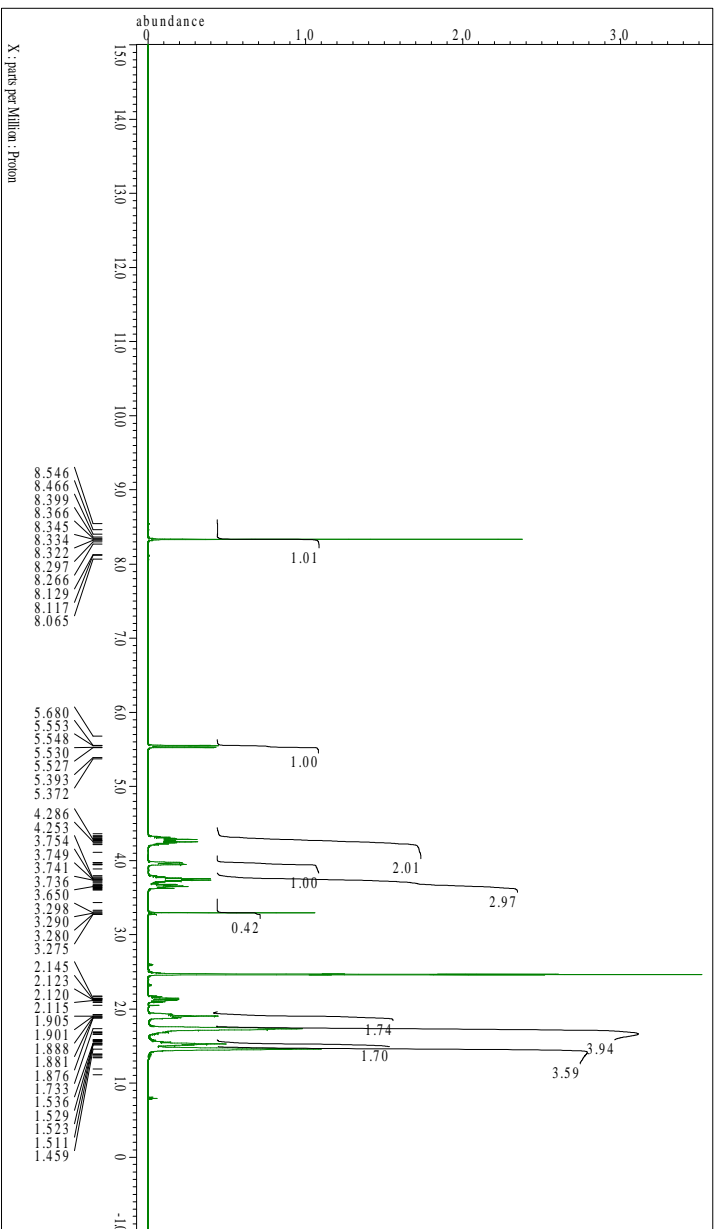
Příloha 7: NMR spektrum potvrzující strukturu látky H.



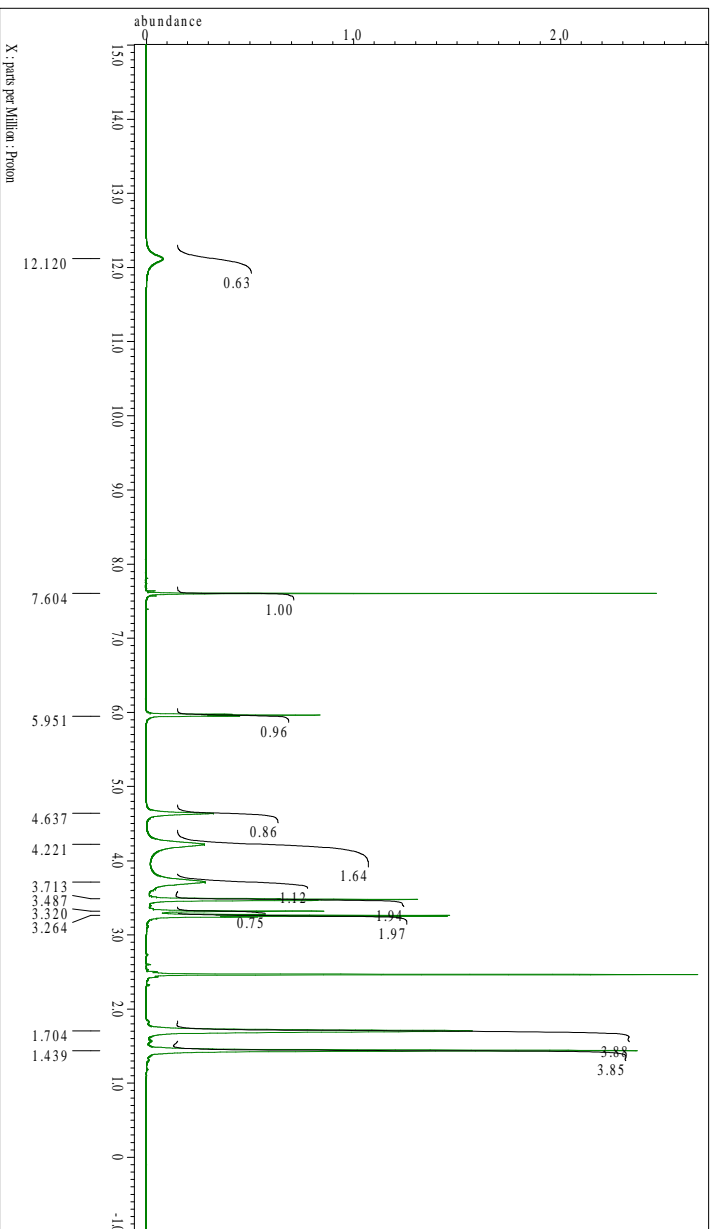
Příloha 8: NMR spektrum látky I.



Příloha 9: NMR spektrum potvrzující strukturu látky J.



Příloha 10: NMR spektrum potvrzující strukturu látky L.



Příloha 11: NMR spektrum potvrzující strukturu látky M.

