

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Nové N<sup>6</sup> substituované purinové deriváty: syntéza a biologická aktivita na rostlinných a živočišných modelech**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Šárka Slamencová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.</b>
Rok:	2020

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

V Olomouci dne 9. 6. 2020

.....

V prvé řadě děkuji Mgr. Karlu Doležalovi, Dr., DSc. za odborné vedení diplomové práce, podnětné konzultace a za cenné připomínky. Velké díky patří také Mgr. Magdaléně Bryksové za množství hodnotných rad a nápadů a za asistenci při laboratorní syntéze. Poděkování náleží i kolektivu Laboratoře růstových regulátorů a Oddělení chemické biologie a genetiky CRH, zejména pak Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D., Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D., Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D., Ing. Janě Kočířové, Mgr. Haně Omámkové, Jarmile Balonové a dalším. Taktéž děkuji celému kolektivu pracoviště ve Vídni (Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien) vedenému prof. Wolfgangem Mikulitsem za možnost provádět zde svůj výzkum a samozřejmě prof. Ing. Miroslavu Strnadovi, CSc., DSc. za zprostředkování této přínosné stáže.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Šárka Slamencová
Název práce	Nové N <sup>6</sup> substituované purinové deriváty: syntéza a biologická aktivita na rostlinných a živočišných modelech
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie a genetiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Cytokininy jsou důležitá skupina rostlinných hormonů a jsou zastoupeny ve formě různých metabolitů, například jako cytokininové ribosidy (N<sup>6</sup> substituované deriváty adenosinu). Biologická aktivita těchto cytokininových ribosidů se však může značně lišit v závislosti na jejich struktuře.

V této práci bylo nasyntetizováno šest nových N<sup>6</sup> substituovaných purinových derivátů s drobnými modifikacemi v jejich struktuře. Deriváty byly charakterizovány souborem fyzikálně-chemických metod (HPLC/MS, NMR,...) a následně byla testována jejich biologická aktivita, a to zejména cytotoxicita na nádorových buněčných liniích, protektivní a anthelmintické účinky na *Caenorhabditis elegans* a také jejich cytokininová aktivita na rostlinných modelech.

U žádné z nově připravených sloučenin nebyla zjištěna cytotoxicita vůči nádorovým liniím a taktéž nebyl prokázán jakýkoli výrazný efekt na jedince *Caenorhabditis elegans*. U některých derivátů však bylo pozorováno částečné zachování cytokininové aktivity.

Klíčová slova	cytokininové ribosidy, cytotoxicita, biologická aktivita, protinádorový účinek
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Šárka Slamencová
Title	Novel N <sup>6</sup> substituted purine derivatives: synthesis and biological activity on plant and animal models
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.
The year of presentation	2020

### Abstract

Cytokinins are an important group of plant hormones and they exist in the form of different metabolites, such as ribosides (N<sup>6</sup> substituted adenosine derivatives). However, the biological activity of these cytokinin ribosides can differ depending on their structure.

In this thesis, six novel N<sup>6</sup> substituted purine derivatives were synthesized with small modifications in their structure. Prepared derivatives were characterised by a set of physico-chemical methods (HPLC/MS, NMR,...) and subsequently their biological activity was tested, specifically cytotoxicity on cancer cell lines, protective and anthelmintic effect on *Caenorhabditis elegans* and also their cytokinin activity.

None of the newly prepared compounds was found to be cytotoxic for the cancer cell lines and also none significant effect on *Caenorhabditis elegans* was observed. However, partial preservation of the cytokinin activity was observed for some derivatives.

Keywords	Cytokinin ribosides, cytotoxicity, biological activity, antitumor effect
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
2.1	Rozdělení cytokininů.....	12
2.1.1	Isoprenoidní cytokininy.....	12
2.1.1.1	Isopentenyladenin.....	12
2.1.1.2	Zeatin.....	12
2.1.2	Aromatické cytokininy.....	12
2.1.2.1	Kinetin.....	13
2.1.2.2	Benzyladenin.....	13
2.1.2.3	Topoliny.....	13
2.1.3	Deriváty močoviny.....	14
2.2	Vlastnosti cytokininů.....	15
2.2.1	Biologická funkce cytokininů.....	15
2.2.2	Výskyt.....	15
2.2.3	Biosyntéza a aktivace cytokininů.....	16
2.2.4	Metabolismus.....	18
2.2.5	Degradace.....	20
2.2.6	Signalizace.....	20
2.3	Biologická aktivita cytokininových ribosidů na rostliny.....	23
2.3.1	Cytokininová aktivita.....	23
2.3.2	Cytotoxický efekt.....	23
2.4	Biologická aktivita cytokininových ribosidů na živočišné buňky.....	25
2.4.1	Apoptóza (u nádorových buněk).....	25
2.4.2	Protinádorová funkce CKR.....	26
2.4.2.1	Výzkum mechanismu působení CKR na leukemickou buněčnou linii HL-60 27	
2.4.2.2	Výzkum mechanismu působení CKR na buněčných liniích pevných nádorů 28	
2.4.2.3	Výzkum vlivu struktury na protinádorovu aktivitu CKR.....	28
2.4.3	Cytoprotektivní funkce.....	31
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
3.1	Materiál.....	32
3.1.1	Chemikálie.....	32
3.1.2	Média a roztoky.....	33
3.1.3	Biologický materiál.....	35
3.1.3.1	Buněčné linie.....	35
3.1.3.2	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	35
3.1.3.3	Rostlinný materiál.....	35
3.1.4	Přístroje.....	36
3.2	Metody.....	37
3.2.1	Syntéza látek.....	37
3.2.1.1	Látka (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-2-(6-((2-hydroxy-3-methoxyfenetyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (Š <i>SI0</i> ).....	37
3.2.1.2	Látka (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-2-(hydroxymetyl)-5-(6-((2-hydroxyfenethyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diol (Š <i>SI1</i> ).....	38
3.2.1.3	Látka (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-2-(6-((2,3-diethoxybenzyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (Š <i>SI3</i> ).....	39
3.2.1.4	Látka (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-2-(6-((2-hydroxy-3-isopropoxybenzyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (Š <i>SI4</i> ).....	40
3.2.1.5	Látka (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-4-fluoro-5-(6-((2-hydroxybenzyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol (Š <i>SI6</i> ).....	41
3.2.1.6	Látka (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-4-fluoro-5-(6-((2-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol (Š <i>SI7</i> ).....	42

3. 2. 1. 7	Další testované látky .....	42
3. 2. 2	Analytické metody .....	43
3. 2. 3	Testování cytotoxicity na nádorových buněčných liniích .....	43
3. 2. 3. 1	Příprava buněk .....	43
3. 2. 3. 2	Testování cytotoxicity .....	43
3. 2. 4	Anthelmintická aktivita .....	44
3. 2. 4. 1	Věková synchronizace červů .....	44
3. 2. 4. 2	Hodnocení anthelmintické aktivity .....	44
3. 2. 5	Protektivní účinky na <i>C. elegans</i> vůči oxidativnímu stresu .....	45
3. 2. 6	Cytokininové biotesty .....	46
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>47</b>
4. 1	Analýza připravených látek .....	47
4. 1. 1	ŠS10 .....	47
4. 1. 2	ŠS11 .....	47
4. 1. 3	ŠS13 .....	47
4. 1. 4	ŠS14 .....	48
4. 1. 5	ŠS16 .....	48
4. 1. 6	ŠS17 .....	48
4. 2	Body tání .....	49
4. 3	Cytotoxicita na nádorových liniích .....	49
4. 4	Anthelmintická aktivita .....	51
4. 5	Protektivní aktivita na <i>C. elegans</i> .....	52
4. 6	Cytokininové biotesty .....	53
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>63</b>

## **CÍLE PRÁCE**

1. Zpracování literární rešerše na téma biologické aktivity cytokininových ribosidů
2. Syntéza šesti nových N<sup>6</sup> substituovaných purinových derivátů
3. Fyzikálně-chemická charakterizace připravených látek
4. Testování cytotoxicity látek na vybrané nádorové buněčné linie
5. Testování anthelmintické aktivity látek na *Caenorhabditis elegans*
6. Zjištění protektivních účinků daných látek vůči oxidativnímu stresu na *C. elegans*
7. Stanovení cytokininové aktivity syntetizovaných látek



# 1 ÚVOD

Cytokininové ribosidy ( $N^6$  substituované deriváty adenosinu, CKR) zahrnují látky aktivní v široké škále různých biologických aplikací. Drobnými strukturálními změnami či záměnou substituentu vázaného na postranním řetězci či samotném benzenovém jádře na pozici  $N^6$  purinového jádra je možné dosáhnout výrazných změn biologické aktivity těchto látek.

V několika případech byla u těchto derivátů zjištěna značná cytotoxicita vůči nádorovým buněčným liniím, jedná se zejména o látky 2-hydroxybenzylaminopurin ribosid (*orto*-topolin ribosid) a 2-hydroxy-3-metoxybenzylaminopurin ribosid. Druhá zmiňovaná látka ovšem působí doposud neznámým mechanismem, který vyžaduje další zkoumání, což je také důvodem pro přípravu jejich dalších derivátů (Voller *et al.*, 2010, 2017). Případné objevení látky specificky cytotoxické vůči vybrané nádorové linii by mohlo vést k posunu v léčbě nádorových onemocnění.

Naproti tomu existují i deriváty s odlišnými vlastnostmi, a to protektivními. Například u metabolitu kinetinu – kinetin ribosid-5'-monofosfátu byly prokázány neuroprotektivní vlastnosti (Hertz *et al.*, 2013). U některých derivátů CKR (např. u  $N^6$ -benzylaminopurin ribosidu (BAPR)) je možné, že při aplikaci na buňky fungují jako hormetiny – tedy látky ve vyšších koncentracích toxické, avšak při nižších koncentracích mající protektivní účinky (vůči oxidativnímu stresu) (Kadlecová *et al.*, 2018).

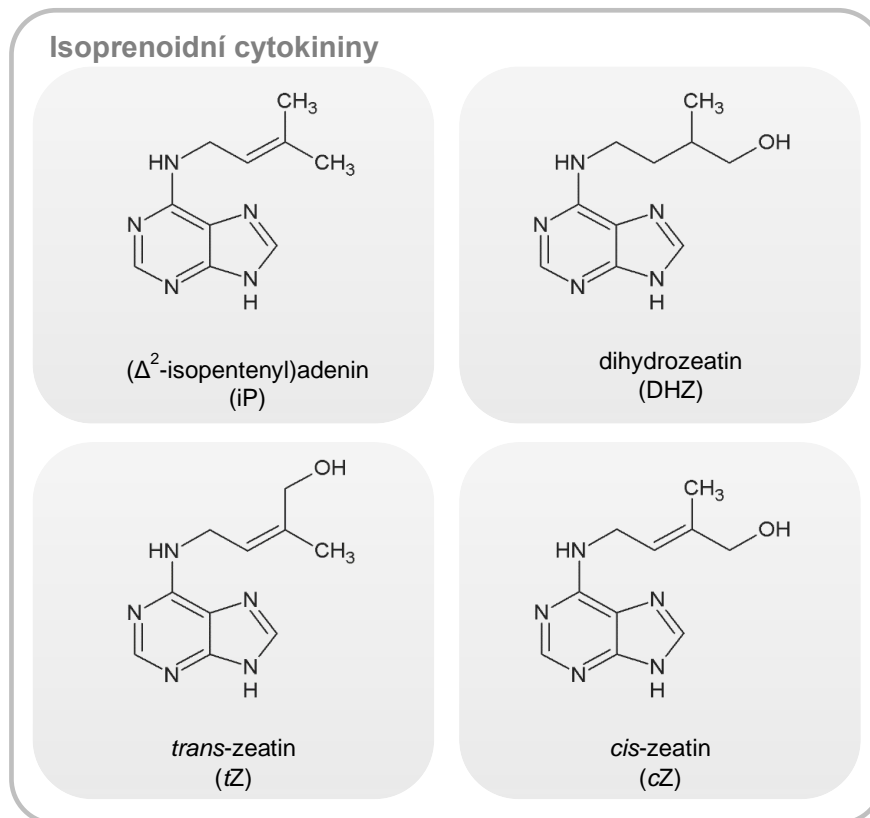
Dále bylo také zjištěno, že případný terapeutický potenciál CKR by mohlo zvýšit nahrazení OH skupiny v poloze 2' ribosy atomem fluoru, kdy byly v některých případech prokázány antivirální či protinádorové účinky (Meng a Qing, 2006).

Některé aromatické cytokininové ribosidy mohou dosahovat značných aktivit i v cytokininových biotestech, zejména pak v senescenčním testu, avšak obvykle nepřesahují aktivitu svých volných bází (Holub *et al.*, 1998; Doležal *et al.*, 2007).

Souhrnem výše uvedených poznatků byly navrženy struktury sloučenin, které byly následně v rámci předložené práce nasyntetizovány. Úspěšně bylo připraveno šest nových derivátů CKR, které byly dále charakterizovány pomocí fyzikálně-chemických metod a jejich biologická aktivita byla testována zejména se zaměřením na toxicitu, protektivitu a cytokininové vlastnosti.

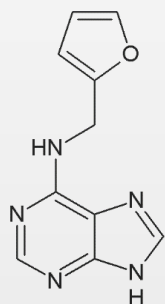
## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Cytokininy jsou látky řadící se mezi přirozeně se vyskytující rostlinné hormony, jež jsou jedny z klíčových regulátorů buněčného cyklu a zároveň podporují růst a diferenciaci buněk. Tyto látky jsou deriváty adeninu mající v pozici N<sup>6</sup> na purinovém jádře vázaný isoprenoidní či aromatický řetězec (Feng *et al.*, 2017). Jako první látka podporující cytokinezi (tedy buněčné dělení) byl v 50. letech minulého století při výzkumu rostlinných tkáňových hormonů objeven kinetin (6-furfurylaminopurin). Ačkoli jsou cytokininy řazeny mezi rostlinné hormony, kinetin byl Millerem *et al.* (1955) prvně izolován z autoklávované DNA sledího spermatu. Jako první přirozeně se vyskytující cytokinin, byl v kukuřici (*Zea mays*) objeven zeatin (6-(hydroxy-3-methylbut-trans-2-enylamino)purin) (Obr. 1) (Miller, 1961). V současné době jsou nejběžněji studovanými cytokininy N<sup>6</sup>-isopentenyladenin (iP) a *trans*-zeatin (*tZ*). Z aromatických cytokininů jsou pak významné deriváty 6-benzyladeninu (N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu, BA, BAP) (Obr. 2) a zejména jeho hydroxy-deriváty – topoliny. Samotný BAP se spolu s *meta*-topolinem (příp. metoxytopoliny) řadí mezi vysoce aktivní látky. Další skupinou látek s cytokininovou aktivitou, ovšem vyskytujících se pouze jako synteticky připravené, jsou látky močovinnového typu (Obr. 3) (Feng *et al.*, 2017).

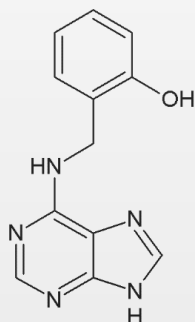


Obr. 1: Struktury vybraných isoprenoidních cytokininů

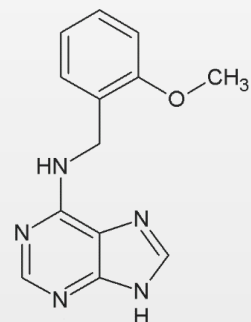
### Aromatické cytokininy



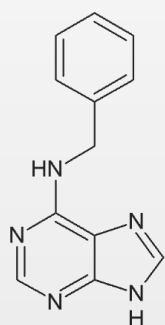
kinetin  
(K)N<sup>6</sup>-



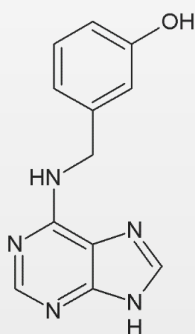
*ortho*-topolin  
(oT)



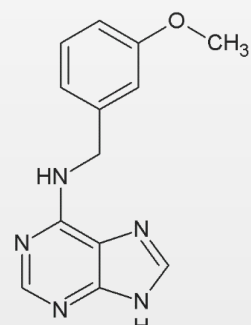
*ortho*-metoxytopolin



benzylaminopurin  
(BAP)



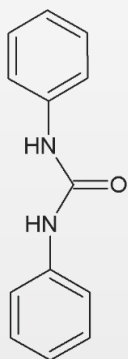
*meta*-topolin  
(mT)



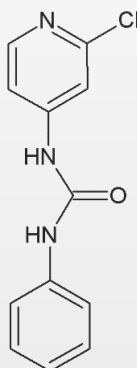
*meta*-metoxytopolin

Obr. 2: Struktury vybraných aromatických cytokininů

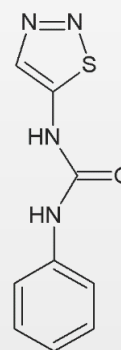
### Cytokininy močovinného typu



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)

Obr. 3: Struktury cytokininů močovinného typu

## 2.1 Rozdělení cytokininů

Podle řetězce vázaného na purinové jádro se cytokininy dělí na isoprenoidní nebo aromatické (Mok a Mok, 2001).

### 2.1.1 Isoprenoidní cytokininy

Isoprenoidní cytokininy mají v N<sup>6</sup> pozici isopentenylový postranní řetězec a zahrnují N<sup>6</sup>-isopentenyladenin (iP) a *cis*-zeatin (*cZ*) a *trans*-zeatin (*tZ*), případně dihydrozeatin (DHZ) s hydrogenovaným postranním řetězcem (Obr. 1) (Feng *et al.*, 2017).

#### 2.1.1.1 Isopentenyladenin

N<sup>6</sup>-isopentenyladenin je spolu s cytokininy zeatinového typu nejčastěji se vyskytujícím cytokininem v rostlinách (Sakakibara, 2006). Isopentenyladenin se také často vyskytuje ve formě ribosidu (iPR). Tato látka pak bývá součástí tRNA mnoha organismů, včetně bakterií, kvasinek, rostlin a zvířat (Hall, 1970).

#### 2.1.1.2 Zeatin

Millerem (1961) byla v mléčném endospermu kukuřičných zrn objevena látka podobající se svými vlastnostmi kinetinu a později byla nazvaná jako zeatin (Letham, 1963). Podle konfigurace hydroxylovaného postranního řetězce se zeatin se vyskytuje ve dvou izomerních formách – *cis*-zeatin a *trans*-zeatin. V případě, že dojde k nasycení dvojné vazby postranního řetězce, vzniká **dihydrozeatin** (Mok a Mok, 2001; Feng *et al.*, 2017).

Na geometrii postranního řetězce silně závisí samotná cytokininová aktivita těchto látek. *Trans*-zeatin je látka několikanásobně aktivnější z hlediska cytokininové aktivity oproti svému *cis*-izomeru, který je ve většině biotestů téměř neaktivní. Nasycení dvojné vazby v dihydrozeatinu ještě více tuto aktivitu snižuje (Schmitz *et al.*, 1972). Avšak v určitých rostlinných druzích (případně v konkrétních orgánech či během určitých fyziologických procesů) může být funkčně důležitý i *cis*-zeatin, hraje například důležitou a specifickou roli v odpovědi rostlin na nedostatek fosforu (Silva-Navas *et al.*, 2019). Stejně tak mají *tZ* i *cZ* pozitivní roli v rostlinné imunitě, ovšem druhý zmiňovaný působí zřejmě poněkud odlišným mechanismem (Großkinsky *et al.*, 2013; Keshishian a Rashotte, 2015).

### 2.1.2 Aromatické cytokininy

Za přirozeně se vyskytující cytokininy byly původně považovány zejména isoprenoidní cytokininy jako isopentenyladenin a zeatin. Aromatické cytokininy byly v rostlinách identifikovány až později. Mezi nejvýznamnější se řadí kinetin, benzyladenin a topoliny (Obr. 2) (Strnad, 1997).

### 2. 1. 2. 1 Kinetin

Jak již bylo zmíněno výše, původně byl kinetin izolován z DNA autoklávovaného sledího spermatu (Miller *et al.*, 1955). Dlouhou dobu byla tato látka považována za přirozeně se nevyskytující v rostlinách, tedy za syntetický cytokinin. První důkaz přirozeného výskytu této látky přinesl Raman a Elumalai (1996), když identifikovali kinetin v extraktu kořenových nodů přesličníku tichomořského (*Casuarina equisetifolia*) infikovaného bakterií *Frankia*. Také Ge *et al.* (2005) dokázali, že kinetin, stejně jako jeho ribosidová forma se vyskytují přirozeně v endospermové tekutině mladého kokosového ořechu (v kokosovém mléce).

Zdá se, že kinetin jak v rostlinných, tak v živočišných buňkách vzniká za specifických podmínek, například v poraněných pletivech či tkáních a často tak bývá spojen s oxidativním poškozením (Kadlecová *et al.*, 2019). Zvýšené množství kinetinu bylo zjištěno také v lidské moči pacientů s rakovinou plic (Barciszewski *et al.*, 2000).

### 2. 1. 2. 2 Benzyladenin

Benzyladenin (benzylaminopurin, BA, BAP) se vyskytuje ve formě ribosidu a dalších derivátů. Jeho ribosidová forma (benzylaminopurin ribosid, BAPR) byla poprvé identifikována v buněčné kultuře anýzu *Pimpinella anisum* L. (Ernst *et al.*, 1983). Samotný BAP je aktivní a lehce získatelná látka, která je v dnešní době hojně využívána v pletivových kulturách při *in vitro* regeneraci rostlin. Mezi jeho významné deriváty se řadí hydroxyderiváty (topoliny) a methoxyderiváty (Strnad *et al.*, 1997; Tarkovská *et al.*, 2003; Taiz a Zeiger, 2010).

### 2. 1. 2. 3 Topoliny

Jedná se o skupinu látek (strukturně hydroxy-deriváty benzyladeninu), jež byly objeveny v listech topolu a odtud tedy pochází název topoliny. Konkrétně se jedná o látku **meta-topolin** (**mT**, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin), který je vysoce aktivní v rostlinných biotestech a o poněkud méně aktivní **orto-topolin** (**oT**, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin)(Strnad *et al.*, 1992, 1997; Strnad, 1997).

Horgan *et al.* (1975) izolovali z listů topolu látku 6-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin (*orto-topolin* ribosid, *oTR*). Poté Strnad *et al.* (1992) dokázali přirozený výskyt i samotné volné báze *orto-topolinu*, následně Strnad *et al.* (1997) prokázali, že i *meta-topolin* se v rostlinných pletivech vyskytuje přirozeně, a kromě samotné volné báze je zde možné najít i jeho deriváty 9-β-D-ribofuranosyl a 9-β-D-glukopyranosyl. Taktéž bylo zjištěno, že aromatické cytokininy jsou jejich

biochemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou poněkud odlišné od isoprenoidních cytokininů.

V závislosti na pozici hydroxylace na benzenovém jádře se můžou výrazně lišit cytokininové vlastnosti topolinů. Zatímco hydroxylace v *meta* pozici výrazně zvyšuje aktivitu v cytokininových biotestech, hydroxylace v *orto* a *para* poloze tuto aktivitu snižuje. *Meta*-topolin je tedy jedním z biologicky nejaktivnějších cytokininů (Kamínek *et al.*, 1987).

### 2. 1. 3 Deriváty močoviny

Jako první ze skupiny látek močovinné povahy vykazujících cytokininovou aktivitu byla objevena difenylmočovina, tato látka byla původně izolována z kokosového mléka (Shantz a Steward, 1955) nedlouho potom, co byl objeven kinetin. Později však ale bylo zjištěno, že se jedná pouze o kontaminaci z analýzy a tyto deriváty se vyskytují pouze v syntetické podobě (Mok a Mok, 2001). Mezi další látky patří kromě již zmíněné **N, N'-difenylmočoviny (DPU)** také **thidiazuron (TDZ)** či **N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)močovina (CPPU)** (Obr. 3), přičemž doposud stále platí, že u těchto látek nebyl prokázán jejich přirozený výskyt v rostlinách (Mok a Mok, 2001; Feng *et al.*, 2017).

## 2.2 Vlastnosti cytokininů

### 2.2.1 Biologická funkce cytokininů

Cytokininy podporují dělení buněk ve stonkovém apikálním meristému, naproti tomu v kořenech dochází vlivem cytokininů k opačnému efektu, velikost buněk a míra buněčného dělení je zde jejich aktivitou snižována (Taiz a Zeiger, 2010).

Tvorba pupenů je regulována větším množstvím rostlinných hormonů včetně cytokininů a auxinů. Zatímco auxiny potlačují růst postranních pupenů, cytokininy tvorbu postranních pupenů podporují (Taiz a Zeiger, 2010).

V pletivových kulturách ovlivňují cytokininy spolu s auxiny morfogenezi. Vysoký poměr cytokininů:auxinů v médiu indukuje růst nadzemních částí, při vyšším poměru auxinů:cytokininů dochází ke stimulaci růstu kořenů. Při vyrovnaně vysokém množství obou složek vzniká kalus (Davies, 2010; Taiz a Zeiger, 2010).

Cytokininy dále oddalují listovou senescenci. Senescence se vyznačuje ztrátou chlorofylu, RNA, proteinů a lipidů. Cytokininy nejsou schopny tento jev zcela eliminovat, ale jsou schopny senescenci výrazně oddálit (Taiz a Zeiger, 2010).

V některých rostlinách podporují cytokininy otvírání průduchů, vývoj chloroplastů či zvětšování velikosti listů (Davies, 2010).

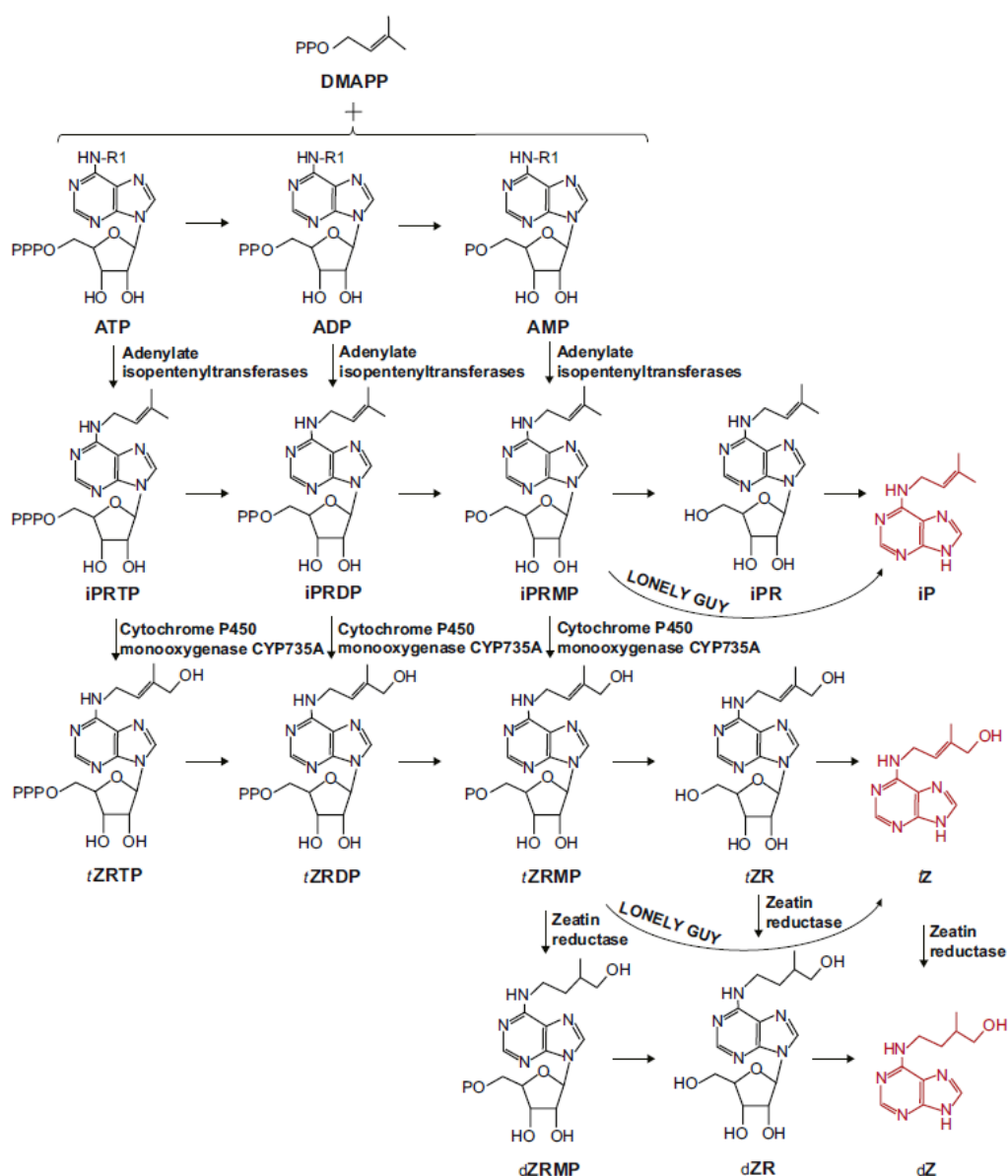
### 2.2.2 Výskyt

Cytokininy jsou rostlinné hormony, místem jejich výskytu jsou tedy zejména právě rostliny. Přítomnost těchto látek byla ale potvrzena i u jiných živých organismů, jako například u hub, bakterií, hmyzu či dokonce u některých savců. U psa domácího (*Canis familiaris*) byly objeveny cytokininy *cis*-zeatinového typu a iP typu. Dokonce bylo potvrzeno, že savčí buňky dokáží syntetizovat určité typy cytokininů (Seegobin *et al.*, 2018). Cytokininy byly identifikovány i v lidské moči (Barciszewski *et al.*, 2000).

V buňce se cytokininy mohou nacházet volně v cytoplazmě, a to jak ve formě volných bází, tak i ribosidů či ribotidů. Některé jsou i vázané v určitých transferových RNA (tRNA), v tomto případě ale pouze ve formě ribotidů. Tyto na tRNA vázané ribosylované cytokininy bývají součástí širokého spektra organismů – rostlin, bakterií, kvasinek i zvířat (Srivastava, 2002; Bajguz a Piotrowska, 2009; Aremu *et al.*, 2012).

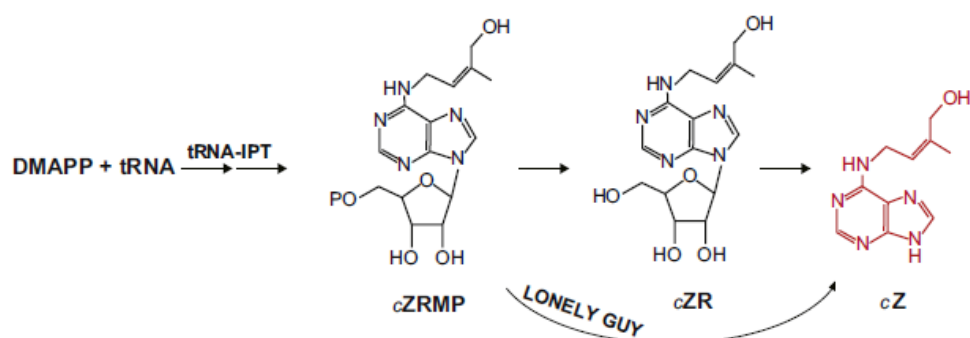
## 2. 2. 3 Biosyntéza a aktivace cytokininů

Isoprenoidní cytokinininy mohou být syntetizovány dvěma různými cestami. Nejčastěji je využívána *de novo* syntéza, kdy je z dimethylalyl difosfátu (DMAPP) přemístěn prenylový řetězec na N<sup>6</sup> pozici ATP, ADP nebo AMP a vzniká tak iPR-5'-trifosfát, difosfát nebo monofosfát (Obr. 4). Tato reakce je katalyzována enzymem adenylát isopentenyltransferasou (IPT). V genomu *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje 9 *IPT* genů (kodujících enzymy: AtIPT1 EC 2.5.1.27 až AtIPT9 EC 2.5.1.75, z nichž dva ale kódují tRNA-IPT – viz níže). Vznik *tZRMP* (*tZRDP*, *tZRTP*) je v dalším kroku katalyzován cytochromem P450 monooxygenázou CYP735A. Tímto způsobem vznikají cytokinininy iP- a tZ-typu (Feng *et al.*, 2017).



Obr. 4: Biosyntetické dráhy cytokininů, převzato z Feng *et al.*, 2017





Obr. 5: Biosyntetické dráhy cytokininů s využitím tRNA, převzato z Feng *et al.*, 2017

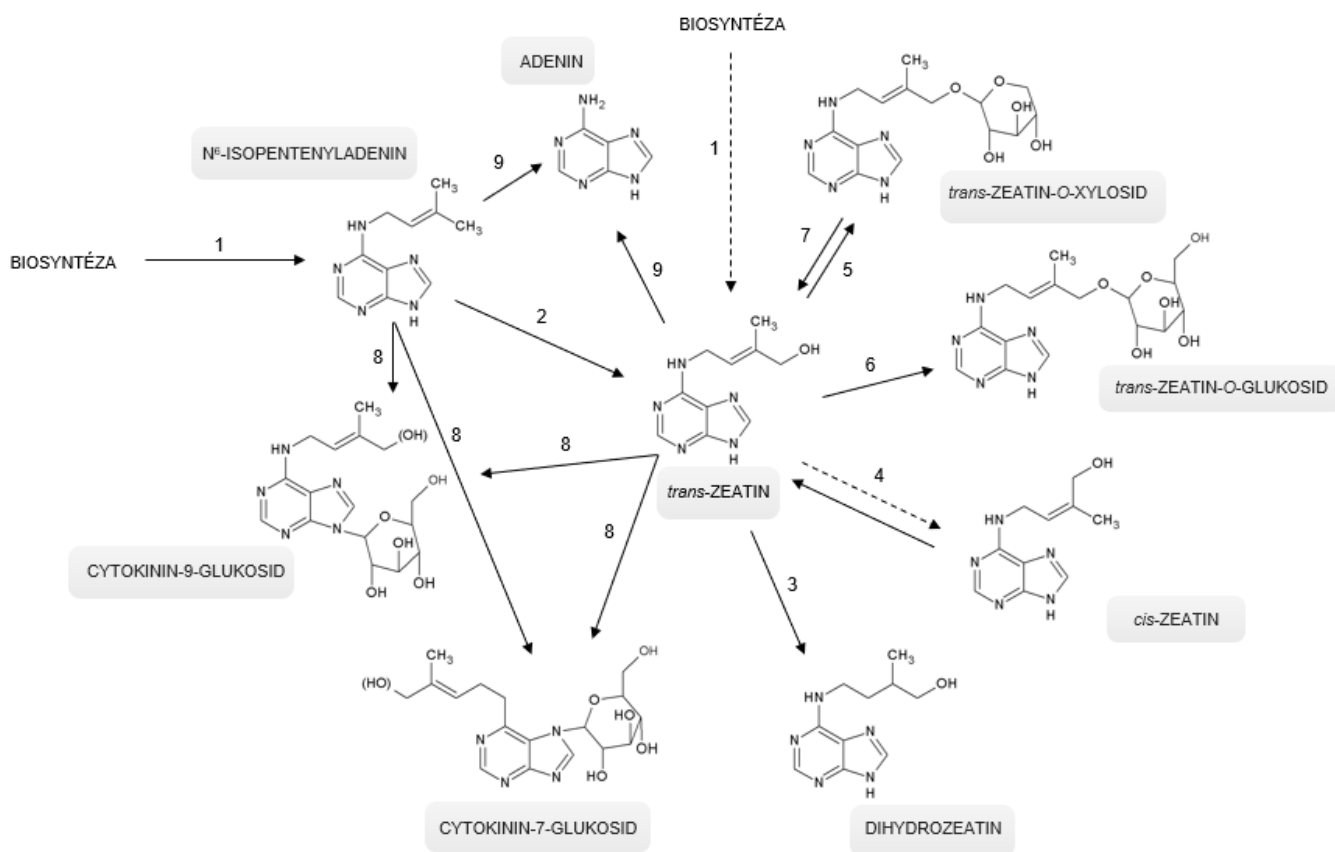
Další metodou biosyntézy je využití recyklovaných tRNA (Obr. 5). V prvním kroku přenáší tRNA-IPT isopentenylovou jednotku z DMAPP a připojuje ji na N<sup>6</sup> pozici daného nukleotidu na 3'-konci antikodonu tRNA. Aktivací tRNA-IPT vznikají cytokininy cZ- a iP-typu. V *Arabidopsis* můžeme najít dva geny kódující tRNA-IPT, a to *AtIPT2* a *AtIPT9* (Feng *et al.*, 2017).

Biosyntéza aromatických cytokininů stále není přesně objasněna. Enzymy potřebné pro biosyntézu a vzájemné přeměny aromatických cytokininů ještě nebyly identifikovány, nicméně předpokládá se, že alespoň část biosyntetické dráhy bude podobná jako v případě isoprenoidních cytokininů (Davies, 2010).

Následná aktivace cytokininů spočívá v přeměně ribotidové formy na aktivnější volnou bázi. Pro tuto akci bývají využity opět dvě různé dráhy. První z nich tkví ve dvoukrokovém odštěpení nejprve fosfátu a poté i ribosy. Další možností je využití jednokrokové aktivace za účasti cytokinin-specifické fosforibohydrolasy nazývané též jako LONELY GUY (LOG) (Obr. 4,5) (Kurakawa *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2017). Nukleotidy a nukleotid di- a trifosfáty mohou být defosforylovány různými fosfatasami, jako například 5'-nukleotidasou (EC 3.1.3.5) (Chen a Kristopeit, 1981) nebo alkalickou (EC 3.1.3.1) či kyselou fosfatasou (EC 3.1.3.2). Samotná deribosylace cytokininových nukleosidů pak probíhá za přítomnosti enzymu adenosin nukleosidasy (EC 3.2.2.7). Reverzní fosforylace nukleosidů na nukleotidy je katalyzována adenosin kinasou (EC 2.7.1.20) (Galuszka *et al.*, 2008). Přímá přeměna cytokininových volných bází na nukleotidy je možná díky adenin fosforibosyltransferase (EC 2.4.2.7) (Schnorr *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2002).

## 2. 2. 4 Metabolismus

Cytokininy se vyskytují ve formě volných bází, nukleotidů, nukleosidů a glykosidů (N-glykosidy a O-glykosidy). Cytokininy tedy tvoří konjugáty s cukry a aminokyselinami. Tyto konjugáty pak fungují zejména jako zásobní, transportní nebo biologicky neaktivní formy cytokininů a jsou zodpovědné za plasticitu rostlin. Příkladem mohou být látky *iPR*, *cZR*, *tZR* a další. Neaktivnějšími formami jsou obvykle jejich volné báze a cukerné konjugáty (glykosidy) slouží jako neaktivní a zásobní forma cytokininů (Davies, 2010; Feng *et al.*, 2017). Vyšší koncentrace nukleosidů a nukleotidů se obvykle vyskytuje v semenáčcích a vyvíjejících se orgánech, a to zřejmě kvůli zvýšené potřebě *de novo* syntézy cytokininů. Následná deaktivace volných bází konverzí zpět na nukleotidy *in planta* je stále sporná (Galuszka *et al.*, 2008).



Obr. 6: Základní metabolické dráhy isoprenoidních cytokininů. Enzymy účastníci se reakcí: 1 – adenylát isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27), 2 – cytochrom P-450 monooxygenasa (EC 1.14.13), 3- zeatin reduktasa (EC 1.3.1.69), 4 – zeatin isomerasa, 5 – zeatin-O-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.203 a EC 2.4.1.215), 6 – zeatin-O-xylotransferasa (EC 2.4.1.40), 7 –  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21), 8 – cytokinin-N-glucosyltransferasa (EC 2.4.1.118), 9 – cytokinin dehydrogenasa (EC 1.5.99.12), čárkovaně jsou značené predikované dráhy. Převzato a upraveno z Galuszka *et al.*, 2008

Z aktivní volné báze mohou za pomoci různých enzymů vzniknout různé metabolity. Jednou z možností je vznik glykosidů (Obr. 6). Tvorba cytokininových glukosidů na pozicích 7- a 9- je katalyzována enzymem **glukosyltransferasou** (EC 2.4.1.118). Tento enzym rozpoznává jako substráty deriváty adeninu, přičemž nejčastější je přeměna derivátů s N<sup>6</sup>-postranním řetězcem, který obsahuje alespoň tři uhlíky (Entsch *et al.*, 1979).

Ke specifické **N-glukosylaci** může docházet v pozicích 3-, 7- a 9- adeninu a tento proces způsobuje inaktivaci cytokininů, která je v případě N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup>-glukosylace nevratná. V *Arabidopsis* byly identifikovány dva enzymy katalyzující vznik N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup>-glukosidů, jedná se o **N-glukosyltransferasy** (UGT76C1 a UGT76C2) (Hou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011, 2013). Bylo také zjištěno, že při vystavení rostlin ředkve seté (*Raphanus sativus*) vysokým koncentracím exogenně aplikovaných cytokininů dochází ke vzniku zejména N<sup>7</sup>-glukosidů (Cowley *et al.*, 1978; Letham *et al.*, 1978). Dále bylo zjištěno, že N<sup>7</sup>-glukosidy *trans*-zeatinu a N<sup>6</sup>-isopentenyladeninu jsou odolné vůči degradaci **cytokinin oxidasou/dehydrogenasou** (CKX, EC 1.5.99.12). Tyto N<sup>7</sup>-glukosidy se pak dále hromadí v rostlinných pletivech, jelikož jsou resistantní vůči další metabolické aktivitě. Nevratná N-glukosylace může také snižovat dostupnost aktivních cytokininů v rostlinných pletivech a ovlivňovat tak reakce rostlin, proto byly hledány látky inhibující tuto metabolickou dráhu. Bylo zjištěno, že syntetická analoga benzyladeninu – látky jako olomoucín (6-benzylamino-2-[2-hydroxyetyl-amino]-9-methylpurin) nebo roskovitin (6-benzylamino-2-[1-etyl-2-hydroxyetyl-amino]-9-isopropylpurin) – jsou schopny zabránit N-glukosylaci tím, že dochází ke kompetitivní inhibici substrátu *trans*-zeatinu (Parker *et al.*, 1986; Blagoeva *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2004).

Na cytokininovém postranním řetězci může docházet k dalšímu typu modifikace, a to k **O-glykosylaci**. Podle specifity k cukernému řetězci rozlišujeme dva typy O-glykosyltransferas – enzymů katalyzujících tyto reakce: **zeatin-O-xylosyltransferasy** (EC 2.4.2.40) a **zeatin-O-glukosyltransferasy** (EC 2.4.1.203 a EC 2.4.1.215) (Obr. 6) rozlišující mezi *cis*- a *trans*-zeatinem (Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003). Bylo také zjištěno, že enzymy z kukuřice jsou schopné účinně glykosylovat i topoliny (Mok *et al.*, 2005). Isoenzym specifický pro *cis*-zeatin glukosyluje *orto*-topolin a isoenzym specifický pro *trans*-zeatin naopak *meta*-topolin (Hou *et al.*, 2004). O-glukosidy zeatinu fungující jako zásobní formy mohou být hydrolyzovány zpět na aktivní volnou bázi díky **β-glukosidase** (EC 3.2.1.21) (Obr 6). Nejvyšší aktivita β-glukosidasy byla pozorována v elongačních zónách, kde je potřeba velkého množství aktivních cytokininů

(Kristoffersen *et al.*, 2000). Současně O-glukosidace chrání cytokininy před degradací vlivem cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (Brzobohatý *et al.*, 1993).

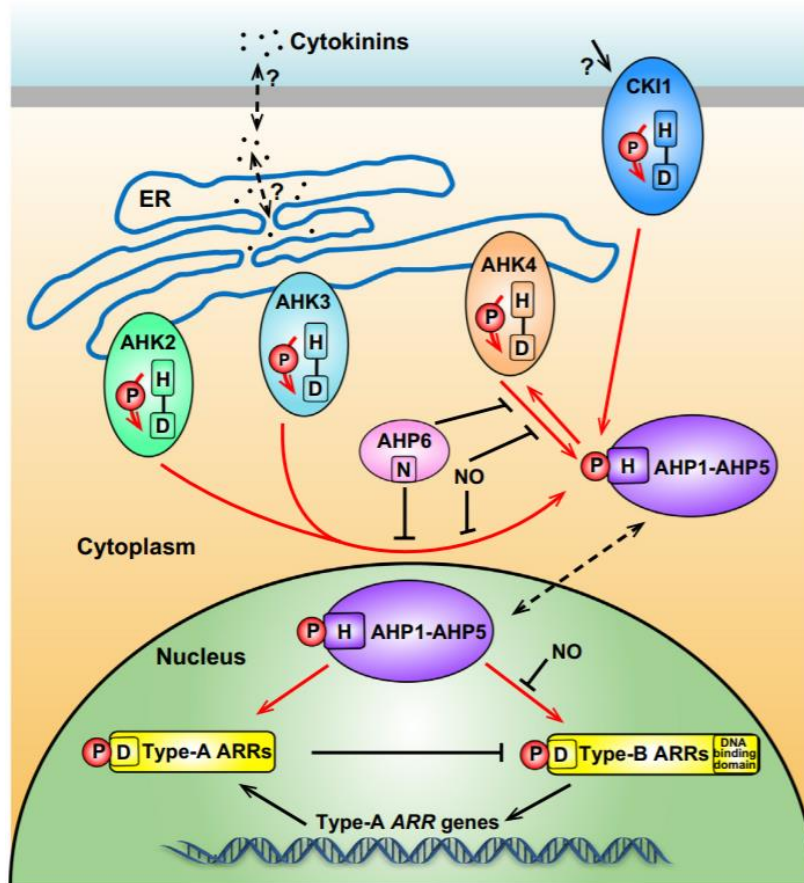
Dalšími modifikacemi, které byly prokázány, že probíhají přirozeně *in vivo* v rostlinách jsou O-acetylace zeatinu, redukce dvojné vazby zeatinu a následný vznik dihydrozeatinu (Obr. 6) (enzym **zeatin reduktasa** EC 1.3.1.69) a hydroxylace N<sup>6</sup>-isopentenylového řetězce z cytokininů isopentenylového typu na cytokininy zeatinového typu (Galuszka *et al.*, 2008). Zeatin může být také konvertován na kyselinu lupinovou pomocí enzymu **zeatin 9-aminokarboxyetyltransferasy** (EC 2.5.1.50, dříve EC 4.2.99.13) (Entsch *et al.*, 1983).

### 2. 2. 5 Degradace

V mnoha rostlinných druzích byl prokázán enzym **cytokinin oxidasa/dehydrogenasa** (CKX, EC 1.5.99.12), který nevratně štěpí nenasycený N<sup>6</sup>-postranní řetězec cytokininů (iP, cZ, tZ). Aktivita tohoto enzymu je indukována vysokými koncentracemi cytokininů. To, že aromatické cytokininy nejsou dobrým substrátem tohoto enzymu, by mohlo vysvětlovat jejich vysokou aktivitu v biotestech i přes jejich slabou aktivaci cytokininových receptorů (Taiz a Zeiger, 2010; Feng *et al.*, 2017). CKX degradují cytokininy s různou specifitou, zatímco apoplastické enzymy interagují převážně s cytokininovými volnými bázemi a ribosidy, cytosolické enzymy preferují 9-glukosidy a vakuolární enzymy vykazují největší aktivitu s cytokinin ribosid mono-, di- a trifosfáty (Galuszka *et al.*, 2007).

### 2. 2. 6 Signalizace

V genomu *Arabidopsis thaliana* se nacházejí tři histidinové kinasy, které zahrnují rodinu cytokininových receptorů: AKH2, AHK3 a AHK4/CRE1/WOL. Konkrétní místo vázající cytokininy se na těchto receptorech nachází mezi transmembránovými doménami v tzv. CHASE doméně. Po navázání cytokininu (Obr. 7) je receptor aktivován autofosforylací, fosforylované skupiny jsou poté přemístěny na konzervovaná histidinová rezidua *Arabidopsis* histidin fosfotransferových proteinů (AHP). AHP jsou následně translokovány z cytosolu do jádra a fosforylují další komponenty včetně regulátorů odpovědi typu-A a typu-B u *Arabidopsis* (*Arabidopsis* type-A a type-B response regulators, ARR). ARR typu-B jsou skupina transkripčních faktorů třídy MYB, které po aktivaci přímo regulují expresi ARR genů typu-A (Feng *et al.*, 2017).



Obr. 7: Signalizace cytokininů (převzato z Feng *et al.*, 2017)

Tab. 1: Srovnání aktivace AHK3 a AHK4 vybranými cytokininy a jejich ribosidy (převzato ze Spíchal *et al.*, 2004)

Látka	Relativní aktivita (%)	
	AHK3	AHK4
<i>tZ</i>	100	100
<i>tZR</i>	10	92,5
<i>cZ</i>	0	54,2
<i>cZR</i>	0	nt
DHZ	0,1	52,9
DHZR	0	20,8
<i>iP</i>	89,2	72,9
<i>iPR</i>	10	10,1
K	2,5	23,8
KR	0	5,0
BAP	7,7	23,6
BAPR	0	4,0
<i>oT</i>	0	0
<i>oTR</i>	0	0
<i>mT</i>	28,6	79,8
<i>mTR</i>	0	6,3

Pro různé cytokininy vykazují cytokininové receptory různou afinitu. AHK3 i AHK4 vážou *tZ* i *iP*, ale liší se vázáním ostatních cytokininů (Feng *et al.*, 2017). AHK3 rozpoznává také *cZ* a *DHZ*, ovšem s menší citlivostí. Cytokininové ribosidy (CKR) a ribotidy neaktivují AHK4 vůbec, zatímco AHK3 ano. Aromatické cytokininy, a i jejich ribosidy aktivují cytokininové receptory výrazně méně než isoprenoidní cytokininy (Tab. 1). *Orto*-topolin stejně jako *orto*-topolin ribosid neaktivují ani AHK3 ani AHK4 (Spíchal *et al.*, 2004).

## 2.3 Biologická aktivita cytokininových ribosidů na rostliny

### 2.3.1 Cytokininová aktivita

Cytokininová aktivita se stanovuje pomocí cytokininových biotestů. Nejrozšířenějšími jsou kalusový, *Amarantový* a senescenční biotest. Každý z těchto testů zkoumá jinou vlastnost typickou pro cytokininy. Jako referenční hodnota bývá stanovena aktivita BAP, která odpovídá 100 %. Podstatou kalusového biotestu je přírůstek hmoty kalusu po inkubaci buněk tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) v přítomnosti testované látky. U *Amarantového* biotestu se jedná o množství betacyaninu produkovaného ve tmě v rostlinách laskavce ocasatého (*Amaranthus caudatus*). Senescenční test určuje schopnost zkoumaných látek oddalovat senescenci v odstřižených listech pšenice seté (*Triticum aestivum*) a měří se pomocí množství zbylého chlorofylu v listech (Holub *et al.*, 1998).

Cytokininové ribosidy obvykle nedosahují vyšších aktivit v biotestech než jejich volné báze, glukosidy pak bývají téměř úplně neaktivní. Pouze u senescenčního testu dochází v některých případech k vyšší aktivitě u ribosidů oproti jejich volným bázím. Zde se může jednat až i o 220 % aktivity BAP (Holub *et al.*, 1998; Doležal *et al.*, 2007).

Na cytokininovou aktivitu aromatických cytokininů mají významný vliv také substituenty na benzenovém jádře aromatických cytokininů. *Orto*-hydroxylace výrazně snižuje aktivitu, *para*-hydroxylace také způsobuje ztrátu aktivity, naproti tomu *meta*-hydroxylace tuto aktivitu zvyšuje a *mT* (v senescenčním testu *mTR*) je jedna z neaktivnějších látek v cytokininových biotestech. Výrazný vliv na aktivitu má také substituce atomem halogenu na benzenovém jádře, zejména pak fluorinace. Fluorderiváty vykazují vysokou cytokininovou aktivitu ve všech třech biotestech. Výrazné cytokininové aktivity dosahují také monometoxyderiváty BAPR (Holub *et al.*, 1998; Doležal *et al.*, 2007).

Doležal *et al.* (2007) ve své práci připravili 48 aromatických derivátů cytokininových ribosidů. Ani jedna z těchto látek není schopna plně aktivovat cytokininové receptory AHK3 nebo AHK4, což je překvapivé zejména u AHK3, který obvykle cytokininovými ribosidy rozpoznáván bývá (Spíchal *et al.*, 2004).

### 2.3.2 Cytotoxický efekt

Cytokininové ribosidy mohou mít pro rostliny i toxický účinek. Toxické koncentrace CKR pro rostliny jsou však ale mnohonásobně vyšší než ty, které se vyskytují přirozeně v rostlinách. Endogenní výskyt CKR v rostlinných buňkách se pohybuje

v pikomolárním řádu, při výše zmíněném toxickém efektu se již však jedná o řády mikromolární a vyšší (Voller *et al.*, 2019).

Mlejnek a Procházka (2002) a Mlejnek *et al.* (2003) zkoumali efekt iPR a BAPR na BY-2 buňky *Nicotiana tabacum*. Po aplikaci iPR i BAPR v koncentracích desítek  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na buňky dochází k buněčné smrti se znaky typickými pro apoptózu. Bylo pozorováno zmenšování buněk, kondenzace chromatinu i degradace DNA stejně jako aktivace kaspázám-1 a 3 podobných proteáz (caspase-1/3-like protease). V buňkách dochází po aplikaci CKR k jejich rychlé fosforylaci a vzniku a akumulaci ribosid-monofosfátů pomocí adenosin kinasy, které je provázeno vznikem reaktivních forem kyslíku a poklesem množství ATP. Bylo potvrzeno, že právě intracelulární fosforylace souvisí s navozením apoptózy v rostlinných buňkách tabáku a že aplikací inhibitoru adenosin kinasy je možné zabránit intracelulární fosforylaci a vyhnout se tak navození apoptózy v buňkách.

Podobný mechanismus navození apoptózy v rostlinných buňkách byl objeven také při aplikaci cytokininových volných bází. V jejich případě dochází taktéž k fosforylaci a přeměně na odpovídající mononukleotidy, neděje se tak ale pomocí adenosin kinasy, nýbrž přes fosforibosyltransferázovou dráhu. Následný průběh navození apoptózy je analogický jako u CKR (Mlejnek *et al.*, 2005).

Některé cytokininové volné báze jsou ovšem schopné inhibovat také rostlinné na cyklinech závislé protein kinasy (CDK) a takto působit toxicky na rostlinné buňky. Optimální koncentrace cytokininů aplikovaných na kalus tabáku při experimentech zkoumajících podporu buněčného dělení je mezi  $10^{-5}$  až  $10^{-9}$  M, vyšší koncentrace než  $10^{-5}$  není tak efektivní a při koncentraci vyšší než  $10^{-4}$  již dochází k inhibici buněčného dělení. Konkrétně látky iP a BAP silně inhibují rostlinné CDK při koncentracích vyšších než  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Doležal *et al.*, 2006).

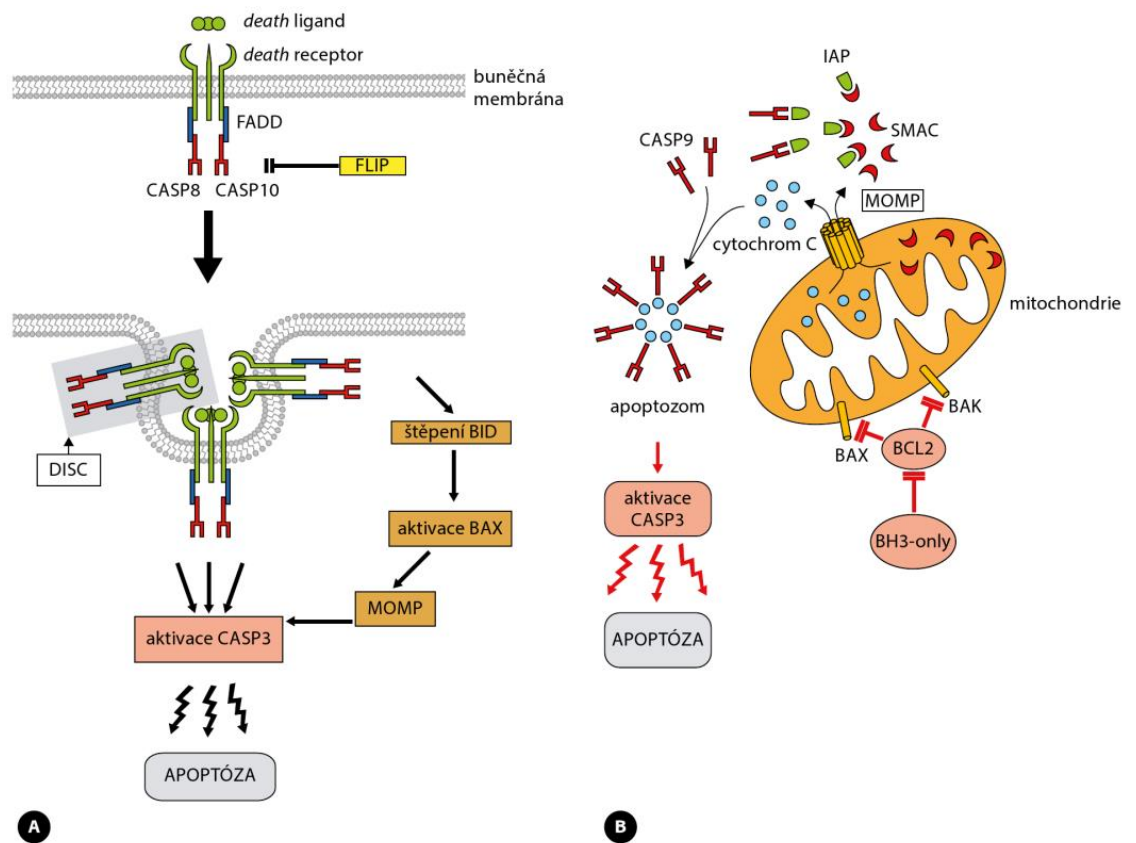


## 2. 4 Biologická aktivita cytokininových ribosidů na živočišné buňky

Cytokiny jsou látky, které působí na řadu fyziologických procesů v rostlinách, bylo ale zjištěno, že mohou ovlivňovat také buňky živočišné. Některé z těchto látek navozují apoptózu nebo inhibují růst buněk odvozených od různých malignit, jiné ochraňují živočišné buňky před oxidativním stresem či oddalují stárnutí buněk tak, že jsou používány i v kosmetických přípravcích (Kadlecová *et al.*, 2018; Voller *et al.*, 2019).

### 2. 4. 1 Apoptóza (u nádorových buněk)

Mezi základní mechanismy zániku buňky patří apoptóza a nekróza. Zatímco u nekrózy se jedná o nekontrolovatelný rozpad buňky často následovaný zánětlivou reakcí, apoptózu nazýváme programovanou buněčnou smrtí. U apoptózy hovoříme o procesu aktivním, do jisté míry vratném a vyžadujícím ATP. Normální průběh apoptózy je nutný pro udržení homeostázy, její deregulace vede k patologickým stavům a je často znakem nádorových onemocnění. Rozlišujeme dvě hlavní apoptické dráhy: receptorovou (vnější) a mitochondriální (vnitřní) (Klener a Klener, 2013).



Obr. 8: Schéma apoptózy. A – Vnější (receptorová) cesta aktivace, B – vnitřní (mitochondriální) cesta aktivace (převzato z Klener a Klener, 2013)

**Receptorová apoptóza** (Obr. 8A) začíná navázáním smrtících ligandů (death ligands – FAS ligand, TNF,...) na smrtící receptory (death receptors – FAS, TNFR,...), díky čemuž vzniká efektorový komplex DISC (death inducing signaling complex). V tomto komplexu následně dochází k autoaktivaci kaspázy-8 a kaspázy-10, které dále štěpí kaspázu-3 a kaspázu-7 (Klener a Klener, 2013).

**Mitochondriální apoptóza** (Obr. 8B) je evolučně starší detekující zejména mutace DNA a chyby při replikaci DNA. V mitochondriích se nachází řada proapoptických molekul (cytochrom C, apoptózu indukující faktor – AIF, endonukleasa G, atd.). Ke spuštění mitochondriální apoptózy dochází narušením vnější mitochondriální membrány a uvolněním proapoptických molekul a kyslíkových radikálů do cytosolu. Následně vzniká efektorový komplex – apoptosom a dochází k autoaktivaci kaspázy-9, která dále aktivuje kaspázu-3 a kaspázu-7 (Klener a Klener, 2013).

Aktivace kaspáz-3 a 7 je společná oběma zmíněným drahám a v této fázi se již jedná o nevratný proces apoptózy. Poté jsou štěpeny základní buněčné struktury a komponenty, chromatin kondenzuje, membránové vezikuly se odštěpují a dochází ke vzniku apoptických tělísek, které jsou fagocytovány (Klener a Klener, 2013).

#### **2. 4. 2 Protinádorová funkce CKR**

U přirozeně se vyskytujících cytokininových ribosidů byla prokázána značná protinádorová aktivita. První důkazy o cytotoxické aktivitě cytokininových ribosidů pocházejí z 60. let 20. století. Prvotní studie zkoumaly iPR a další N<sup>6</sup>-substituované deriváty adenosinu s vázaným alifatickým řetězcem. Fleysher *et al.* (1969) připravili sadu derivátů CKR a prokázali cytotoxickou aktivitu několika aromatických CKR (N<sup>6</sup>-benzyladenosinu, N<sup>6</sup>-furfuryladenosinu a N<sup>6</sup>-thienyladenosinu) vůči různým krevním malignitám a naopak dokázali, že normální leukocyty zůstaly těmito látkami neovlivněné. Tato slibná aktivita vyústila v menší klinickou studii s látkami iPR a BAPR (Mittelman *et al.*, 1975). V případě iPR byly během studie zjištěny pozitivní účinky při léčbě promyeloidní leukemie, chronické myeloidní leukemie nebo chronické lymfatické leukemie při podávání 30-40 mg·kg<sup>-1</sup> iPR, ovšem vyskytly se zde jisté problémy se stabilitou dané látky. BAPR v dávkách 20-30 mg·kg<sup>-1</sup> byl schopen vyvolat zlepšení u pacientů s leiomyosarkomem a rakovinou ledvin (Mittelman *et al.*, 1975).

Dále bylo také u některých cytokininů zjištěno, že jsou schopny inhibovat určité lidské protein kinasy včetně na cyklinech závislých protein kinas (CDK). Pomocí drobných modifikací struktury BAP je možné docílit specifické inhibice vůči konkrétním

důležitým CDK. Mezi 2, 6, 9-trisubstitovanými deriváty BAP bylo nalezeno několik významných látek s protinádorovým účinkem, jako například látky olomoucín či roskovitin, které jsou vysoce aktivními inhibitory CDK (Veselý *et al.*, 1994; Havlíček *et al.*, 1997; Doležal *et al.*, 2006).

#### **2. 4. 2. 1 Výzkum mechanismu působení CKR na leukemickou buněčnou linii HL-60**

Významný pokrok ve výzkumu mechanismu působení derivátů BAPR uskutečnili Mlejnek a Kuglík (2000) a Mlejnek (2001), kteří se zabývali studiem mechanismu působení N<sup>6</sup>-benzyladenosinu (BAPR) na nádorové buňky, konkrétně buněčnou linii akutní promyelocytické leukemie HL-60. Došli ke zjištění, že mikromolární koncentrace BAPR aplikované na buňky HL-60 navozují nevratné změny vedoucí k apoptóze (Obr. 8) zahrnující aktivaci kaspázy-3 a kaspázy-9, která je doprovázena změnami struktury chromatinu, integrity DNA a také změnou hladiny ATP. Právě ATP je nezbytné pro pohyb chromatinu směrem k jaderné membráně. Ishii *et al.* (2002) potvrdili i u dalších cytokininových ribosidů (iPR, KR, BAPR) schopnost indukce apoptózy a inhibici růstu HL-60. Cytokininové ribosidy na rozdíl od cytokininových volných bází způsobují výrazný pokles intracelulárního ATP, snížení membránového potenciálu mitochondrií a akumulaci reaktivních forem kyslíku a tímto tedy navození apoptózy přes vnitřní cestu (Obr. 8A). N<sup>6</sup>-substituované deriváty adeninu a adenosinu (cytokininové volné báze a ribosidy) jsou v buňkách HL-60 *in vitro* fosforylovány na monofosfáty. Zatímco u cytokininových ribosidů dochází k fosforylaci adenosin kinasou, u volných bází je potřeba jiné dráhy a v tomto případě je pak množství vzniklých mononukleotidů 50-100krát nižší. Tato intracelulární akumulace mononukleotidů odvozených od příslušných N<sup>6</sup>-substituovaných derivátů adenosinu vede k výraznému poklesu ATP v buňce a následné indukci apoptózy. Z tohoto tedy plyne, proč jsou cytokininové volné báze ne příliš úspěšnými spouštěči apoptózy (Mlejnek a Doležal, 2005). K intracelulární fosforylaci dochází nejen u cytokininových ribosidů, ale i u jejich příslušných ribosid-5'-monofosfátů. Cytotoxicita pak zůstává podobná, případně fosforylace vede k jejímu snížení (Voller *et al.*, 2010).

Wang *et al.* (2016) zkoumali mechanismus apoptózy spouštěné oTR v buňkách HL-60. V buňkách akutní myeloidní leukemie ovlivňuje oTR jejich proliferaci a buněčný cyklus. Nejprve dochází k přeměně oTR na jeho fosforylovanou formu a poté k indukci apoptózy aktivované její vnitřní cestou (Obr. 8B) – přes uvolnění cytochromu z mitochondrií do cytosolu a následné zvýšení aktivity kaspázy-3.

#### **2. 4. 2. 2 Výzkum mechanismu působení CKR na buněčných liniích pevných nádorů**

Cheong *et al.* (2009) zjišťovali účinky kinetin ribosidu (KR) na nádorovou buněčnou linii HepG2. Data získaná z průtokové cytometrie potvrdila *in vitro* inhibici růstu buněk HepG2, která je způsobena zastavením buněčného cyklu v přechodu fází G2/M a následnou buněčnou smrtí. Při dalším výzkumu mechanismu působení KR bylo zjištěno, že antiproliferativní účinek se projevuje také vůči lidským primárním fibroblastům a keratinocytům. Při vystavení buněk různých lidských nádorových linií, karcinomů a melanomů mikromolárním koncentracím KR dochází k ATP depleci a indukci genotoxického stresu, následkem čehož jsou nad-regulovány geny odpovědi na poškození DNA či stres (Cabello *et al.*, 2009).

Rajabi *et al.* (2012) aplikovali KR na buňky kolorektálního karcinomu HCT-15. V tomto případě došli také k závěru, že KR již při koncentraci  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  způsobuje zastavení buněčného cyklu ve fázi S blokováním přechodu G2/M a G0/G1 fází.

V různých hematologických malignitách způsobují cytokininové ribosidy obvykle spuštění apoptózy, v případě buněčných linií odvozených od pevných nádorů může vlivem CKR dojít k různým efektům – jednou z možností je taktéž navození apoptózy, další je zastavení buněčného cyklu v G1 fázi nebo při přechodu G2/M fází – v závislosti na příslušné buněčné linii a konkrétním CKR (Voller *et al.*, 2019).

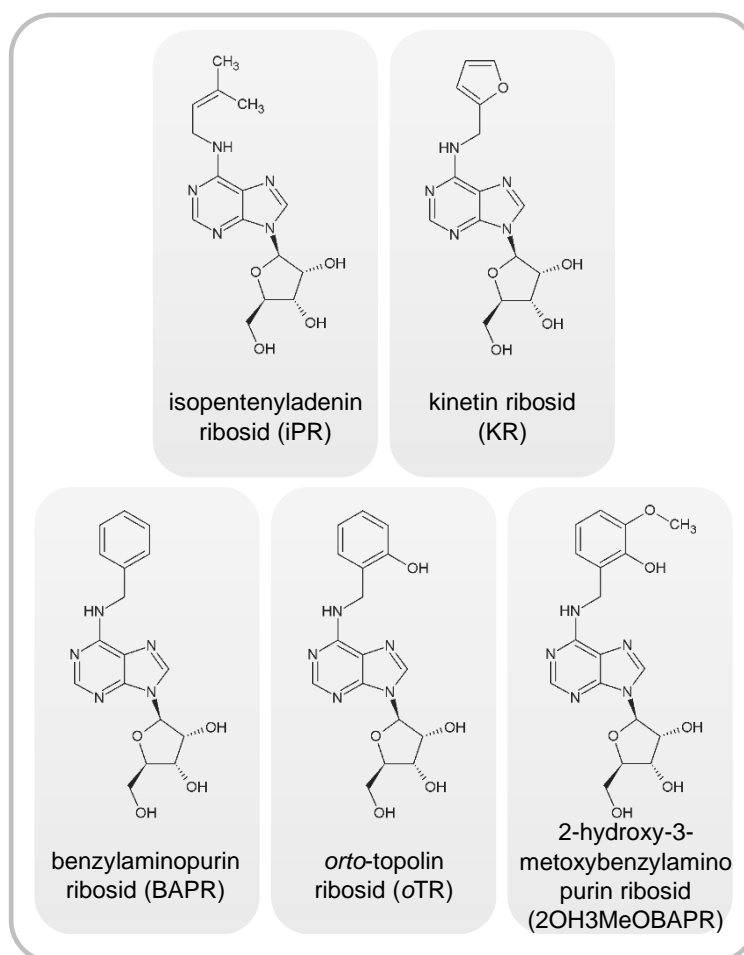
#### **2. 4. 2. 3 Výzkum vlivu struktury na protinádorovou aktivitu CKR**

Doležal *et al.* (2007) a Voller *et al.* (2010) provedli rozsáhlé studie s množstvím derivátů N<sup>6</sup>-benzyladenosinů. Tyto látky byly testované jak na buněčných liniích odvozených od různých krevních malignit (CEM, HL-60 K-562), tak na liniích odvozených od pevných nádorů (G-361, HOS, MCF7, B16).

K nejvyššími cytotoxickému efektu u leukemických linií a MCF7 obvykle dochází v souvislosti s *orto*-hydroxylací a fluorinací benzyladenosinů (Tab. 2). Fluorované deriváty jsou ovšem toxické i pro normální myší fibroblasty (NIH3T3). Žádná ze 48 testovaných látek nebyla toxická vůči buněčné linii lidského osteogenního sarkomu (HOS) a buněčné linie melanomů (G-361, B16) jsou taktéž poměrně odolné (vůči více než 90 % testovaných látek) (Doležal *et al.*, 2007).

Tab. 2: Hodnoty cytotoxicit vybraných látek na buněčné linie lidského osteogenního karcinomu (HOS), chronické myeloidní leukemie (K-562), rakoviny prsu (MCF7), akutní lymfoblastické leukemie (CEM), akutní promyelocytické leukemie (HL-60) a lidského maligního melanomu (G-361), (převzato z Doležal *et al.* (2007) a Voller *et al.* (2010))

Látka	Buněčná linie (IC <sub>50</sub> /μmol·l <sup>-1</sup> )					
	HOS	K-562	MCF7	CEM	HL-60	G-361
BAP	>166	140	>166	>166	>166	>166
BAPR	13,6	5,9	3,7	1,3	0,93	15
K	>166	>166	>166	155	>166	>166
KR	5,9	10,5	4,3	1,6	0,8	21,9
iP	>166	150	>166	92	>166	>166
iPR	11,7	5,2	6,9	1,7	0,71	>166
oT	>166	>166	>166	118	78	103
oTR	3,1	2,4	7,7	0,5	0,6	11,6
mT	>166	140	>166	>166	>166	>166
mTR	>166	>166	>166	>166	24	>166
4-F-BAPR	13,2	2,7	21	1,25	1,2	>166
2-OH-3-Me-BAPR	>166	18	6,9	0,9	15	>166
2-OH-3-MeO-BAPR	>166	27,9	20,2	0,3	0,15	148,1



Obr. 9: Struktury látek isopentenyladenin ribosidu (iPR), kinetin ribosidu (KR), benzylaminopurin ribosidu (BAPR), *orto*-topolin ribosidu (oTR), 2-hydroxy-3-metoxybenzylaminopurin ribosidu (2OH3MeOBAPR)

Voller *et al.* (2010) porovnávali kromě různých substituentů na benzenovém jádře taktéž rozdíly v cytotoxicitě mezi cytokininovými ribosidy a jejich příslušnými volnými bázemi mezi celkem 47 přirozeně se vyskytujícími cytokininy. Při ošetření buněčných linií cytokininovými ribosidy *o*TR, *i*PR, BAPR a KR (Obr. 9) dochází redukci životaschopnosti jak u buněčných linií hematologických malignit, tak u linií pevných tumorů při rozsahu  $IC_{50} = 0,5-13,6 \mu M$ . Nejcitlivějšími buněčnými liniemi ovšem jsou leukemické linie HL-60 a CEM. Bylo potvrzeno, že cytokininové volné báze i glukosidy vykazují jen velmi nízkou či vůbec žádnou cytotoxicitu vůči testovaným liniím. Stejně jako Doležal *et al.* (2007), tak i Voller *et al.* (2010) došli k závěru, že s cytotoxicitou významně souvisí poloha hydroxylace na postranním řetězci cytokininů. K nejvíce cytotoxickým látkám patří *o*TR, dále pak *m*TR a *p*TR. V případě cytotoxicity isoprenoidních cytokininů pak platí  $cZR > tZR$ .

Oproti ostatním zkoumaným látkám způsobuje nejvýraznější cytotoxicitu *o*TR. Tato látka jako jediná působí cíleně na buněčné linie z panelu NCI<sub>60</sub> s mutovaným tumor supresorovým genem *p53*. Právě tento gen bývá často mutován nebo deletován v lidských rakovinových buňkách. V normálních buňkách dochází jeho vlivem k zastavení buněčného cyklu, senescenci a apoptóze, v rakovinových buňkách se tak ale neděje (Vazquez *et al.*, 2008; Voller *et al.*, 2010).

V současné době je nejaktivnějším cytokininovým ribosidem z hlediska cytotoxicity vůči panelu nádorových linií NCI<sub>60</sub> přirozeně se vyskytující 2OH3MeOBAPR. Na rozdíl od *o*TR je aktivita této látky nezávislá na *p53* a buněčnou smrt navozuje jiným mechanismem než ostatní cytokininové ribosidy, a to bez způsobování poklesu hladin ATP. Bylo zjištěno, že v tomto případě dochází k inhibici kandidátního lidského onkogenu DNPH1, který bývá nad-regulován v různých malignitách. DNPH1 je inhibován i ostatními CKR (*i*PR, BAPR, KR), avšak v těchto případech je cytotoxický efekt způsoben spíše rychlým poklesem ATP a ztrátou membránové integrity buněk. Je možné, že právě inhibice DNPH1 může být zodpovědná za cytotoxicitu 2OH3MeOBAPR (Amiable *et al.*, 2013; Voller *et al.*, 2017).

### 2. 4. 3 Cytoprotektivní funkce

Zatímco u některých přirozeně se vyskytujících cytokininových ribosidů byl prokázán silný cytotoxický účinek proti rakovinným buňkám, jejich odpovídající volné báze toxicitu nevykazují. Například kinetin a další volné báze jsou zkoumány zejména pro jejich protektivní účinky (Doležal *et al.*, 2007; Voller *et al.*, 2010, 2019; Kadlecová *et al.*, 2019).

Bylo zjištěno, že kinetin působí jako hormetin, což znamená že zatímco jeho vysoké dávky ( $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a více) *in vitro* způsobují snížení viability buněk a poškození DNA, jeho nízké dávky (do  $100 \text{ n nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) mohou být naopak prospěšné a ochraňovat buňky před oxidativním stresem (Rattan, 2008; Othman *et al.*, 2016). K dalším pozitivním účinkům kinetinu patří jeho účinek proti stárnutí při aplikaci na pokožku a slibné výsledky se objevily i při využití kinetinu podáním pacientům s familiární dysautonomií a také na modelech dalších neurodegenerativních onemocnění (Kadlecová *et al.*, 2019). Dále bylo zjištěno, že kinetin, *mT* a *pT* jsou schopni prodlužovat délku života u *Caenorhabditis elegans*, přičemž bylo dokázáno, že kinetin je v *C. elegans* metabolizován na formu kinetin ribosidu a kinetin ribosidu-5'-monofosfátu (Kadlecová *et al.*, 2018). Některé deriváty kinetinu vykazují silné protektivní účinky na *C. elegans* vystavenému oxidativnímu stresu. Taktéž byla objevena silná protektivní schopnost těchto látek před UV zářením na buňkách lidské kůže *in vitro* (Hönig *et al.*, 2018).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

2-(2-aminoetyl)-6-metoxyfenol – ChemSpace (čistota min. 95 %)

2-(2-aminoetyl)fenol – Enamine (čistota min 95 %)

2,3-dietoxybenzylamin hydrochlorid – komerčně nedostupný, připraven dříve popsanou syntézou dle Doležal *et al.*, 2006

2-fluoro-2-deoxyinosin – Jena Bioscience (čistota min 99 %)

2-hydroxy-3-isopropoxybenzylaminu – komerčně nedostupný, připraven dříve popsanou syntézou dle Doležal *et al.*, 2006

2-hydroxy-3-metoxybenzylamin hydrochlorid – komerčně nedostupný, připraven dříve popsanou syntézou dle Doležal *et al.*, 2006

2-hydroxybenzylamin – Fischer Scientific (čistota min. 98 %)

4-metylbelliferyl  $\beta$ -D-N, N', N''-triacetylchitotriosid - Merck

6-chlorpurin ribosid – OlChemIm (čistota min. 95 %)

akutasa – Sigma-Aldrich.

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

benzylaminopurin ribosid – Sigma Aldrich (čistota min. 99 %)

dietyleter p. a. – VWR

DIPEA – Sigma Aldrich (čistota min. 99 %)

DMF p. a. – Lach-ner

DMSO p. a. – Merck

EDTA – Sigma Aldrich

etanol p. a. – VWR

chloroform p. a. – PENTA

ivermectin – Merck

juglon (5-hydroxy-1,4-naftochinon) – Merck

kolagen – Sigma Aldrich

kurkumin – Merck

metanol p. a. – PENTA

MTT – Sigma Aldrich

*n*-butanol p. a. – Lach-ner



*orto*-topolin ribosid – OlChemIm (čistota min. 95 %)

PBS – Sigma Aldrich

triethylamin (TEA) – Sigma Aldrich (čistota min. 99 %)

triton X-100 – Sigma Aldrich

trypsin – Sigma Aldrich

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

### **3. 1. 2 Média a roztoky**

#### **NGM (nematode growth medium)**

- 1,2 g NaCl
- 1 g pepton
- 7,8 g agar
- ddH<sub>2</sub>O do 400 ml
- 400 µl cholesterol (5 mg·ml<sup>-1</sup> v EtOH)
- autoklávováno, po zchlazení přidáno:
  - 200 µl 1M CaCl<sub>2</sub> (sterilní)
  - 400 µl 1M MgSO<sub>4</sub> (sterilní)
  - 10 ml fosfátový pufr pH 6.0

#### **LB médium**

- 10 g trypton
- 5 g kvasnicový extrakt
- 10 g NaCl
- ddH<sub>2</sub>O do 1 l a autoklávováno

#### **roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans***

- 8 ml voda
- 1,5 ml roztok NaClO
- 0,5 ml 10M NaOH

#### **pufr na chitinázový test**

- 40 g NaOH
- 75 g glycin
- H<sub>2</sub>O do 1 l
- srovnáno pH na 10,6

### **S-complete**

- 5,9 g NaCl
- 50 ml fosfátového pufru (nesterilní)
  - 136 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - ddH<sub>2</sub>O do 900 ml
  - pH na 6,0 pomocí 5M KOH
  - ddH<sub>2</sub>O do 1 l
- 1 ml cholesterolu ( $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v EtOH)
- ddH<sub>2</sub>O do 1 l a autoklávováno
- 10 ml fosfátový pufr (sterilní)
- 10 ml stopových prvků (sterilní)
  - 1,86 g Na<sub>2</sub>EDTA
  - 0,69 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0,20 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
  - 0,29 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0,016 g  $\text{CuSO}_4$
  - doplněno ddH<sub>2</sub>O do 1 l
- 3 ml 1M  $\text{CaCl}_2$  (sterilní)
- 3 ml 1M  $\text{MgSO}_4$  (sterilní)

### **M9**

- 15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 5 g NaCl
- 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ddH<sub>2</sub>O do 1 l a autoklávováno

### **modifikované MS médium (v 1 l)**

- 4  $\mu\text{mol}$  kyselina nikotinová
- 2,4  $\mu\text{mol}$  pyridoxin hydrochlorid
- 1,2  $\mu\text{mol}$  thiamin
- 26,6  $\mu\text{mol}$  glycin
- 1,37  $\mu\text{mol}$  glutamin
- 1,8  $\mu\text{mol}$  myo-inositol
- 30 g sacharóza

- 8 g agar
- 5,37  $\mu\text{mol}$  kyselina naftyloctová (NAA)
- 0,5  $\mu\text{mol}$  BAP

Všechny látky použité pro přípravu médií a roztoků pocházejí z firmy Merck.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – Sigma Aldrich

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) – Sigma Aldrich

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) – Sigma Aldrich

### **3. 1. 3 Biologický materiál**

#### **3. 1. 3. 1 Buněčné linie**

Pro testování cytotoxicity byly použity nádorové buněčné linie lidské chronické myeloidní leukemie K-562 a lidského karcinomu prsu MCF7 pocházející z ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Anglie). Dále byly použity buněčné linie lidského hepatocelulárního karcinomu HUH7, HepG2, SNU449 získané z ATCC (American Type Culture Collection) a HLF získané z JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank).

Buňky byly pěstovány na Petriho miskách v tekutých médiích: linie HLF, HUH7, K-562 a MCF7 v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), HepG2 v EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), SNU449 v RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) doplněných o 10% fetální sérum, glutamin ( $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), streptomycin ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a penicilin ( $100 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v inkubátoru při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a v atmosféře 5%  $\text{CO}_2$  a pravidelně byly pasážovány.

#### **3. 1. 3. 2 *Caenorhabditis elegans***

K experimentům byla využita wild-type linie *Caenorhabditis elegans* N2. Hlístice byly pěstovány ve  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  za standardních kultivačních podmínek (Stiernagle, 2006) na Petriho miskách s NGM osázených bakteriemi *Escherichia coli* OP50. Tento kmen bakterií je uracil-auxotrofní a nemůže se nadále množit v médiích pro kultivaci *C. elegans*, která jsou chudá na uracil. *C. elegans* i bakterie byly zakoupeny z *Caenorhabditis* Genetic Center (Minnesota, USA).

#### **3. 1. 3. 3 Rostlinný materiál**

Pro kalusový biotest byl použit kalus rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 pěstovaný při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ve tmě na modifikovaném MS médiu. Pro senescenční biotest byla

použita semena pšenice *Triticum aestivum* L. cv. Aranka. V Amaranthovém biotestu byla využita semena rostliny *Amaranthus caudatus* var. *Atropurpurea*.

### **3. 1. 4 Přístroje**

analytické váhy

Bod tání – Büchi Melting Point B-540

CASY® cell counter and analyzer – OMNI Life Science, Německo

centrifuga – Jouan BR4i

HPLC – HPLC Beckman Gold System

LC-MS – kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II s UV-VIS detektorem a hmotnostním detektorem Agilent InfinityLab LC/MSD

MS – Tandem Mass Spectrometer Q-ToF Micro™ – Waters

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

světelný mikroskop – Leica DM IL LED

Tecan Infinite 200 PRO – Tecan Trading AG, Švýcarsko

Thermoshaker (třepací inkubátor) – Bioer – Mixing Block MB-102

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

vakuová rotační odparka Heidolph

wMicroTracker – InVivo Biosystems, USA

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Syntéza látek

#### 3.2.1.1 Látka (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-((2-hydroxy-3-methoxyfenetyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (ŠS10)

Do Erlenmayerovy baňky byl vložen 6-chlorpurin ribosid (150 mg, 0,5 mmol) a 2-(2-aminoethyl)-6-methoxyfenol (110 mg, 0,7 mmol) společně s triethylaminem (TEA) (114  $\mu$ l, 0,8 mmol) a vše bylo rozpuštěno v *n*-butanolu (2,3 ml). Tato reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 90 °C po dobu 4 hodin. Reakce vycházela ze syntézy popsané Tarkowskou *et al.* (2003) a zobrazuje ji schéma 1. Po uplynutí této doby bylo provedeno kontrolní TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1). Následně byla reakční směs ponechána přes noc v lednici při 4 °C, kde došlo k vysrážení bílé krystalické látky. Výsledný produkt byl promyt studenou vodou, vysušen (při 60 °C), rekrystalizován v absolutním etanolu a zfiltrován. Filtrát byl poté zahuštěn na vakuové rotační odparce (VRO) a ponechán v lednici ke krystalizaci druhého podílu, který byl následně taktéž zfiltrován, promyt etanolem a usušen.

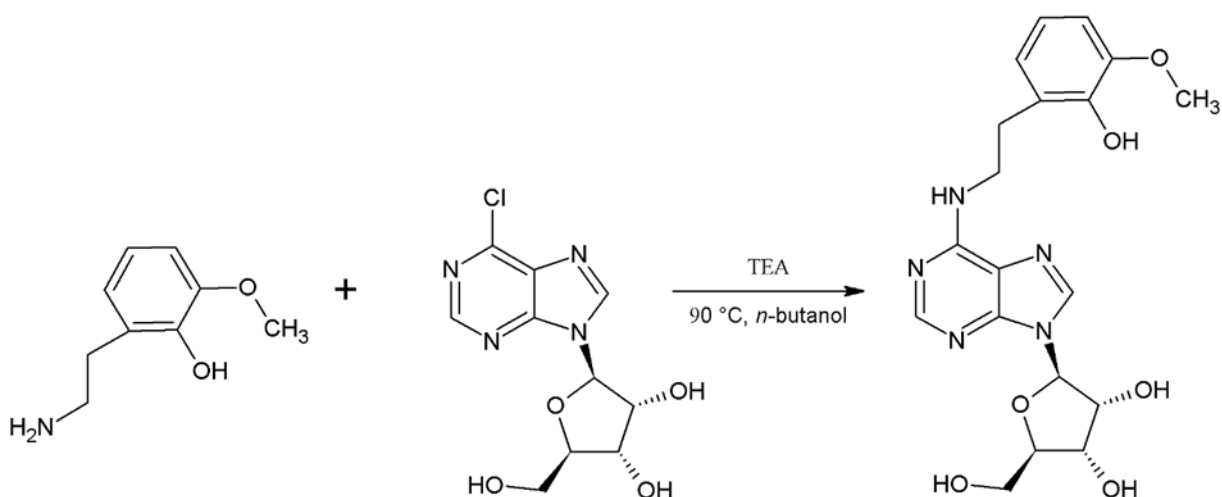


Schéma 1: Reakční schéma přípravy látky ŠS10

### 3. 2. 1. 2 Látka (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(hydroxymetyl)-5-(6-((2-hydroxyfenethyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diol (ŠS11)

Reakční směs 6-chlorpurinribosidu (166 mg, 0,6 mmol) s 2-(2-aminoethyl)fenolem (100 mg, 0,7 mmol) v *n*-butanolu (2,7 ml) a za přítomnosti TEA (127  $\mu$ l, 0,9 mmol) byla po dobu 4 hodin míchána a zahřívána na 90 °C. Reakce probíhala dle schématu 2. Po provedení kontrolního TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1) byla směs umístěna do lednice, kde byl vykrytalizován výsledný produkt. Následující den byla směs zfiltrována a produkt byl promyt studenou vodou a usušen. Pro zvýšení čistoty byla provedena rekrystalizace v metanolu, po zfiltrování byl filtrát odpařen na VRO a byl získán výsledný čistý produkt. Produkt zachycený na fritě byl ještě jednou rekrystalizován v metanolu za vzniku druhého podílu.

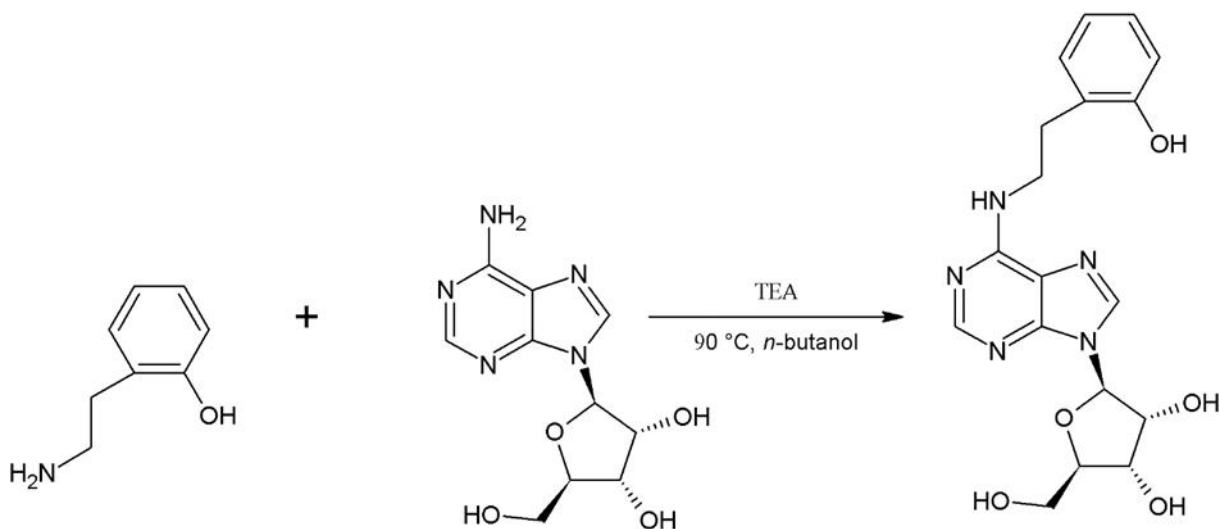


Schéma 2: Reakční schéma přípravy látky ŠS11

### 3. 2. 1. 3 Látka (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-((2,3-diethoxybenzyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (ŠS13)

V Erlenmayerově baňce pod zpětným chladičem byl smíchán 6-chlorpurin ribosid (250 mg, 0,9 mmol) a 2,3-diethoxybenzylamin hydrochlorid (254 mg, 1,1 mmol) v *n*-butanolu (4,1 ml) v přítomnosti TEA (190  $\mu$ l, 1,4 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 90 °C po 4 hodiny (viz schéma 3) a poté bylo provedeno ověřovací TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1). Reakční směs byla zahuštěna na VRO a umístěna přes noc do lednice pro následnou krystalizaci. Další den byla provedena filtrace a produkt byl promyt diethyleterem. Filtrát byl opět zahuštěn, přes noc ponechán v lednici a jeho následnou filtrací byl získán druhý podíl.

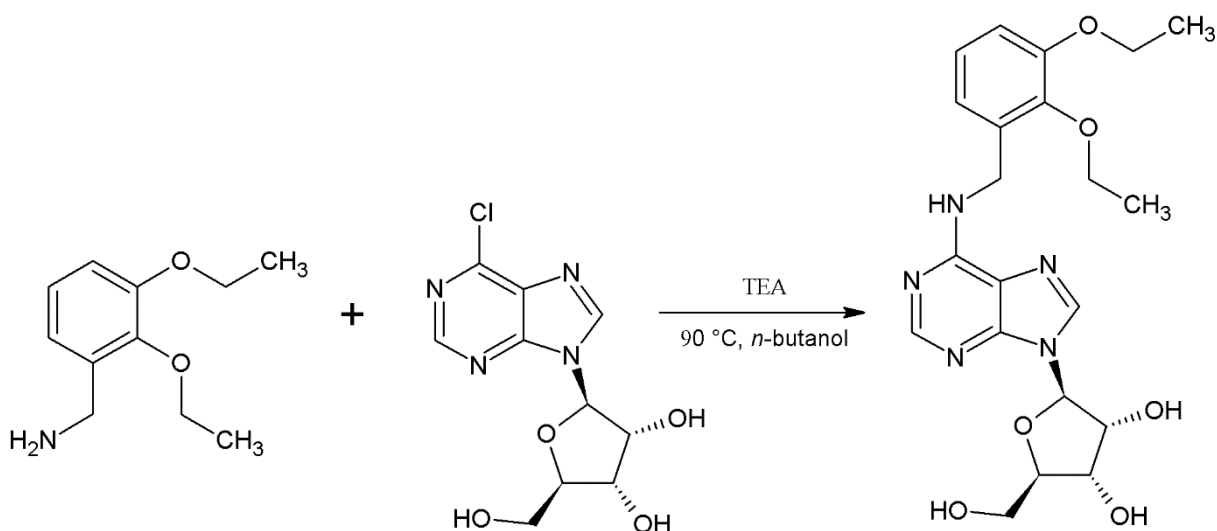


Schéma 3: Reakční schéma přípravy látky ŠS13

### 3. 2. 1. 4 Látka (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-((2-hydroxy-3-isopropoxybenzyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (ŠS14)

Reakční směs 6-chlorpurin ribosidu (210 mg, 0,7 mmol), 2-hydroxy-3-isopropoxybenzylaminu (200 mg, 1,2 mmol) a TEA (160  $\mu$ l, 1,2 mmol) v *n*-butanolu (3,5 ml) byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 90 °C po dobu 4 hodin. Reakce probíhala dle schématu 4. Po provedení kontrolního TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1) byla reakční směs odpařena na VRO na žlutohnědý gel. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové preparativní chromatografie s gradientem mobilní fáze CHCl<sub>3</sub>:MeOH od 19:1 po 4:1. Frakce obsahující výsledný produkt, které byly od ostatních odlišený pomocí TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1), smíchány a odpařeny na VRO. Výsledný produkt byl následně dosušen dietylerem.

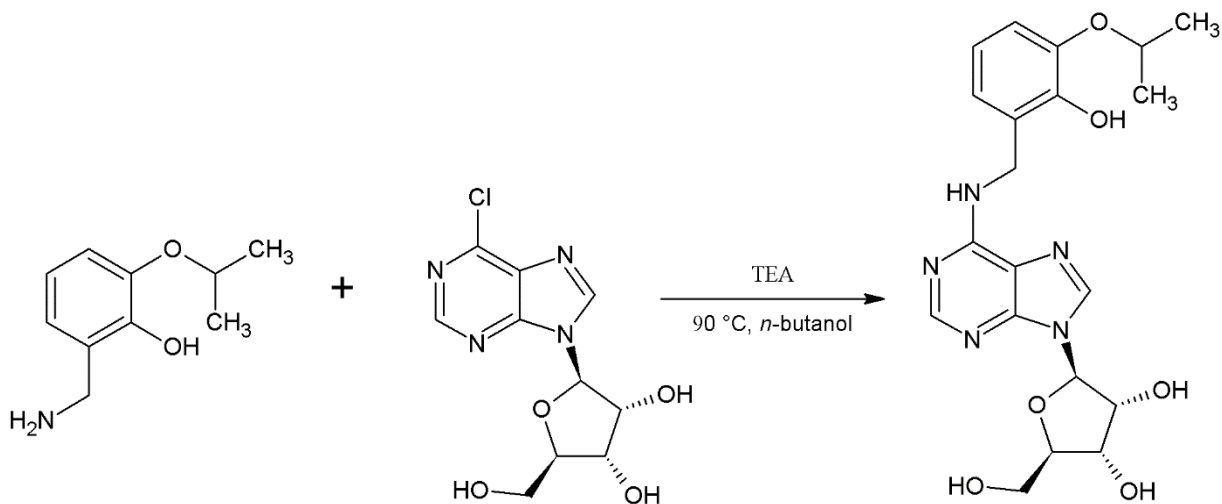


Schéma 4: Reakční schéma přípravy látky ŠS14



### 3. 2. 1. 5 Látka (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-4-fluoro-5-(6-((2-hydroxybenzyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol (ŠS16)

V baňce byl smíchán 2-fluoro-2-deoxyinosin (200 mg, 0,7 mmol) a BOP (393 mg, 0,9 mmol) společně s DMF (4 ml), následovala DIPEA (194  $\mu$ l, 1,1 mmol) a 2-hydroxybenzylamin (110 mg, 0,9 mmol) na základě upraveného postupu popsáního Wanem *et al.* (2005). Reakční směs byla v atmosféře argonu míchána při 55 °C po dobu 24 hodin a její průběh znázorňuje schéma 5. Po uplynutí reakční doby byla přítomnost produktu ověřena pomocí TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1). Produkt byl přečištěn pomocí preparativní kapalinové chromatografie s gradientem mobilní fáze voda:MeOH 10 – 90% MeOH a 90 – 10 % MeOH) a dosušen dietylerem.

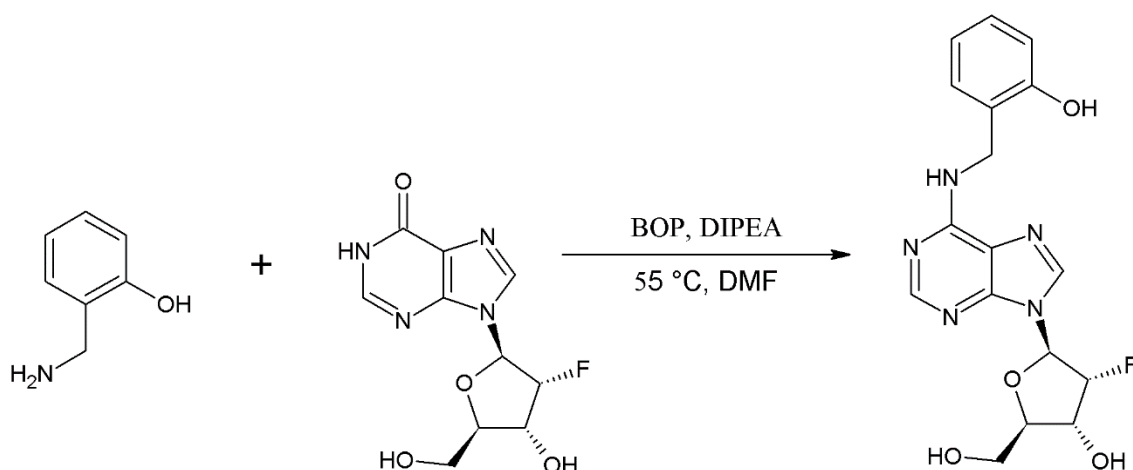


Schéma 5: Reakční schéma přípravy látky ŠS16

### 3. 2. 1. 6 Látka (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-4-fluoro-5-(6-((2-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol (ŠS17)

Byl smíchán 2-fluoro-2-deoxyinosin (200 mg, 0,7 mmol) a BOP (393 mg, 0,9 mmol) společně s DMF (4 ml), DIPEA (194  $\mu$ l, 1,1 mmol) a 2-hydroxy-3-methoxybenzylamin hydrochloridem (169 mg, 0,9 mmol), reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 55 °C v atmosféře argonu po dobu 24 hod. Reakce probíhala dle schématu 6. Po uplynutí reakční doby bylo provedeno kontrolní TLC (mobilní fáze: CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1) a výsledný produkt byl přečištěn pomocí preparativní kapalinové chromatografie s gradientem mobilní fáze voda:MeOH 10 – 90% MeOH a 90 – 10 % MeOH) a dosušen dietylerem.

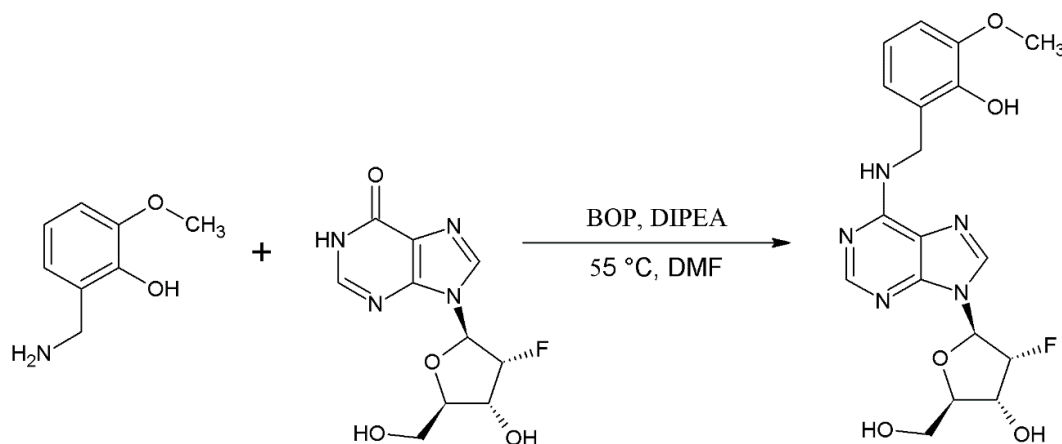
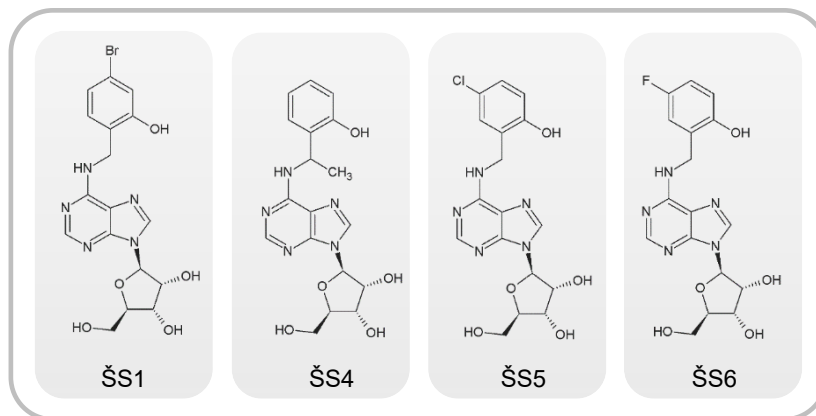


Schéma 6: Reakční schéma přípravy látky ŠS17

### 3. 2. 1. 7 Další testované látky

Pro vybrané experimenty byly na testování použity i látky připravené v práci Slamencová (2018).



Obr. 10: Struktury látek připravených v práci Slamencová (2018) použité pro vybrané experimenty.

### **3. 2. 2 Analytické metody**

Jako analytické metody byly použity: průběžné ověřování průběhu chemické reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie, měření chromatografické čistoty a hmotnostního spektra, získání  $^1\text{H}$  NMR spekter připravených látek, měření bodu tání. Všechny tyto metody byly provedeny dle popisu v práci Slamencová (2018).

### **3. 2. 3 Testování cytotoxicity na nádorových buněčných liniích**

#### **3. 2. 3. 1 Příprava buněk**

Pro samotný experiment musí být buňky přemístěny z Petriho misek do 96jamkových destiček v definovaném množství. Z Petriho misek bylo nejprve odsáto kultivační medium, buňky byly promyty 3 ml PBS a následně byl přidán 1 ml roztoku trypsinu (0,5 g proteinu v 1 l) a EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina) pro uvolnění buněk ze dna misky. Po několika minutách byl stav buněk zkontrolován pod světelným mikroskopem a k buňkám byly přidány 4 ml příslušného média. Buňky byly přeneseny do zkumavky a zcentrifugovány při 1200 rpm, pokojové teplotě a po dobu 10 min. Supernatant byl poté odsát a pelet byl rozsuspendován v 5 ml čistého DMEM média. Pomocí přístroje CASY bylo stanoveno množství buněk v 1 ml. Buňky s médiem byly následně napipetovány do jamek mikrotitrační destičky, přičemž výsledný objem v každé jamce byl 80  $\mu\text{l}$  a koncentrace byla 5000 buněk/jamka pro linii HLF a 4000 buněk/jamka pro linii HUH7, 12000 buněk/jamka pro HepG2, 5000 buněk/jamka pro SNU449 a 5000 buněk/jamka pro MCF7 a K-562. Buňky v destičkách byly zkontrolovány pod světelným mikroskopem a destičky byly do druhého dne ponechány v inkubátoru.

#### **3. 2. 3. 2 Testování cytotoxicity**

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a byla vytvořena koncentrační řada osmi koncentrací. Buňky v mikrotitrační destičce byly ošetřeny sestupnou koncentrační řadou testovaných látek, začínající na koncentraci 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Všechny látky byly testovány v triplikátu a celé měření bylo třikrát nezávisle zopakováno.

Pro zjištění cytotoxicity byly použity MTT test (linie hepatocelulárního karcinomu) a resazurinový test (linie MCF7 a K-562). Po 72 hodinách od otravy buněk bylo do každé jamky přidáno 20  $\mu\text{l}$  MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) nebo 10  $\mu\text{l}$  resazurinu (4 mg v 16 ml 10% DMEM).

V případě MTT testu bylo po dalších 4 hodinách bylo z jamek médium s MTT do sucha odsáto a do jamek bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  DMSO pro rozpuštění vzniklých krystalů formazánu. Pro dokonalé rozpuštění byly destičky s buňkami umístěny na třepačku po

dobu 30 min. Po uplynutí této doby byla pomocí přístroje Tecan změřena absorbance při 570 nm. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny v programu Prism 8 (GraphPad Software, Kalifornie, USA), kde byly také spočítány hodnoty  $IC_{50}$ .

V případě resazurinového testu dochází v živých buňkách k redukci modrého resazurinu na růžový fluorescenční produkt resorufin (Niles *et al.*, 2008). Po 3 hodinách inkubace změřena fluorescence při excitaci 544 nm a emisi 590 nm na přístroji Tecan a hodnoty  $IC_{50}$  byly vyhodnoceny v programu Prism 8 (GraphPad Software, Kalifornie, USA).

### **3. 2. 4 Anthelmintická aktivita**

#### **3. 2. 4. 1 Věková synchronizace červů**

Populace *C. elegans*, která obsahovala větší množství množících se dospělců byla z udržovací misky smyta 2 ml M9 média a přenesena do mikroskopavek, které byly krátce zcentrifugovány (10 s). Následně bylo médium odebráno a suspenze s červy byla analogicky ještě dvakrát promyta M9, aby byly odstraněny zbytky bakterií, kterými jsou *C. elegans* krmeni na udržovacích miskách. Poté bylo médium odsáto a místo něj byl přidán roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans*. Mikroskopavky byly umístěny do termoshakeru při 1500 rpm a pokojové teplotě. Tento roztok rozpustí všechna vývojová stádia červů, kromě vajíček, která obsahují chitin a jsou po určitou dobu schopna snést roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans*. Po uplynutí 10 minut a viditelném rozpuštění červů, byly vzorky krátce centrifugovány na mikrocentrifuze, byl odebrán bělicí roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans* a vzniklé peletky vajíček byly třikrát promyty M9 médiem a jednou S-complete médiem. Po následném stočení na mikrocentrifuze byly peletky vajíček odebrány a přeneseny do 5 ml S-complete média v 15ml centrifugační zkumavce a umístěny přes noc na třepačku (150 rpm) v inkubátoru při 20 °C.

#### **3. 2. 4. 2 Hodnocení anthelmintické aktivity**

Množství čerstvě vylíhnutých larev *C. elegans* bylo spočítáno a byla určena jejich koncentrace v 1 ml. Roztok s larvami v S-complete médiu společně s bakteriemi (pěstovány v LB médiu, promyty a resuspendovány v S-complete na požadovanou koncentraci  $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (výsledná koncentrace bakterií v médiu s larvami:  $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) byl napipetován do 96jamkové destičky o koncentraci 15-30 červů na jamku. Látky byly testovány ve dvou koncentracích:  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , některé látky byly z důvodů tvorby krystalů při vyšších koncentracích testovány při  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Jako

pozitivní kontrola byl použit ivermectin (látka používaná v lidské i veterinární medicíně jako vysoce účinné anthelmintikum) o koncentracích  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a jako negativní pak DMSO (1 % a 0,1 %) o objemu stejném jako testované látky. Výsledný objem v všech jamkách byl 60  $\mu\text{l}$ . Pro zabránění vypařování média z desek, byly desky přelepeny folií a ponechány inkubovat na třepačce (150 rpm) při 20 °C po dobu 4 dní. Poté byly červi v jednotlivých jamkách vizuálně evaluováni pod světelným mikroskopem (mrtví, zastavení vývoje, zpomalení vývoje, méně potomstva, v pořádku).

Nakonec byl proveden samotný chitinázový test pro stanovení aktivity chitinázy. Do jamek bylo přidáno 1,5  $\mu\text{l}$   $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku 4-metylbelliferyl  $\beta$ -D-N, N', N''-triacetylchitotriosidu (substrátu pro chitinázu) a desky byly ponechány 1 hodinu inkubovat při 37 °C. Poté bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  pufru na chitinázový test a následná fluorescence byla změřena na přístroji Tecan (excitace 360 nm, emise 460 nm).

### **3. 2. 5 Protektivní účinky na *C. elegans* vůči oxidativnímu stresu**

Věková synchronizace červů byla provedena způsobem popsaným při testování anthelmintické aktivity.

Poté bylo spočítáno množství čerstvě vylíhnutých larev inkubovaných přes noc ve 20 °C. Do 24jamkové destičky byli červi napipetováni v množství cca 300 červů na jamku, bylo přidáno 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  bakterií a S-complete médium. Finální objem v každé jamce činil 500  $\mu\text{l}$  média s červy a bakteriemi. Látky byly testovány ve dvou koncentracích  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ve všech jamkách byl objem DMSO srovnán na stejné množství. Jako pozitivní kontrola byl použit kurkumin ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (látka s protektivními účinky na různých modelech schopna zvyšovat odolnost *C. elegans* vůči oxidativnímu stresu (Yu *et al.*, 2014)) a jako negativní kontrola DMSO ( $0,5 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Takto nachystaná destička byla inkubována za stálého třepání ve 20 °C.

Po třech dnech inkubace, bylo 450  $\mu\text{l}$  z každé jamky odebráno a přeneseno do mikrozkuvek a do každé byl přidán 1 ml M9. Poté, co byly peletky usazeny, bylo médium odebráno a stejným způsobem bylo promytí ještě dvakrát zopakováno. Na závěr bylo k peletce ve 100  $\mu\text{l}$  přidáno 400  $\mu\text{l}$  M9 s přídatkem 0,01% tritonu a 450  $\mu\text{l}$  této suspenze bylo přeneseno do jamek ve hluboké 96jamkové desce. Odtud byla suspenze rozpipetována po 50  $\mu\text{l}$  do 96jamkové desky, přičemž každá podmínka byla testována v kvadruplikátu.

Pro měření oxidativního stresu byla v desce nejprve po dobu 30 minut změřena iniciální pohyblivost červů na přístroji wMicroTracker. Poté bylo do každé jamky přidáno

50  $\mu\text{l}$  juglonu o celkové výsledné koncentraci  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Deska byla následně umístěna do wMicroTrackeru a pohyblivost červů byla měřena při teplotě  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 4 hodin.

### **3. 2. 6 Cytokininové biotesty**

Pro zjištění cytokininové aktivity připravených látek byly provedeny cytokininové biotesty. Jedná se o kalusový, senescenční a *Amaranthový* biotest. Výsledky biotestů jsou vztahovány k BAP, jehož relativní aktivita ve všech je 100 %. Tyto biotesty byly navrženy Holubem *et al.* (1998) a byly provedeny způsobem popsáním v práci Slamencová (2018).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Analýza připravených látek

#### 4.1.1 ŠS10

Výtěžek (teoretický/reálný): 218 mg/148 mg (67,8 %)

HPLC čistota: 98+ % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{19}H_{23}N_5O_6$

Mr: 417,4

MS (ESI+, m/z): 418

Bod tání: 224,8 °C – 228,5 °C

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.87 (t,  $J = 7$  Hz, 2H), 3.49-3.86 (m, 7H), 3.95 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 4.13 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 4.60 (q,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.20 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.38-5.52 (m, 2H), 5.87 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 6.61-6.86 (m, 3H), 7.90 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.60 (bs, 1H)

#### 4.1.2 ŠS11

Výtěžek (teoretický/reálný): 225 mg/75 mg (33,2 %)

HPLC čistota: 100 % (nažloutlá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{18}H_{21}N_5O_5$

Mr: 387,4

MS (ESI+, m/z): 388

Bod tání: 239,6 °C – 242,5 °C

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.86 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.48-3.75 (m, 4H), 3.95 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 4.08-4.17 (m, 1H), 4.60 (q,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.19 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.39-5.50 (m, 2H), 5.87 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 6.69 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.96-7.20 (m, 2H), 7.90 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 9.45 (s, 1H)

#### 4.1.3 ŠS13

Výtěžek (teoretický/reálný): 388 mg/118 mg (30,4 %)

HPLC čistota: 100 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{21}H_{27}N_5O_6$

Mr: 445,5

MS (ESI+, m/z): 446

Bod tání: 145,1 °C – 145,6 °C

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.26-1.38 (m, 6H), 3.50-3.69 (m, 2H), 3.93-4.16 (m, 6H), 4.53-4.80 (m, 3H), 5.20 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.39 (t,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.46

(d,  $J = 6$  Hz, 1H), 5.88 (d,  $J = 6$  Hz, 1H), 6.75 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 6.83-6.92 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.38 (s, 1H)

#### 4.1.4 ŠS14

Výtěžek (teoretický/reálný): 316 mg/47 mg (14,9 %)

HPLC čistota: 100 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{20}H_{25}N_5O_6$

Mr: 431,4

MS (ESI+, m/z): 432

Bod tání: 76,8 °C – 80,1 °C

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.19-1.35 (m, 7H), 3.48-3.59 (m, 1H), 3.61-3.69 (m, 1H), 3.95(d,  $J = 3$  Hz, 1H), 4.13 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 4.43-4.67 (m, 4H), 5.20 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.36 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 5.46 (d,  $J = 6$  Hz, 1H), 5.88 (d,  $J = 6$  Hz, 1H), 6.60-6.74 (m, 2H), 6.82 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 8.18-8.41 (2H), 9.02 (s, 1H)

#### 4.1.5 ŠS16

Výtěžek (teoretický/reálný): 278 mg/40 mg (14,4 %)

HPLC čistota: 100 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{18}FN_5O_4$

Mr: 375,4

MS (ESI+, m/z): 376

Bod tání: 112,4 °C – 114,8 °C

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3.52-3.60 (m, 1H), 3.70-3.77 (m, 1H), 3.95-3.99 (m, 1H), 4.44-4.65 (m, 2H), 5.24 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 5.37 (t,  $J = 4$  Hz, 1H), 5.48 (t,  $J = 3$  Hz, 1H), 5.73 (d,  $J = 6$  Hz, 1H), 6.24 (m, 1H), 6.69 (t,  $J = 7$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.00-7.11 (m, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 9.87 (s, 1H)

#### 4.1.6 ŠS17

Výtěžek (teoretický/reálný): 300 mg/64 mg (21,3 %)

HPLC čistota: 100 % (bílá krystalická látka)

Sumární vzorec:  $C_{18}H_{20}FN_5O_5$

Mr: 405,4

MS (ESI+, m/z): 406

Bod tání: 118,5 °C – 121,4 °C

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3.52-3.62 (m, 1H), 3.67-3.83 (m, 4H), 3.97 (t,  $J = 3$  Hz, 1H), 4.44-4.63 (m, 2H), 5.24 (t,  $J = 5$  Hz, 1H), 5.37 (t,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 5.48 (t,



$J = 3$  Hz, 1H), 5.73 (d,  $J = 6$  Hz, 1H), 6.24 (m, 1H), 6.63-6.75 (m, 2H), 6.82 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 9.29 (s, 1H)

## 4.2 Body tání

Tab. 3: Hodnoty bodů tání jednotlivých látek

Látka	Bod tání
ŠS10	224,8 °C – 228,5 °C
ŠS11	239,6 °C – 242,5 °C
ŠS13	145,1 °C – 145,6 °C
ŠS14	76,8 °C – 80,1 °C
ŠS16	112,4 °C – 114,8 °C
ŠS17	118,5 °C – 121,4 °C

## 4.3 Cytotoxicita na nádorových liniích

Tab. 4: Hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých látek na nádorových buněčných liniích. Buněčná linie chronické myeloidní leukemie K-562, rakoviny prsu MCF7 a linie hepatocelulárního karcinomu – HLF, HUH7, HepG2, SNU449. Veškerá měření byla opakována třikrát. Hodnoty  $IC_{50}$  u látek ŠS1-ŠS6 pro nádorové linie K-562 a MCF7 a nenádorové ARPE-19 (buňky lidské sítnice), HaCaT (lidské keratinocyty) a BJ (lidské fibroblasty) byly publikovány již v práci Slamencová (2018).

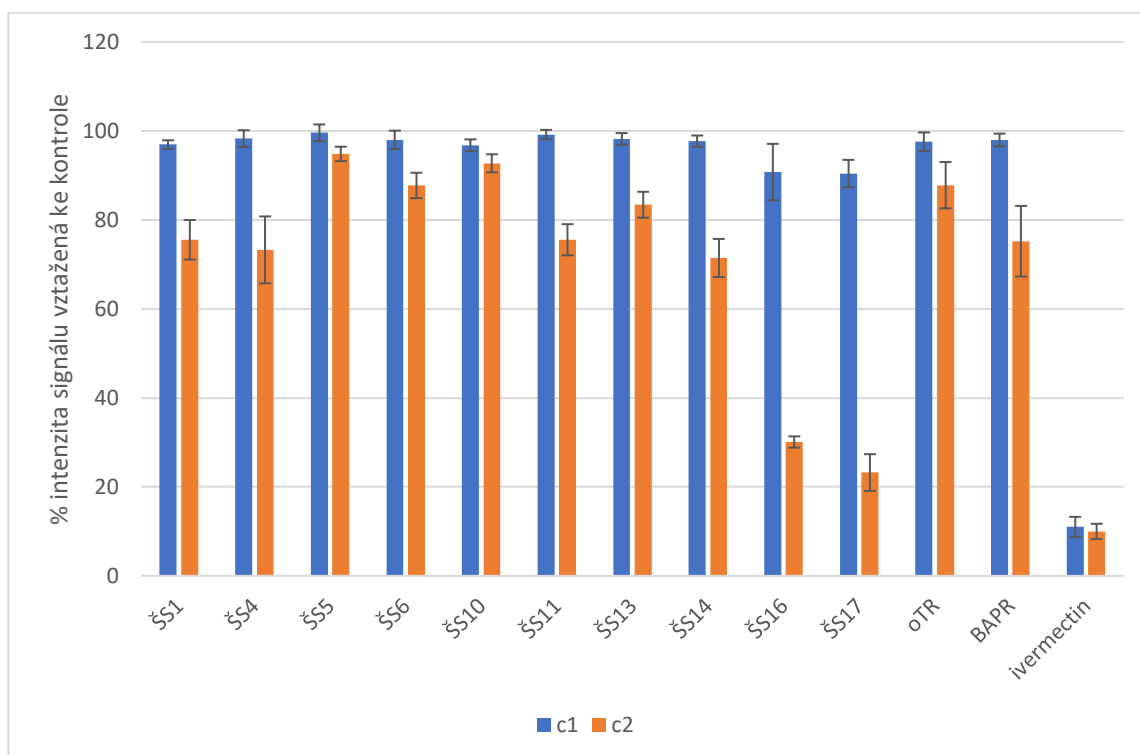
Látka	Buněčná linie/ $IC_{50}$ ( $\mu$ mol/l)								
	ARPE-19	HaCaT	BJ	K-562	MCF7	HLF	HUH7	HepG2	SNU449
ŠS1	>100	12,2	0,2	5,0	25,8	6,08	21,97	21,34	6,00
ŠS4	>100	>50	7,3	>100	19,6	nt	nt	nt	nt
ŠS5	>100	6,1	0,32	4,8	34,7	2,02	10,19	6,054	5,02
ŠS6	>100	18,6	0,52	7,5	34,0	7,69	28,36	20,29	20,09
ŠS10	nt	nt	nt	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ŠS11	nt	nt	nt	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ŠS13	nt	nt	nt	>100	>100	nt	nt	nt	nt
ŠS14	nt	nt	nt	>100	>100	nt	nt	nt	nt
ŠS16	nt	nt	nt	>100	>100	nt	nt	nt	nt
ŠS17	nt	nt	nt	>100	>100	nt	nt	nt	nt

nt – netestováno

Z látek připravených v této diplomové práci (ŠS10-ŠS17) ani jedna nevykazuje cytotoxicitu vůči nádorovým liniím rakoviny prsu (MCF7) a chronické myeloidní leukemie (K-562) (Tab. 5), látky ŠS10 a ŠS11 byly otestovány i na liniích hepatocelulárního karcinomu (HLF, HUH7, HepG2, SNU449), ale ani zde nebyla prokázána jejich cytotoxicita. Předpokládá se, že ani zbylé látky nejsou toxické pro linie hepatocelulárního karcinomu, ovšem z časových důvodů nebylo možné toto ověřit.

Látky z bakalářské práce, vykazující na nádorových liniích K-562 a MCF7 (bohužel i na nenádorových liniích) značnou cytotoxicitu, byly testovány i na liniích hepatocelulárního karcinomu. Nejtoxičtěji působí látka ŠS5, jejíž hodnota  $IC_{50}$  pro linie HLF je  $2,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro SNU449  $5,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

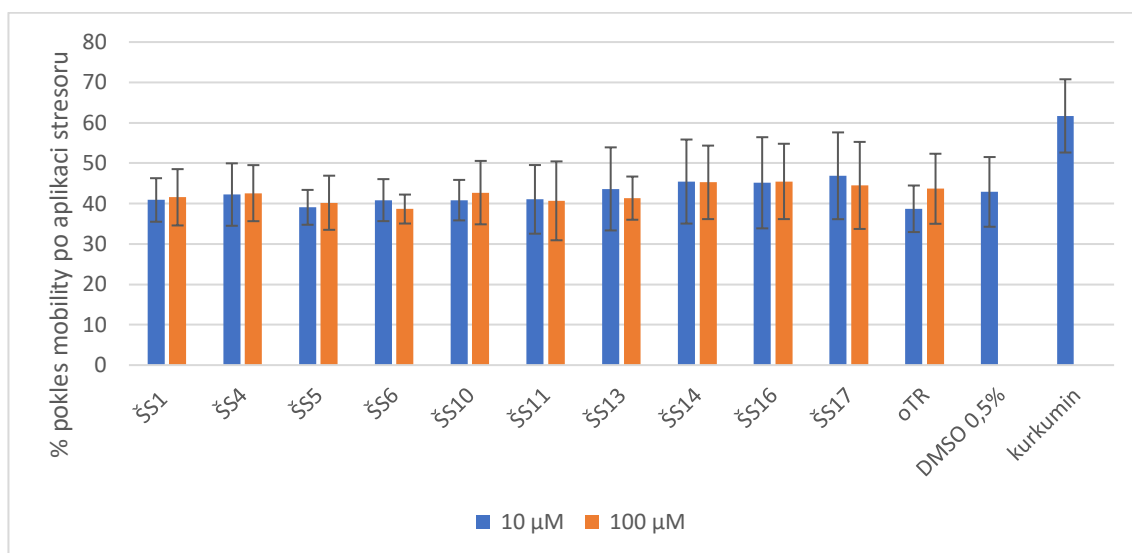
#### 4.4 Anthelmintická aktivita



Graf 1: Chitinázová aktivita v *C. elegans* vyjádřená procentuální intenzitou signálu vztaženou k negativní kontrole (DMSO 100 %) po aplikaci připravených látek ve dvou různých koncentracích: c1 odpovídá  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro látky ŠS1, ŠS4, ŠS6, ŠS11, ŠS13, ŠS14, ŠS16 a ŠS17,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro látky ŠS5 a ŠS10 a  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro ivermectin a koncentrace c2 odpovídá  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro látky ŠS1, ŠS4, ŠS6, ŠS11, ŠS13, ŠS14, ŠS16 a ŠS17,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro látky ŠS5 a ŠS10 a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro ivermectin. Jednotlivé hodnoty značí průměr z pěti opakování a chybové úsečky ukazují střední chybu průměru (SEM).

Většina látek byla testována v koncentracích  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , látky ŠS5 a ŠS10 byly testované při nižších koncentracích:  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , z důvodu tvorby krystalů v médiu. Při nižší testované koncentraci byl pozorován mírný pokles chitinázové aktivity jen u látek ŠS16 a ŠS17, ovšem u žádné z látek nedochází k poklesu chitinázové aktivity z důvodu akutní, reprodukční či vývojové toxicity vůči červům (jedná se pouze o snížení reprodukční kapacity). I přesto, že koncentrace  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  se zdá být všeobecně mírně toxická u všech látek (nejvíce pak u látek ŠS16 a ŠS17), dochází spíše jen ke zpomalení vývoje červů. Ani vizuální hodnocení v mikroskopu neodhalilo výrazný toxický efekt, pouze mírné snížení produkce potomstva.

## 4.5 Protektivní aktivita na *C. elegans*



Graf 2: Protektivní aktivita látek na jedince *C. elegans* ovlivněných oxidativním stresem vyjádřená jako procentuální pokles mobility po aplikaci stresoru po aplikaci připravených látek v různých koncentracích ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jako negativní kontrola bylo použito DMSO a pozitivní kurkumin. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří opakování experimentů a chybové úsečky značí střední chybu průměru (SEM).

U jedinců *C. elegans* byl navozen oxidativní stres přidavkem juglonu (výsledná koncentrace v médiu:  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Látky byly testovány ve dvou koncentracích  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , avšak žádná z testovaných látek nebyla schopna konzistentně zvýšit ani snížit přežití jedinců *C. elegans* o více než 5 %, což by naznačovalo možné protektivní účinky testovaných látek. Vzhledem k faktu, že jednotlivá měření vykazují poměrně velký rozptyl (relativně velké chybové úsečky), bylo by vhodné experimenty ještě vícekrát zopakovat, což již nebylo z časových důvodů možné.

## 4.6 Cytokininové biotesty

Tab. 5: Relativní aktivity připravených látek v cytokininových biotestech. Optimální koncentrace látek byly porovnány s aktivitou benzylaminopurinu (BAP), kde 100 % znamená  $10^{-5}$  M v *Amarantovém* biotestu,  $10^{-4}$  M v senescenčním a  $10^{-5}$  M v kalusovém biotestu.

Látka	<i>Amarantový biotest</i>		Senescenční biotest		Kalusový biotest	
	Optimální koncentrace (mol/L)	Relativní aktivita (%)	Optimální koncentrace (mol/L)	Relativní aktivita (%)	Optimální koncentrace (mol/L)	Relativní aktivita (%)
ŠS10	$10^{-4}$	18 ( $\pm 4$ )	$10^{-5}$	0	$10^{-4}$	26 ( $\pm 4$ )
ŠS11	$10^{-4}$	83 ( $\pm 7$ )	$10^{-6}$	17 ( $\pm 1$ )	$10^{-5}$	67 ( $\pm 6$ )
ŠS13	$10^{-4}$	8 ( $\pm 1$ )	$10^{-7}$	38 ( $\pm 4$ )	$10^{-9}$	29 ( $\pm 5$ )
ŠS14	$10^{-4}$	3 ( $\pm 1$ )	$10^{-5}$	31 ( $\pm 2$ )	$10^{-4}$	33 ( $\pm 3$ )
ŠS16		nt	$10^{-7}$	4 ( $\pm 1$ )	$10^{-6}$	0
ŠS17		nt	$10^{-5}$	0	$10^{-7}$	24 ( $\pm 3$ )

nt – netestováno

Žádná z látek nedosahuje v testovaných cytokininových biotestech aktivity převyšující hodnotu BAP, pouze látka ŠS11 dosahuje relativně vysoké aktivity zejména v *Amarantovém* biotestu. Látky ŠS16 a ŠS17 nebyly z časových důvodů vlivem nastalé mimořádné situace prozatím v *Amarantovém* biotestu testovány vůbec.

## 5 DISKUZE

Celkem šest nových N<sup>6</sup>-substituovaných derivátů adenosinu bylo připraveno modifikacemi původně popsaných metod. Látky ŠS10, ŠS11, ŠS13 a ŠS14 vycházely z původního schématu syntézy popsané Fleysherem (1972), kde byly látky připravovány nukleofilní substitucí 6-chlorpurin ribosidu s příslušným aminem v absolutním etanolu a za přítomnosti triethylaminu, v některých případech zde byl TEA nahrazen CaCO<sub>3</sub>. Reakční směs byla v tomto případě vždy míchána pod zpětným chladičem a reakční doba se pohybovala mezi 4 až 20 hodinami. Stejně reakční schéma používali pro syntézu N<sup>6</sup>-substituovaných adenosinů i Aronov *et al.* (1998), v obou případech se výtěžky reakcí pohybovaly mezi 80 a 100 %. Do současné podoby bylo reakční schéma syntézy derivátů aromatických cytokininů modifikováno Tarkowskou *et al.* (2003), kde došlo k nahrazení ethanolu za butanol a stanovení jednotných podmínek reakce, tj. zahřívání na 90 °C po dobu 4 hodin. Wan *et al.* (2005) popsal jedнокrokovou syntézu derivátů N<sup>6</sup>-benzyladenosinu reakcí inosinu s příslušným benzylaminem za účasti BOP, DIPEA a DMF, výtěžky zde se pohybují mezi 65 – 99 %. Na základě těchto výsledků byla tato metoda lehce modifikována, inosin byl nahrazen 2-fluoro-2-deoxyinosinem a takto byly připraveny látky ŠS16 a ŠS17. Látky byly získány s výtěžky mezi 15 % a 68 % (reakce podle Tarkowské *et al.* (2003) a mezi 14 – 21 % (upravená metoda dle Wana *et al.* (2005)). V případě optimalizace syntéz by bylo jistě možné dosáhnout vyšších výtěžků, alespoň takových, jakých dosahovali autoři zmiňovaných publikací, avšak optimalizace podmínek nebyla primárním cílem této práce.

Voller *et al.* (2010, 2017) zjistili slibnou protinádorovou aktivitu u látek *o*TR a 2OH3MeOBAPR, na základě jejich zjištění byly v práci Slamencová (2018) připraveny čtyři nové deriváty odvozené *o*TR. Tyto látky působily významně vůči testovaným nádorovým liniím (IC<sub>50</sub> mezi 4–35 μmol·l<sup>-1</sup>), naneštěstí podobných hodnot bylo dosahováno i na nenádorových buněčných liniích. V návaznosti na tyto poznatky byly syntetizovány nové deriváty látek vycházející ze struktury 2OH3MeOBAPR s cílem najít látku vykazující podobný mechanismus účinku. Tato látka se odlišuje od ostatních cytokininů způsobem indukujícím apoptózu v nádorových buňkách a zároveň je považována za jeden z nejaktivnějších cytokininových ribosidů (medián GI<sub>50</sub> na panelu NCI-60 je < 0,2 μmol·l<sup>-1</sup>) (Voller *et al.*, 2017). Žádná z nově připravených látek ovšem nevykazuje jakoukoli cytotoxickou aktivitu vůči testovaným nádorovým liniím, bylo tedy

potvrzeno tvrzení Vollera *et al.* (2017), že i drobná změna v chemické struktuře látek může vést k výrazné změně aktivity.

U nukleosidů obsahujících atom fluoru bylo zjištěno několik významných vlastností. Zavedení atomu fluoru buď do cukerného kruhu nebo do samotné báze může mít zásadní vliv na biologické vlastnosti této látky. U některých 2'-deoxy-2'-fluorovaných nukleosidů byl objeven terapeutický potenciál pro jejich antivirální a protinádorové účinky (Meng a Qing, 2006). Wohlrab *et al.* (1985) prokázali cytostatickou aktivitu vůči herpes simplex viru (HSV) u látky 2'-deoxy-2'-fluorocytidinu interakcí s virální thimidin kinasou. Dále bylo zjištěno, že pro antivirální funkci je důležitý právě substituent na pozici 2' cukerného kruhu, protože právě zde dochází k rozlišení mezi DNA a RNA. U samotných purinových 2'-deoxy-2'-fluorovaných ribosidů byla prokázána i aktivita proti HIV-1 (Maruyama *et al.*, 1994), proti viru chřipky (Tuttle *et al.*, 1993) či cytotoxicita na leukemických buňkách (Thomas *et al.*, 1994). Z těchto důvodů byly připraveny látky ŠS16 a ŠS17, které mají právě v poloze 2' ribosy vázaný atom fluoru. Ani jedna z těchto látek ale nevykazuje jakoukoli cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím. Bylo by ale zajímavé provést v budoucnu u těchto látek rovněž testování případné antivirální aktivity.

Kadlecová *et al.* (2018) zjistili, že některé cytokininy (K, pT, mT) jsou schopné prodlužovat délku života *C. elegans* nebo dokonce tyto jedince chránit před oxidativním či teplotním stresem. Látky připravené v této práci byly proto testované na jejich protektivní účinky vůči oxidativnímu stresu a zároveň byla otestována i jejich možná anthelmintická aktivita. U žádné z testovaných látek ale nebyla prokázána výrazná aktivita ať již v jednom nebo druhém experimentu. Experiment měřící protektivitu vůči oxidativnímu stresu vykazoval poměrně velké odchylky mezi jednotlivými měřeními, to může být způsobeno jak biologickou variabilitou v rámci populací *C. elegans*, tak i částečně nedokonalostmi v technickém zpracování experimentů. Ideální by bylo jednotlivá měření ještě několikrát zopakovat, to ale bohužel z časových důvodů vlivem nastalé mimořádné situace již nebylo možné.

Při testování cytokininové aktivity nebyla u žádné z testovaných látek zjištěna aktivita převyšující hodnoty BAP. Značnou aktivitu si zachovává pouze látka ŠS11 v *Amaranthovém* biotestu a v o něco menší míře i v kalusovém biotestu. Dle Holuba *et al.* (1998) snižuje *orto*-hydroxylace na benzenovém jádře aktivitu těchto látek zejména v kalusovém a senescenčním biotestu. Vzhledem k tomu, že všechny připravené látky jsou deriváty *o*TR, získané výsledky jsou v souladu s daným tvrzením. Na druhou stranu

je potřeba říci, že v porovnání se samotným *o*TR jsou testované látky v biotestech aktivnější. Jistě by bylo zajímavé porovnat tuto aktivitu se stejnými látkami ovšem majícími hydroxy- skupinu v poloze *meta* benzenového jádra (tedy s deriváty *m*TR).



## 6 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce byla syntéza BAPR derivátů a následné ověření jejich biologické aktivity. V rámci práce bylo syntetizováno šest nových derivátů s cílenou změnou substituentu na benzenovém jádře. Chemická syntéza všech připravených derivátů vycházela buď z 6-chlorpurin ribosidu, případně 2-fluoro-2-deoxyinosinu, jakožto výchozích reaktantů, dle uvedeného schématu (kapitola 3.2.1). Jejich následnou purifikací bylo dosaženo chromatografické čistoty vyšší než 97 %, která je nezbytná pro biologické testování. Všechny deriváty byly charakterizovány pomocí vybraných fyzikálně-chemických metod pro ověření jejich chemické struktury.

V rámci studia biologické aktivity byly otestovány jejich cytotoxické vlastnosti vůči nádorovým buněčným liniím, dále pak byl zjišťován jejich vliv na jedince *C. elegans* a nakonec hodnocena jejich cytokininová aktivita.

Žádný z připravených derivátů nevykazoval cytotoxicitu na nádorových buněčných liniích a ani jejich toxicita vůči jedincům *C. elegans* nebyla prokázána – jistý pokles reprodukční kapacity jedinců *C. elegans* při nejvyšší testované koncentraci látek byl pravděpodobně způsoben spíše obecnou toxicitou této koncentrace. Taktéž se neprojevíly žádné protektivní účinky před oxidativním stresem aplikovaným na jedince *C. elegans*. V klasických cytokininových biotestech nedosahuje žádná z látek aktivity srovnatelné s aktivitou BAP, jenž byl použit jako pozitivní kontrola.

## 7 LITERATURA

- Allen M., Qin W., Moreau F., Moffatt B. (2002): Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum* **115**, 56-68.
- Amiable C., Pochet S., Padilla A., Labesse G., Kaminski P. A. (2013): N<sup>6</sup>-substituted AMPs inhibit mammalian deoxynucleotide N-hydrolase DNPH1. *PLoS ONE* **8**, 1-11.
- Aremu A. O., Bairu M. W., Doležal K., Finnie J. F., Van Staden J. (2012): Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges?. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **108**, 1-16.
- Aronov A. M., Verlinde Ch. L. M. J., Hol W. G. J., Gelb M. H. (1998): Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **41**, 4790-4799.
- Bajguz A., Piotrowska, A. (2009): Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.
- Barciszewski J., Mielcarek M., Stobiecki M., Siboska G., Clark B. F. C. (2000): Identification of 6-furfuryladenine (kinetin) in human urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 69-73.
- Blagoeva E., Dobrev P. I., Malbeck J., Motyka V., Strnad M., Hanuš J., Vaňková R. (2004): Cytokinin N-glucosylation inhibitors suppress deactivation of exogenous cytokinins in radish, but their effect on active endogenous cytokinins is counteracted by other regulatory mechanisms. *Physiologia Plantarum* **121**, 215-222.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a  $\beta$ -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Cabello C. M., Bair W. B., Ley S., Lamore S. D., Azimian S. Wondrak G. T. (2009): The experimental chemotherapeutic N<sup>6</sup>-furfuryladenine (kinetin-riboside) induces rapid ATP depletion, genotoxic stress and CDKN1A (p21) upregulation in human cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology* **77**, 1125-1138.
- Chen C., Kristopeit S. M. (1981): Metabolism of cytokinin – Dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat-germ cytosol. *Plant Physiology* **67**, 494-498.
- Cheong J., Goh D., Yong J. W. H., Tan S. N., Ong E. S. (2009): Inhibitory effect of kinetin riboside in human hepatoma, HepG2. *Molecular BioSystems* **5**, 91-98.
- Cowley D. E., Duke C. C., Liepa A. J., MacLeod J. K., Letham D. S. (1978): The Structure and Synthesis of Cytokinin Metabolites. I The 7- and 9- $\beta$ -D-Glucofuranosides and Pyranosides of Zeatin and 6-Benzylaminopurine. *Australian Journal of Chemistry* **31**, 1095-1111.
- Davies P. J. (2010): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. 3rd ed., Springer, Dordrecht, Netherlands, 802 stran.
- Doležal K., Popa I., Kryštof V., Spíchal L., Fojtíková M., Holub J., Lenobel R., Schmülling T., Strnad M. (2006): Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **14**, 875-884.
- Doležal K., Popa I., Hauserová E., Spíchal L., Chakrabarty K., Novák O., Kryštof V., Voller J., Holub J., Strnad, M. (2007): Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N<sup>6</sup>-benzyladenosines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **15**, 3737-3747.
- Entsch B., Parker Ch. W., Letham D. S., Summons R. E. (1979): Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochimica et Biophysica Acta* **570**, 124-139.
- Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983): An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375-381.
- Ernst D., Schäfer W., Oesterhelt D. (1983): Isolation and identification of a new, naturally occurring cytokinin (6-benzylaminopurineriboside) from an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta* **159**, 222-225.
- Feng J., Shi Y., Yang S., Zuo J. (2017): Cytokinins In: *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. (Li J., Li Ch., Smith S. M. eds.), Academic Press, London, UK, 77-106.

- Fleysher M. H., Bloch A., Hakala M. T., Nichol C. A. (1969): Synthesis and biological activity of some new N<sup>6</sup>-substituted purine nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry* **12**, 1056-1061.
- Fleysher M. H. (1972): N<sup>6</sup>-substituted adenosines: synthesis, biological activity, and some structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **15**, 187-191.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L.. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255-267.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Studies in Natural Products Chemistry* **34**, 203-264.
- Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., Ong E. S. (2005): Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **829**, 26-34.
- Großkinsky D. K., Edelsbrunner K., Pfeifhofer H., van der Graff E., Roitsch T. (2013): Cis- and trans-zeatin differentially modulate plant immunity. *Plant Signaling & Behavior* **8**, 1-4.
- Hall R. H. (1970): N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenosine: Chemical Reactions, Biosynthesis, Metabolism, and Significance to the Structure and Function of tRNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **10**, 57-86.
- Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 408-412.
- Hertz N. T., Berthet A., Sos M. L., Thorn K. S., Burlingame A. L., Nakamura K., Shokat K. M. (2013): A neo-substrate that amplifies catalytic activity of Parkinson's-disease-related kinase PINK1. *Cell* **154**, 737-747.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *Ortho*- and *Meta*-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.
- Hönig M., Plíhalová L., Spíchal L., Grúz J., Kadlecová A., Voller J., Rajnochová Svobodová A., Vostálová J., Ulrichová J., Doležal K., Strand M. (2018): New cytokinin derivatives possess UVA and UVB photoprotective effect on human skin cells and prevent oxidative stress. *European Journal of Medicinal Chemistry* **150**, 946-957.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J., Wareing P. F. (1975): A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.
- Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004): N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822-47832.
- Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y. (2002): Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell growth & Differentiation* **13**, 19-26.
- Kadlecová A., Jirsa T., Novák O., Kammenga J., Strnad M., Voller J. (2018): Natural plant hormones cytokinins increase stress resistance and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* **19**, 109-120.
- Kadlecová A., Maková B, Artal-Sanz M., Strnad M., Voller J. (2019): The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. *Ageing Research Reviews* **55**, 100958.
- Kamínek M., Vaněk T., Motyka V. (1987): Cytokinin activities of N<sup>6</sup>-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation* **6**, 113-120.
- Keshishian E. A., Rashotte A. M. (2015): Plant cytokinin signalling. *Essays in Biochemistry* **58**, 13-27.
- Klener P., Klener P. (2013): *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vyd., Grada, Praha, Česká republika, 208 stran.

- Kristoffersen P., Brzobohatý B., Höhfeld I., Bako L., Melkonian M., Palme K. (2000): Developmental regulation of the maize *Zm-p60.1* gene encoding a  $\beta$ -glucosidase located to plastids. *Planta* **210**, 407-415.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Letham D., Summons R. E., Entsch B., Gollnow B., Parker Ch. W., MacLeod J. K. (1978): Glucosylation of cytokinin analogues. *Phytochemistry* **17**, 2053-2057.
- Letham D. S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569-573.
- Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E., Mok D. W. S. (2001): A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5922-5926.
- Maruyama T., Utzumi K., Sato Y., Richman D. D. (1994): Synthesis and anti-HIV activity of 6-substituted purine 2'-deoxy-2'-fluororibosides. *Nucleosides & Nucleotides* **13**, 527-537.
- Meng W.-D., Qing F.-L. (2006): Fluorinated nucleosides as antiviral and antitumor agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **6**, 1499-1528.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M. *et al.* (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392.
- Miller C. O. (1961): A kinetin-like compound in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **47**, 170-174.
- Mittelman A., Evans J. T., Chheda G. B. (1975): Cytokinins as chemotherapeutic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* **255**, 225-234.
- Mlejnek P. (2001): Caspase inhibition and N<sup>6</sup>-benzyladenosine-induced apoptosis in HL-60 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **83**, 678-689.
- Mlejnek P., Doležel P. (2005): Apoptosis induced by N<sup>6</sup>-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* **19**, 985-990.
- Mlejnek P., Doležel P., Procházka S. (2003): Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant, Cell and Environment* **26**, 1723-1735.
- Mlejnek P., Doležel P., Procházka S. (2005): Intracellular conversion of cytokinin bases into corresponding mononucleotides is related to cell death induction in tobacco BY-2 cells. *Plant Science* **168**, 389-395.
- Mlejnek P., Kuglík P. (2000): Induction of apoptosis in HL-60 cells by N<sup>6</sup>-benzyladenosine. *Journal of Cellular Biochemistry* **77**, 6-17.
- Mlejnek P., Procházka S. (2002): Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* **215**, 158-166.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001): Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Mok M. C., Martin R. C., Dobrev P. I., Vanková R., Ho P. S., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D. W. S. (2005): Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin o-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant physiology* **137**, 1057-1066.
- Niles A. L., Moravec R. A., Riss T. L. (2008): Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery* **3**, 655-669.
- Othman E. M., Naseem M., Awad E., Dandekar T., Stopper H. (2016): The plant hormone cytokinin confers protection against oxidative stress in mammalian cells. *PLoS ONE* **11**, 1-14.
- Parker C. W., Entsch B., Letham D. S. (1986): Inhibitors of two enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochemistry* **25**, 303-310.
- Rajabi M., Gorincioi E., Santaniello E. (2012): Antiproliferative activity of kinetin riboside on HCT-15 colon cancer cell line. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **31**, 474-481.
- Raman N., Elumalai S. (1996): Presence of cytokinin in the root nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Indian Journal of Experimental Biology* **34**, 577-579.

- Rattan S. I. S. (2008): Principles and practice of hormetic treatment of aging and age-related diseases. *Human & Experimental Toxicology* **27**, 151-154.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.
- Schmitz R. Y., Skoog F., Playtis A. J., Leonard N. J. (1972): Cytokinins: Synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology* **50**, 702-705.
- Schnorr K. M., Gaillard C., Biget E., Nygaard P, Laloue M. (1996): A second form of adenine phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* with relative specificity towards cytokinins. *The Plant Journal* **9**, 891-898.
- Seegobin M., Kisiala A., Noble A., Kaplan D., Brunetti C., Emery R. J. N. (2018): *Canis familiaris* tissues are characterized by different profiles of cytokinins typical of the tRNA degradation pathway. *FASEB Journal* **32**, 6575-6581.
- Shantz E. M., Steward F. C. (1955): The identification of compound a from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 6351-6353.
- Silva-Navas J., Conesa C. M., Saez A., Navarro-Neila S., Garcia-Mina J. M., Zamarreño A. M., Baigorri R., Swarup R., del Pozo J. C. (2019): Role of *cis*-zeatin in root responses to phosphate starvation. *New Phytologist* **224**, 242-257.
- Slamencová Š. (2018): *Příprava a biologická aktivita nových purinových derivátů s protinádorovým účinkem*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmölling T. (2004): Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299-1305.
- Srivastava L. M. (2002): Cytokinins. In: *Plant growth and development: Hormones and the environment*. Academic Press, San Diego, California, USA, 191-204.
- Stiernagle T. (2006): *Maintenance of C. elegans*, *WormBook - The online review of C. elegans biology*. doi: 10.1895/wormbook.1.101.1.
- Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. (1992): Immunodetection and identification of N<sup>6</sup>-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in *Populus × canadensis* Moench cv *Robusta* leaves. *Plant Physiology* **99**, 74-80.
- Strnad M., Hanuš J., Vaněk T., Kamínek M., Ballantine J. A., Fussell B., Hanke D. E. (1997): *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* **45**, 213-218.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant physiology*. 5th ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 781 stran.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* **117**, 579-590.
- Thomas J. H., Tiwari K. N., Clayton S. J., Secrist J. A., Montgomery J. A. (1994): Synthesis and biologic activity of purine 2'-deoxy-2'-fluoro-ribonucleosides. *Nucleosides & Nucleotides* **13**, 309-323.
- Tuttle J. V., Tisdale M., Kretnitsky T. A. (1993): Purine 2'-deoxy-2'-fluororibosides as antiinfluenza virus agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 119-125.
- Vazquez A., Bond E. E., Levine A. J., Bond G. L. (2008): The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 979-987.
- Veach Y. K., Martin R. C., Mok D. W. S., Malbeck J., Vankova R., Mok M. C. (2003): O-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374-1380.
- Veselý J., Havlíček L, Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. (1994): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry* **224**, 771-786.

- Voller J., Zatloukal M., Lenobel R., Doležal K., Béres T., Kryštof V., Spíchal L., Niemann P., Džubák P., Hajdúch M., Strnad M. (2010): Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study. *Phytochemistry* **71**, 1350-1359.
- Voller J., Béres T., Zatloukal M., Kaminski P. A., Niemann P., Doležal K., Džubák P., Hajdúch M., Strnad M. (2017): The natural cytokinin 2OH3MeOBAR induces cell death by a mechanism that is different from that of the “classical” cytokinin ribosides. *Phytochemistry* **136**, 156-164.
- Voller J., Béres T., Zatloukal M., Džubák P., Hajdúch M., Doležal K., Schmölling T., Strnad M. (2019): Anti-cancer activities of cytokinin ribosides. *Phytochemistry Reviews* **18**, 1101-1113.
- Wan Z. K., Binnun E., Wilson D. P., Lee J. (2005): A highly facile and efficient one-step synthesis of N<sup>6</sup>-adenosine and N<sup>6</sup>-2'-deoxyadenosine derivatives. *Organic Letters* **7**, 5877-5880.
- Wang J., Ma X.-M., Kojima M., Sakakibara H., Hou B.-K. (2011): N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 2200-2213.
- Wang J., Ma X.-M., Kojima M., Sakakibara H., Hou B.-K. (2013): Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **65**, 9-16.
- Wang L., Yu D. L., Zhang H. W., He L. Y., Wu L. (2016): *Ortho*-topolin riboside induces apoptosis in Acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Molecular and Cellular Toxicology* **12**, 159-166.
- Wohlrab F., Jamieson A. T., Hay J., Mengel R., Guschlbauer W. (1985): The effect of 2'-fluoro-2'-deoxycytidine on herpes virus growth. *Biochimica et Biophysica Acta* **824**, 233-242.
- Yu C.-W., Wei C.-C., Liao V. H.-C. (2014): Curcumin-mediated oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age-1*, *akt-1*, *pdk-1*, *osr-1*, *unc-43*, *sek-1*, *skn-1*, *sir-2.1* and *mev-1*. *Free Radical Research* **48**, 371-379.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 2-OH-3-Me-BAPR – 2-hydroxy-3-methoxybenzylaminopurin ribosid  
2OH3MeOBAPR – 2-hydroxy-3-metylbenzylaminopurin ribosid  
4-F-BAPR – 4-fluorobenzylaminopurinribosid  
AHK2 – *Arabidopsis thaliana* histidin kinasa 2  
AHK3 – *Arabidopsis thaliana* histidin kinasa 3  
AHK4/CRE1/WOL – *Arabidopsis thaliana* histidin kinasa 4  
AHP – *Arabidopsis* histidin fosfotransferové proteiny  
AIF – apoptózu indukující faktor  
ARPE-19 – buněčná linie epitelálních buněk lidské sítnice  
ARR – *Arabidopsis* response regulators  
B16 – buněčná linie myšího kožního melanomu  
BA, BAP – benzyladenosin, benzylaminopurin  
BAPR – benyzalaminopurin ribosid  
BJ – buněčná linie lidských fibroblastů  
BOP – benzotriazol-1-yloxytris(dimetylamino)fosfonium hexafluorofosfát  
CDK – na cyklinech závislé protein kinasy  
CEM – buněčná linie akutní lymfoblastické leukemie  
CKR – cytokininové ribosidy  
CKX – cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (EC 1.5.99.12)  
CPPU – N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)močovina  
*cZ* – *cis*-zeatin  
*cZR* – *cis*-zeatin ribosid  
DHZ – dihydrozeatin  
DHZR – dihydrozeatin ribosid  
DIPEA – N, N-diisopropylethylamine  
DISC – death inducing signaling complex  
DMAPP – dimetylalyl difosfát  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMF – dimetylformamid  
DMSO – dimetylsulfoxid  
DNPH1 – kandidátní lidský onkogen  
DPU - N,N'-difenylmočovina

EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina  
EMEM – Eagle’s Minimum Essential Medium  
EtOH – etanol  
FAS – smrtící receptor  
G-361 – buněčná linie lidského maligního melanomu  
HaCaT – imortalizované lidské keratinocyty  
HCT-15 – buněčná linie kolorektálního karcinomu  
HepG2 – buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu (adherentní)  
HL-60 – buněčná linie akutní promyelocytické leukemie  
HLF – buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu  
HOS – buněčná linie lidského osteogenního sarkomu  
HUH7 – buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu  
iP – N<sup>6</sup>-isopentenyadenin  
iPR – N<sup>6</sup>-isopentenyadenin ribosid  
IPT – isopentenytransferasa  
K – kinetin, 6-furfurylaminopurin  
K-562 – buněčná linie z kostní dřeně chronické myeloidní leukemie  
KR – kinetin ribosid  
LOG – LONELY GUY  
MCF7 – buněčná linie z buněk rakoviny prsu  
MeOH – metanol  
*mT* – *meta*-topolin  
*mTR* – *meta*-topolin ribosid  
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid  
MYB – třída transkripčních faktorů  
NCI60 – panel nádorových linií  
NGM – nematode growth medium  
NIH3T3 – buněčná linie normálních myších fibroblastů  
*oT* – *orto*-topolin  
*oTR* – *orto*-topolin ribosid  
p53 – tumor supresorový gen  
PBS – phosphate buffered saline  
*pT* – *para*-topolin  
*pTR* – *para*-topolin ribosid



RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium  
SNU449 – buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu  
TDZ - N-fenyl-N'-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)močovina, thidiazuron  
TEA – triethylamin  
TLC – chromatografie na tenké vrstvě  
TNFR – smrtící receptor  
*tZ* – *trans*-zeatin  
*tZR* – *trans*-zeatin ribosid  
*tZRDP* – *trans*-zeatin ribosid difosfát  
*tZRMP* – *trans*-zeatin ribosid monofosfát  
*tZRTP* – *trans*-zeatin ribosid trifosfát  
VRO – vakuová rotační odparka