



Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině věd: Biologické a ekologické vědy

**RŮSTOVĚ-REGULAČNÍ LÁTKY NA BÁZI
N⁶-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ ADENINU**

(název disertace)

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru: botanika a fyziologie rostlin

Jméno uchazeče: Prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc.

Pracoviště uchazeče: Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky
AVČR & Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Místo a datum: červenec 2004

POUŽITÉ ZKRATKY

Ade	adenin
Ado	adenosin
AHK3,AHK4	cytokininové receptory z <i>A. thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
ARCK	aromatické cytokininy
BAP	6-benzylaminopurin
BAPR	6-benzylaminopurin ribosid
BAP9G	6-benzylaminopurin-9-glukosid
BAP7G	6-benzylaminopurin-7-glukosid
BAP3G	6-benzylaminopurin-3-glukosid
BAPR5'P	6-benzylaminopurin ribosid-5'-monofosfát
9Ala-BAP	9-alanyl-BAP
CKOx	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CDKI	inhibitor CDK
CK	cytokinin
Cyc	cyklin
DHZ	dihydrozeatin
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi
FAB	technika hmotové spektrometrie založená na bombardování rychlými atomy
GC-MS	plynová chromatografie-hmotová spektrometrie
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysoko-účinná kapalinová chromatografie-hmotová spektrometrie
iP	isopentenyladenin
(<i>cis</i>)Z	<i>cis</i> -zeatin
MemT	<i>meta</i> -methoxytopolin
MemTR	<i>meta</i> -methoxytopolin ribosid
MeoT	<i>ortho</i> -methoxytopolin
MeoTR	<i>ortho</i> -methoxytopolin ribosid
mT	<i>meta</i> -topolin: 6-(3-hydroxybenzylamino)purin
mTR	<i>meta</i> -topolin ribosid
OC	olomoucín
oT	<i>ortho</i> -topolin: 6-(2-hydroxybenzylamino)purin
oTR	<i>ortho</i> -topolin ribosid
pRb	retinoblastomový protein
p53	nádorový supresor p53
RT	retenční čas
SAR	studie vztahů mezi strukturou a aktivitou
TLC	tenkovrstevná chromatografie
Z	zeatin
ZR	zeatin ribosid
Z9G	zeatin-9-glukosid
ZOG	zeatin-O-glukosid
ZROG	zeatin ribosid-O-glukosid
Z9GOG	zeatin-9-glukosid-O-glukosid

OBSAH

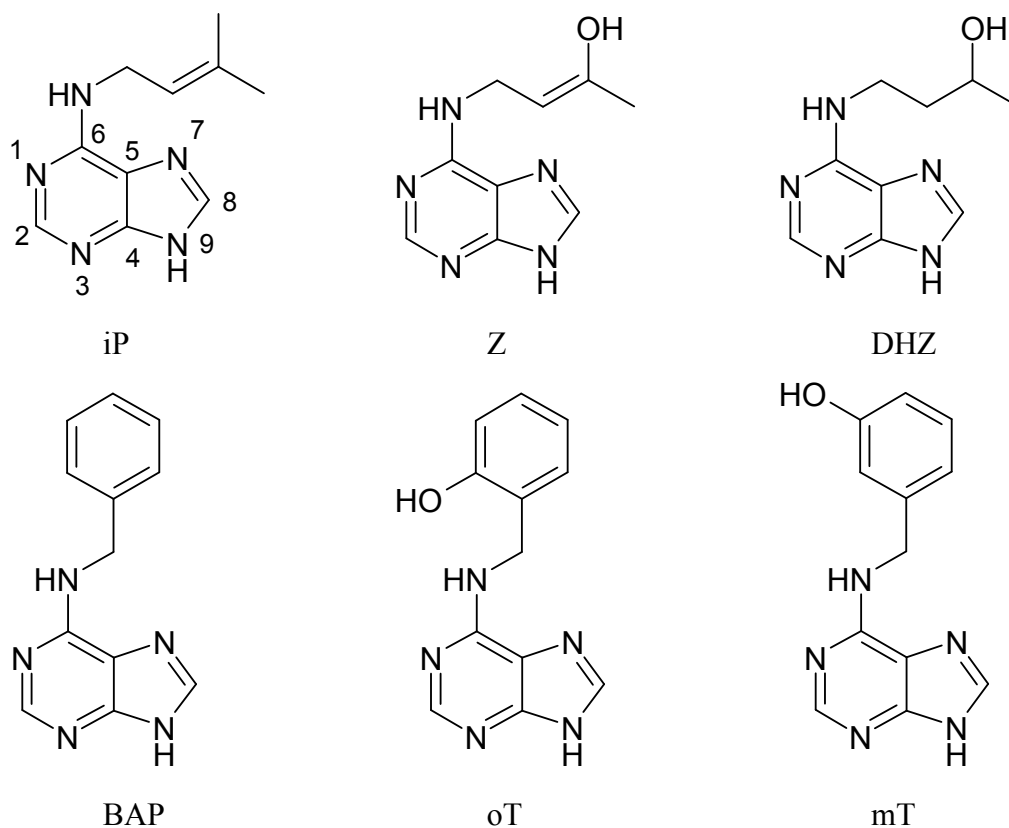
1. Úvod	4
2. Cytokininy, jejich charakteristika	5
2.1. Imunodetekce a identifikace aromatických cytokininů v rostlinách	6
2.2. Vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou cytokininů	8
3. Inhibitory cyklin-dependentních kinas na bázi N ⁶ -substituovaných derivátů adeninu	10
3.1. Charakteristika buněčného cyklu	10
3.2. Nádory jako onemocnění deregulované buněčné proliferace	11
3.3. Chemické inhibitory cyklin-dependentních kinas	12
3.4. Purinové inhibitory CDK	12
3.4.1. Historie purinových inhibitorů CDK	12
3.4.2. Vztahy mezi strukturou a CDK inhibiční aktivitou u derivátů olomoucínového typu	13
3.5. Nové deriváty purinů a pyrimidinů inhibující CDK	15
3.5.1. Tetrasubstituované puriny	15
3.5.2. Disubstituované pyrazolo[4,3- <i>d</i>]pyrimidiny	16
3.5.3. Deriváty guaninu a pyrimidinů	17
3.6. Náhled do krystalových struktur CDK2 s purinovými antagonisty ATP	18
4. Závěr	21
5. Perspektivy výzkumu N ⁶ -substituovaných derivátů adeninu	23
6. Literatura	26
7. Seznam vybraných publikací vztahující se k disertaci	29
8. Summary	35

1. Ú V O D A C Í L E P R Á C E

V souhrnu je hlavním cílem této práce ukázat, jaké možnosti přináší dokonalá znalost molekulárních mechanismů interakce hormonálních látek s proteiny, která v tomto případě vedla nejen k vývoji originálních analytických postupů, použitých posléze k detekci, izolaci a identifikaci nové, vysoce biologicky aktivní skupiny přirozeně se vyskytujících cytokininů, ale i k objevu inhibitorů cyklin-dependentních kinas na bázi aromatických cytokininů, látek s významnou protinádorovou účinností *in vitro* a *in vivo*. Věříme, že tyto znalosti povedou i k nalezení dalších vysoce účinných látek směřovaných na molekulární cíle patologicky postižených lidských buněk. Je rovněž mým cílem v této práci ukázat, jak mohou interdisciplinární přístupy napomoci rychlému řešení velmi složité problematiky regulace růstu a vývoje rostlin i živočichů na buněčné a molekulární úrovni. Kromě jiného je ukázáno i to, že na molekulární úrovni jsou mechanismy regulující buněčnou proliferaci u všech organismů ve své podstatě stejné a nezměnily se významně ani po miliónech let evolučního vývoje. Snad proto může i molekulární fyziologie rostlin přinést významné poznatky do takových oblastí výzkumu jakými je medicína. Věříme, že N⁶-substituované adeniny a jejich deriváty se stanou základem vývoje nových generací léčiv s antimikrobiálními, antiinflamatorními, protinádorovými, imunosupresivními, antivirálními a dalšími, medicínsky významnými účinky. Kladu si rovněž otázku, proč jsou N⁶-substituované adeniny a jejich deriváty tak důležité v regulaci molekulárních mechanismů řady lidských onemocnění. Snad existují jako živočišné hormony? Možná ne. V každém případě však existují v rostlinách. Vzhledem k tomu, že se veškeré organismy na Zemi evolučně vyvíjely společně po mnoho desítek miliónů let, je pravděpodobné, že pro látky rostlinného původu, jakými cytokininy zaručeně jsou, si příroda našla mnoho regulačních vazeb k živočichům a tedy i člověku. Látky cytokininové povahy proto zřejmě ovlivňují značné množství molekulárních mechanismů v živočišných i lidských buňkách. Z těchto důvodů je možná „cytokinin-rich“ rostlinná strava pro člověka nepostradatelná? První důkazy o tom jsme již podali a některé další budou, alespoň ve zkratce, prezentovány v této práci. Cílem této práce není podat zevrubnou analýzu současného stavu výzkumu cytokininů, ale dříve nahlédnout do řešení některých aktuálních témat, kterými se v současné době zabýváme.

2. Cytokininy, jejich charakteristika

Cytokininy jsou chemicky charakterizovatelné jako N^6 -substituované deriváty adeninu. Současná nomenklatura založená na systému navrženém Lethamem (1974) a Lethamem a Palnim (1983) byla původně navržena pro zeatin (Z) a isopentenyladenin (iP). Konjugace purinového kruhu bývá označována číslem polohy substituentu, tak jak je znázorněno na obr. 1 pro iP.



Obr.1 Přehled chemických vzorců základních cytokininových bází iP – N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin, Z - *trans*-zeatin, DHZ - dihydrozeatin, BAP - 6-benzylaminopurin, oT - *ortho*-topolin, mT - *meta*-topolin.

Cytokininy lze rozdělit v závislosti na povaze N^6 -postranního řetězce na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Isoprenoidní jsou reprezentovány cytokininy odvozenými od následujících bází: N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin, dihydrozeatin a zeatin. Mezi aromatické cytokininy patří 6-benzylaminopurin, *meta*- a *ortho*-topolin a jejich metabolity.

V případě isoprenoidních cytokininů hraje významnou roli konjugace, zahrnující modifikace purinového jádra a N^6 -postranního řetězce. Hlavními formami cytokininových konjugátů v rostlinách jsou 9-ribosidy, 9-ribotidy, 3-, 7-, 9- a O-glukosidy, 9-O-diglukosidy, O-xylosidy, 9-ribosylglukosidy, O-acetyl a O-allyl deriváty a rovněž konjugáty cytokininů s alaninem (viz. detaily Vaňková 1999).

2.1. Imunodetekce a identifikace aromatických cytokininů v rostlinách

Teoretický předpoklad přirozeného výskytu aromatických cytokininů v rostlinách byl podpořen následujícími fakty:

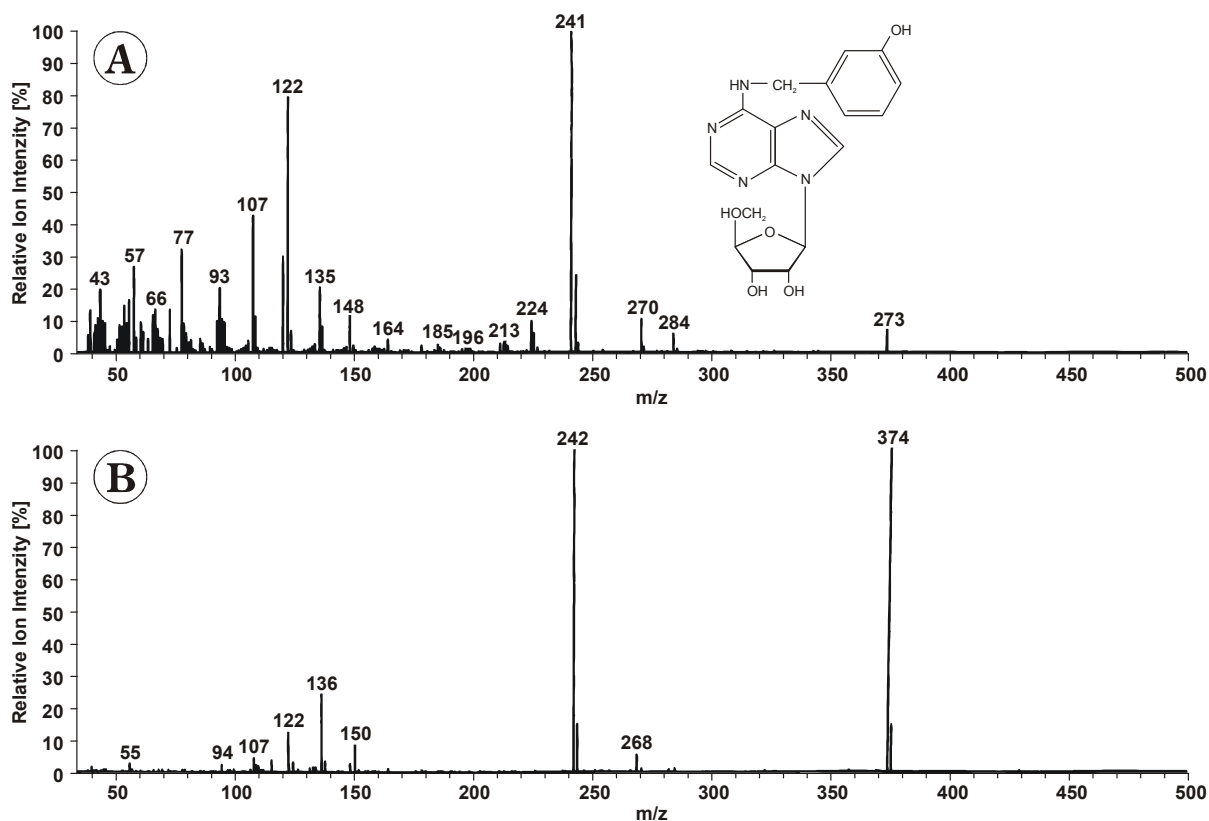
1) Již před více jak 20-ti roky byly v rostlinných pletivech nalezeny proteiny, které specificky vázaly BAP a příbuzná analoga (Fox, Erion 1975, 1977) a přitom vykazovaly fyziologicky velmi nízkou afinitu k zeatinu, nejaktivnějšímu isoprenoidnímu cytokininu. V jednom případě dokonce odpovídala biologická aktivita rozdílně substituovaných 6-benzylaminopurinů při indukci buněčného dělení (klasický cytokininový biotest) relativním hodnotám afinity těchto látek k vazebnému proteinu izolovanému z tohoto tabákového kalusu (Sussman, Kende 1978). Dá se předpokládat, že v případě, že jsou v rostlinách přítomny vazebné proteiny takových vlastností, pak budou v daném pletivu existovat i příslušné cytokininy.

2) BAP a jeho deriváty (hydroxy a methoxy) vykazovaly velmi vysokou biologickou aktivitu v řadě biotestů, která byla srovnatelná s přirozeně se vyskytujícími isoprenoidními cytokininy (Fletcher, Mc Cullagh 1971, Iwamura et al. 1980, Kamínek et al. 1987, Kuraishi 1959, Sussman, Kende 1978).

3) Bylo objeveno několik zástupců ARCK v rostlinách (viz. výše) a prokázána regulace endogenních hladin *ortho*-hydroxybenzyladenosinu světlem (Hewett, Wareing 1973).

K ověření této hypotézy byl vyvinut originální postup založený na vývoji specifických protilátek rozpoznávajících jednotlivé skupiny aromatických cytokininů. Originální proto, že tento přístup nebyl dosud použit k hledání nových látek v rostlinách, neboť k detekci přirozených látek neznámého původu se většinou využívá kombinace chromatografických technik s biotesty. Vyvinuté protilátky byly vysoce specifické pro jednotlivé hydroxybenzylaminopuriny a při použití v ELISA testech poskytovaly velmi citlivý detekční systém s detekčními limity na femtomolární úrovni (Strnad 1996). Následná kombinace HPLC s těmito specifickými ELISA testy poskytla rychlou, citlivou a specifickou metodu pro stanovení a detekci velkého spektra isoprenoidních i aromatických cytokininů v částečně přečištěných extraktech rostlinných pletiv. Na základě distribuce imunoreaktivního materiálu v individuálních HPLC frakcích byly v řadě rostlinných extraktů detekovány metabolity BAP, ale i jeho hydroxy deriváty (Strnad et al 1992a,b, 1994, 1996). Imunoreaktivní látky cytokininové povahy byly poté trimethylsilylovány nebo permethylovány a jejich struktura identifikována pomocí plynové chromatografie-hmotové spektrometrie (GC-MS, obr. 2, detaily Strnad et al. 1992a,b, 1994, 1997).

Pro hydroxybenzyladeniny, které jsme detekovali a identifikovali v listech topolu *Populus x canadensis* Moench. cv. *Robusta*, jsme původně navrhli název populiny (Strnad 1993), a to podle návrhu prof. Horgana (Aberystwyth, Anglie), který objevil první aromatický cytokinin 6-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin (Horgan et al. 1973, 1975). Posléze jsme však zjistili, že název populin byl již použit v roce 1932 pro salicin benzoát (Richtmyer, Yakel 1934). Z těchto důvodů jsme pro nově objevené hydroxybenzyladeniny navrhli český název topoliny, a to podle rostlinného objektu, ze kterého byly vyizolovány (Strnad et al. 1997). Hlavním a zároveň nejaktivnějším zástupcem aromatických cytokininů je *meta*-topolin, který je stejně aktivní jako dosud nejaktivnější přirozeně se vyskytující cytokinin zeatin (Holub et al. 1991, 1995, 1998).



Obr. 2. Hmotová spektra *meta*-topolin ribosidu po ionizaci nárazem elektronu - EI (A) a urychlenými atomy - FAB(B).

Objev vysoce biologicky-aktivního *meta*-hydroxybenzyladeninu (*meta*-topolin, mT) přidal třetího a posledního člena do skupiny cytokininů, které jsme pojmenovali "aromatické cytokininy" (Strnad et al. 1992, Strnad 1997). Funkce těchto růstových regulátorů v rostlinách bude zřejmě rozdílná oproti isoprenoidním cytokininům a musí být ještě objasněna. Studie vazebných proteinů (Keim et al. 1981, Sussman, Kende 1978), ale i nedávno publikované výsledky testování isoprenoidních a aromatických cytokininů na AHK3 a AHK4/CRE1 receptorech z *A. thaliana* (Spíchal et al. 2004) naznačují, že v rostlinách je jasná diskriminace mezi těmito skupinami cytokininů již primárními komponenty signální dráhy, tzn. při jejich interakci s receptory.

Objev *meta*-topolinu není pouze významným přínosem teoretickým, ale bude mít zřejmě i praktické využití v zemědělství, a zejména pak v rostlinných biotechnologiích. Jde o látku vysoce biologicky aktivní v *in vitro* kulturách, která u některých druhů vykazuje i 10-krát vyšší morfogenní aktivitu ve srovnání s tradičně používaným BAP. Důvodem je zřejmě vyšší polarita ve srovnání s BAP, čímž je mT snadněji transportován i metabolizován rostlinnými pletivy. Výsledkem tohoto fenoménu je následné snazší zakořeňování prýtů, jejich minimální malformace a degenerace, což jsou typické vedlejší účinky BAP pozorovatelné u *in vitro* množných rostlin (Kubaláková, Strnad 1993, Jindrová et al. 1995, Werbrouck et al. 1996).

Vysoká morfogenní aktivity *meta*-topolinu je zřejmě způsobena tvorbou O-glukosidů, jejichž akumulace byla prokázána při mikropropagaci *Spathiphyllum floribundum* (Werbrouck et al. 1996). Exogenně dodaný mT je velmi rychle metabolizován na příslušné O-glukosidy a vytváří tak zřejmě rezervní zásobu zabezpečující pozvolné uvolňování aktivního aglykonu v průběhu kultivace explantátů. Díky tomu se výrazně prodlouží penetrace *in vitro* kultur aktivní bází. Naproti tomu je exogenně aplikovaný BAP v *in vitro* kulturách přeměněn na příslušný 9-glykosid, který je velmi nepolární a zůstává lokalizován zejména v

místě kontaktu explantátu s médiem. Benzylaminopurin-9-glukosid je metabolicky stabilní, je dlouhodobě akumulován v *in vitro* rostlinách a pravděpodobně brzdí následné zakořeňování namnožených prýtů (Holub et al., v přípravě). Naše poslední výsledky rovněž naznačují, že mT bude hrát zřejmě i důležitou úlohu v aklimatizaci rostlin při transferu explantátů z *in vitro* do *ex vitro* podmínek (Baroja-Fernandéz et al. 2002).

Výskyt topolinů byl posléze prokázán i v řadě dalších rostlinných druhů, a to od nejprimitivnějších řas (Stirk et al. 2003, 2004, Ördög et al. 2004) až po vyšší rostliny (Goicoechea et al. 1995, 1996, Jones et al. 1996, Doležal et al. 2002). Jak se tedy zdá, budou aromatické cytokinininy běžně rozšířeným druhem N⁶-substituovaných derivátů adeninu v rostlinách.

Vedle hydroxy-derivátů BAP se nám podařilo nedávno prokázat i výskyt blíže příbuzných methoxytopolinů (Tarkovská et al. 2003). V listech topolu *Populus x canadensis*, v *A. thaliana* a u *A. tumefaciens* byl prokázán výskyt 4 nových cytokininů, a to *ortho*-methoxytopolinu (MeoT), *meta*-methoxytopolinu (MemT) a jejich ribosidů (MeoTR, MemTR). K identifikaci těchto látek bylo použito originálních analytických postupů založených na kombinaci specifické MeoT/MemT imunoafinitní chromatografie s elektrosprej HPLC-MS nebo kapilární HPLC-frit FAB-MS po předkolonové derivatizaci. Struktura nových látek byla potvrzena syntézou a jejich endogenní hladiny stanoveny pomocí specifické HPLC-ELISA kalibrované odpovídajícími interními tritiovými standardy. Endogenní hladiny těchto cytokininů se pohybovaly v rozmezí 0,25 – 10 pmol g⁻¹ čerstvé hmoty; u *A. tumefaciens* však byly až 600-krát vyšší. Jako velmi zajímavá se jeví zejména vysoká biologická aktivita těchto látek, která byla zjištěna pomocí řady klasických cytokininových biotestů. Všechny methoxytopoliny vykazovaly totiž velmi vysokou antisenescenční aktivitu, která byla až o 200% vyšší než u Z a BAP (Doležal et al. 2004, odesláno do tisku). Vybrané látky byly rovněž zkoušeny při *in vitro* množení řady ornamentálních druhů, kde by jak se zdá, mohly najít v krátké době velmi široké uplatnění.

Vedle methoxytopolinů byl prokázán i přirozený výskyt dalších cytokininů, např. *ortho*-topolin-O-glukosidu a 2-methylthio-*ortho*-topolin-O-glukosidu (Doležal et al. 2002), zeatin-O-glukosidu-9-glukosidu a dihydrozeatin-O-glukosidu-9-glukosidu (Werner et al. 2003), zeatin-O-glukosidu-9-ribosid-5'-monofosfátu (Šebestová et al., v přípravě). Z výše uvedeného lze tedy konstatovat, že v rostlinách bude existovat mnohem pestřejší spektrum cytokininů, než se původně předpokládalo.

2.2. Vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou cytokininů

Všechny dosud objevené přirozené a valná většina syntetických cytokininů jsou N⁶-substituovanými deriváty adeninu (viz. obr. 1). Modifikace tohoto N⁶-postranního řetězce vedou ke značným změnám biologické aktivity (viz. Matsubara 1980, Skoog et al. 1967). Biologická aktivita těchto N⁶-alkyladeninových cytokininů závisí zejména na délce postranního řetězce (optimum C₅-C₆), přítomnosti dvojně vazby mezi C₂-C₃ (zvyšuje), polohově specifická hydroxylace a methylace postranního řetězce (v poloze 4 zvyšuje – viz. zeatin) a prostorová konfigurace této skupiny (*trans*>*cis*) (detaily v pracích Iwamura et al. 1980, Kamínek et al. 1987, Matsubara et al. 1980, Skoog et al. 1967). Zde by snad nebylo od věci připomenout, že se nám podařilo nedávno prokázat, že *cis*-zeatin a jeho metabolity vykazují biologické aktivity srovnatelné s odpovídajícími *trans*-isomery (Spíchal et al., v přípravě). Tento cytokininový derivát byl dlouho považován za látku minimálně biologicky

aktivní a existovala i teorie, že jednou ze základní drah vedoucích ke snížení cytokininové aktivity v rostlinách je *trans-cis*-izomerizace. Podářilo se nám prokázat i vysokou afinitu *cis*-zeatinu k AHK3 receptoru z *A. thaliana* (Spíchal et al. 2004).

Biologická aktivita cytokininů s cyklickou funkční skupinou v poloze N⁶ závisí na charakteru a velikosti cyklu a klesá v pořadí benzyl>furfuryl=thenyl>fenyl. Nasycení cykloalkylového substituentu je doprovázeno poklesem biologické aktivity (Skoog et al. 1967). Hydroxylace, halogenace a methylace postranního aromatického cyklu má polohově specifický účinek, přičemž aktivita polohových isomerů většinou klesá v pořadí *meta*<nesubstituovaná látka<*ortho*<*para* (Holub et al. 1998, Iwamura et al. 1980, Kamínek et al. 1987).

Alkylace různými skupinami na samotném purinovém kruhu nebo jeho modifikace v důsledku vzájemné výměny atomů C a N má za následek podstatné snížení nebo dokonce ztrátu biologické aktivity. Výjimku tvoří 2-Cl a 8-methyl deriváty zeatinu a iP (Damman et al. 1974). C2- a C8-substituovaných cytokininů však bylo připraveno pouze několik, a proto nelze dělat jednoznačné závěry o vztazích mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou. Dokonalé znalosti jsou právě v této oblasti velmi žádané, neboť mohou napomoci při přípravě azido a fluorescenčně značených cytokininů, přípravě specifických protilátek, ale i nových, vysoce biologicky aktivních cytokininů.

Vedle přirozeně se vyskytujících se N9-alkyl cytokininů byla připravena i řada syntetických derivátů (Corse et al. 1989, Zhang, Letham 1989). Nejaktivnějšími dosud vyvinutými deriváty jsou 9-(2-tetrahydropyranyl)-BAP a 9-(2-tetrahydrofuranlyl)-BAP (Zhang et al. 1987), které vykazovaly mnohem vyšší aktivitu než BAP v řadě biotestů. Vysoká biologická aktivita 9-(2-tetrahydropyranyl)-N⁶-alkyladeninů byla vysvětlena pozvolnou eliminací N9-substituentu, neboť tetrahydropyranylová skupina je obecně málo odolná kyselým hydrolyzám (Young, Letham 1969). To bylo posléze potvrzeno Foxem et al. (1971) při studiu metabolismu méně aktivního 9-methyl-BAP v tabákovém a sójovém kalusu, kde byla prokázána rychlá konverze na několik meziproduktů. Metabolické produkty nebyly bohužel přesně určeny. Pietrafesa a Blaydes (1981) prokázali chromatograficky tvorbu BAPR a BAPR5'P a to při studiu metabolismu 9-methyl-BAP v klíčících semenech salátu. Volný BAP nebyl bohužel detekován. Rozhodující výsledky přinesla až metabolická studie s 9-(4-chlorbutyl)BAP v kotyledonech ředkvičky (Letham et al. 1978), která potvrdila konverzi na BAP7G a BAP9G pomocí hmotové spektrometrie. Tvorbě těchto glukosidů musí logicky předcházet degradace 9-alkyl-derivátu za uvolnění BAP. Tvorbu volného BAP se podařilo prokázat až při metabolických studiích se značenými 9-(2-tetrahydropyranyl)BAP a 9-(2-tetrahydrofuranlyl)BAP, cytokininovými deriváty s vysokou účinností při inhibici senescence u sóji. Obě látky byly rovněž debenzylvány na příslušné 9-substituované adeniny. Vysoká biologická aktivita těchto látek byla vysvětlena dealkylací těchto látek, která zajišťuje dlouhodobou penetraci pletiv biologicky žádoucími hladinami volného BAP (Zhang, Letham 1989). Všechny méně aktivní látky (Corse et al. 1989, Fox et al. 1971, Kende, Tavares 1968, Motyka et al. 1992, Young, Letham 1969, Zhang, Letham 1989) lze proto považovat za mnohem odolnější k enzymatické degradaci, a to i přesto, že s nimi nebyly prováděny metabolické studie.

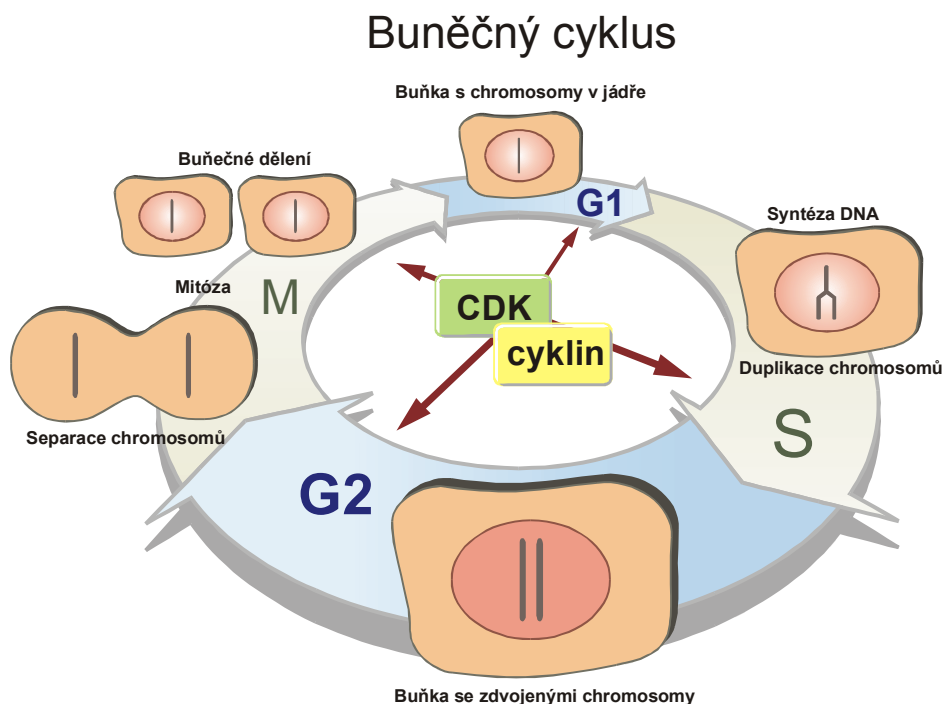
Na rozdíl od N9-alkyl derivátů cytokininů dlouhodobě uvolňujících aglykon z vazby, mohou substituce v polohách C2 a C8 minimalizovat ty konjugační dráhy cytokininů, které vedou k tvorbě metabolicky stabilních 7- a 9-glukosidů. Bohužel byla této problematice doposud věnována minimální pozornost, a to i přesto, že nové, vysoce aktivní C2- nebo C8-

alkyl deriváty cytokininů mohou mít výrazný dopad na další rozvoj rostlinných biotechnologií a zemědělství.

3. Inhibitory cyklin-dependentních kinas na bázi N⁶-substituovaných derivátů adeninu

3.1. Charakteristika buněčného cyklu

Buněčný cyklus je jedním z nejvíce evolučně konzervovaných procesů všech eukaryotických buněk. Většina objevů vedoucích k pochopení mechanismů kontroly buněčného cyklu byla učiněna docela nedávno. Význam těchto objevů byl pro celou oblast medicíny tak obrovský, že zanedlouho po odhalení klíčových regulátorů buněčného cyklu byla Hartwellovi, Huntovi a Nursemu udělena Nobelova cena za medicínu (2001). Hartwell objasnil, že u buněk je koordinace soustrojí buněčného cyklu řízena zvláštním *systémem regulace buněčného cyklu*. Tento systém zabezpečuje průchod jednotlivými fázemi buněčného cyklu a reguluje klíčové procesy, jakými jsou replikace DNA, mitosa a cytokinéze. Systém má dva důležité kontrolní body v buněčném cyklu a to v G1-fázi, kdy se rozhoduje o tom, zda buňka vstoupí do S-fáze, a druhý v G2-fázi, rozhodující o vstupu do mitózy. Kontrolní body i vstup do jednotlivých fází cyklu je řízen dvěma klíčovými proteiny v komplexu. Nurse objevil cyklin-dependentní kiny (CDK), enzymy, které fosforylují podřízené proteiny cyklu, zatímco Hunt popsal první cyklin jako regulační protein, který je potřebný pro enzymovou aktivaci CDK.



Obr. 3. Buněčný cyklus se skládá ze čtyř po sobě jdoucích fází G1, S, G2 a M. Interfáze zahrnující všechny fáze buněčného cyklu kromě M-fáze je obdobím stálého buněčného růstu a její součástí je i S-fáze, kdy je replikována DNA. V průběhu M-fáze se jádro a později i cytoplazma rozdělí. V každé fázi jsou přítomny specifické komplexy cyklin-dependentní kiny a cyklinu (CDK/cyklin).

Objev cyklin-dependentních kinas před více než deseti lety započal novou éru nahlížení na buněčnou proliferaci a především na její kontrolu. Spouštění jednotlivých fází bylo shledáno závislým na aktivitě CDK, což umožnilo vytvořit první jednoduchý model

kontroly buněčného cyklu (Obr. 1) (Maller et al. 1989). Holoenzym CDK se skládá z proteinu s katalytickou funkcí (proteinkinasa) a pozitivního regulátoru (cyklin). Asociace cyklinu s CDK podjednotkou dává vzniknout aktivnímu komplexu řídícímu určitou fází cyklu. Odtud také pochází název cyklinu, jenž odráží jeho oscilující přítomnost v buňce. Komplex CDK-cyklin pak katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na serinový nebo threoninový zbytek v polypeptidovém řetězci určité sekvence. Aktivita CDK kriticky závisí na vazbě s cyklinem, přičemž některé CDK mohou poutat více typů cyklinů a fosforylovat různé substráty. Těmi bývají transkripční faktory, proteiny cytoskeletu, proteiny biosyntézy purinů, jaderné membrány a další (Mueller et al. 1995).

3.2. Nádory jako onemocnění deregulované buněčné proliferace

Proces onkogeneze na buněčné úrovni je tedy úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Tyto procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Většina nádorových buněk, pokud ne všechny, obsahuje mnohočetné genetické změny, které pravděpodobně podporují proces tumorigeneze deregulováním důležitých signálních a regulačních drah. Každá z drah, která omezuje proliferaci normálních buněk, je nějakým způsobem narušena ve většině nádorů. Jedna skupina mutací nezbytných pro nádorový vývoj postihuje např. obcházení dráhy, která umožňuje potlačení vlivu normálně obligatorně vyžadovaných externích mitogenních stimulů u somatických buněk. Takové mutace mohou zahrnovat autokrinní produkci normálně limitovaných mitogenů, aktivační mutace mitogenních přenašečů signálů typu RTK nebo G-proteinů jakými je například Ras, nebo mutace ovlivňující jeden z mnoha cytoplasmatických přenašečů signálů (např. c-raf, c-mos,...), které přenáší mitogenní informaci na intracelulární cíle (Blume-Jensen, Hunter 2001). Druhá skupina růst-deregulujících mutací postihuje ty molekulární cíle, které jsou zodpovědné za regulaci kontrolního bodu v pozdní G1 fázi buněčného cyklu (START), v němž klíčovou úlohu hraje retinoblastomový protein (pRB). Defekty této dráhy, které se univerzálně vyskytují v lidských nádorech, zahrnují delece *RB* genu a deregulace CDK, které fosforylují a funkčně inaktivují pRB, a to buď cestou přímé nadměrné aktivace CDK nebo vlivem genetických poruch jejich inhibitorů (Sherr 1996). Mutace vedoucí k nekontrolovanému dělení buněk byly prokázány v genech cyklin-dependentních kinas, cyklinů, aktivující fosfatasy *cdc25*, nádorových supresorů pRb a p53 a přirozených inhibitorů cyklin-dependentních kinas (Hoeijmakrers 2001, Rovers, Assoian 2000, Masaque et al., 2000, Sangfelt et al. 2000, Zhu, Skoultschi 2001) (CDKI, např. p16^{INK4a}). Uvědomíme-li si úzkou souvislost genetických změn cyklin-dependentních kinas a jejich regulátorů se vznikem nádorů, jejich přímé interakce s onkogeny a nádorovými supresory a jejich stěžejní funkci v řízení buněčného cyklu, pak se jeví hledání nízkomolekulárních regulátorů buněčného cyklu jako zcela přirozené. Tyto souvislosti rovněž evidentně vybízejí i k vývoji nových generací chemoterapeutik, které blokují progresi buněčného cyklu nádorových buněk, indukují apoptózu a vykazují významné protinádorové účinky nejen na buněčných liniích, ale též *in vivo*. Zatím jsou k dispozici látky ovlivňující vazbu ATP (kompetitivní i nekompetitivní inhibitory) na CDK a inhibitory *cdc25*.

Je pravděpodobné, že mezi nízkomolekulárními látkami kontrolujícími buněčný cyklus budou nalezeny sloučeniny, které najdou široké uplatnění při léčbě řady závažných lidských onemocnění. Potenciální využití syntetických regulátorů buněčného cyklu v medicíně může kromě léčení nádorových onemocnění najít uplatnění i při terapii těch onemocnění, která nějakým způsobem souvisejí s poruchami proliferace, např. kardiovaskulární onemocnění (arterosklerosa, angiogenese), dermatologie (psoriasa), nefrologie

(glomerulonefritida), neurologie (Alzheimerova choroba, ischemie), parazitologie (prvoci, plísňe) a virologie. Z pohledu buněčné biologie a biochemie mohou chemické regulátory cyklu jako velice specifické nástroje přispět k lepšímu porozumění mechanismů buněčného dělení, což může v budoucnu vést opět k odhalení mnohem efektivnějších způsobů terapie (Herwig, Strauss 1997, Ko, Prives 1996).

3.3. Chemické inhibitory cyklin-dependentních kinas

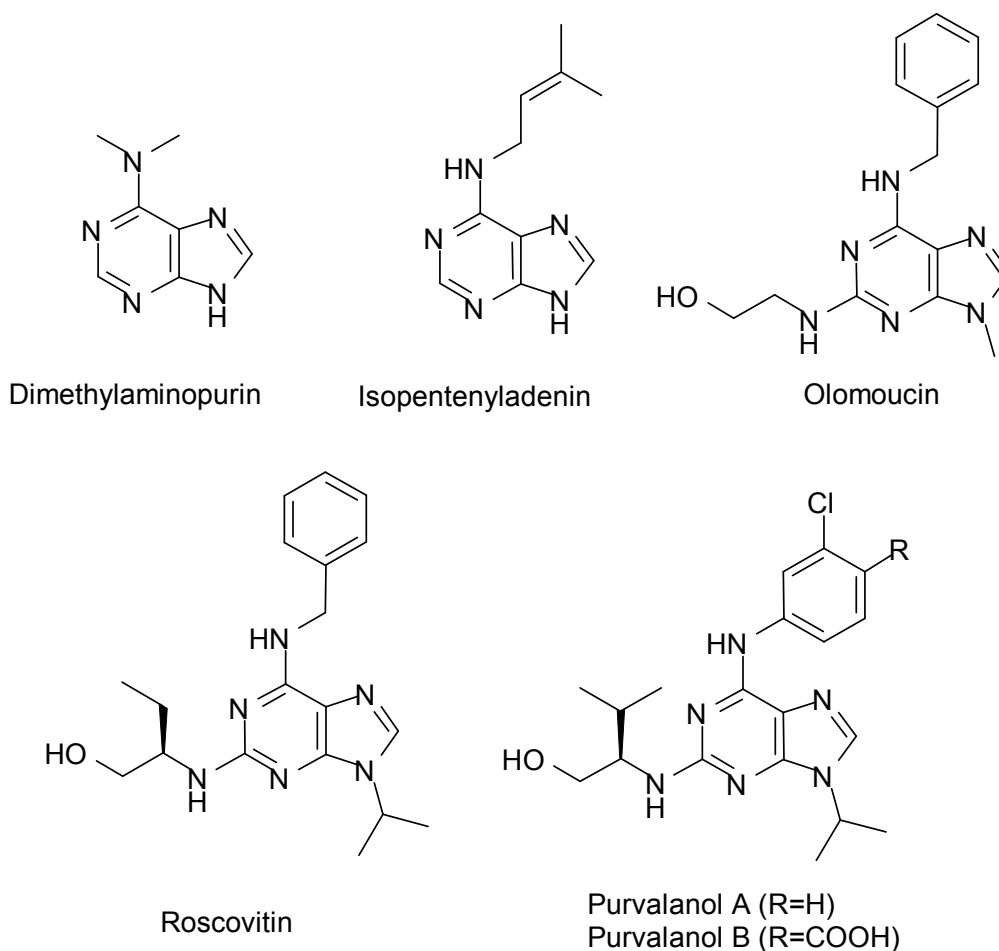
Hledání chemických inhibitorů CDK začalo prakticky těsně po objevu CDK a objasnění úlohy, kterou v regulaci buněčného cyklu zastávají. Záhy byly známy nespecifické inhibitory jako je 6-dimethylaminopurin, 6-(Δ^2 -isopentenyl)aminopurin (Rialet, Meijer 1991), staurosporin, 7-hydroxystaurosporin (Gadbois et al. 1992, Kawakami et al. 1996) a také suramin (Bojanowski et al. 1994), který je již dlouho v klinice používán jako antihelmintikum, antiprozoikum a cytostatikum s velmi komplexním mechanismem účinku (mj. inhibitor topoisomerasy II). Nízkou selektivitou vůči velké skupině kinas je charakteristický též další inhibitor topoisomerasy II, 9-hydroxyellipticin (Ohashi et al. 1995), derivát alkaloidu z rostlin rodu *Ochrosia*. Použití těchto alkaloidů při studiu buněčného cyklu silně omezuje jejich nízká selektivita, avšak není vyloučeno, že se některý z nich posléze stane výchozím členem nové skupiny s užším spektrem účinku. Éru specifických inhibitorů CDK započal objev butyrolaktonu (Kitagawa et al. 1993) a olomoucínu (Veselý et al. 1994). Od této doby byla identifikována řada dalších skupin látek s vysokou specifitou pro kinasy homologní s CDK1.

3.4. Purinové inhibitory CDK

3.4.1. Historie purinových inhibitorů CDK

Jako slabý a málo specifický inhibitor kinas byl v osmdesátých letech často používán 6-dimethylaminopurin (Nath, Rebhun 1973). Další testování purinových sloučenin poskytlo asi 2-krát aktivnější 6-(Δ^2 -isopentenyl)adenin (Rialet, Meijer 1991). Protože tato sloučenina je rostlinným hormonem (cytokininem), soustředila se naše pozornost k těmto látkám a k sloučeninám z nich odvozeným. Prvním specifickým purinovým inhibitorem CDK1, CDK2 a CDK5 z panelu známých kinas se stal inhibitor rostlinných cytokinylglukosyltransferas 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin (Parker et al. 1986), později triviálně pojmenovaný L. Meijerem olomoucín (OC, Veselý et al. 1994) (Obr. 4).

Mezi všemi testovanými purinovými látkami vykazovaly nejvyšší účinnost zejména C2, C6, N9-trisubstituované puriny. Po odhalení, do té doby neznámých vlastností olomoucínu, jsme se zaměřili na studium vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR) látek odvozených od této sloučeniny (Havlíček et al. 1997). Prokázali jsme, že pouze 9-methyl derivát OC, na rozdíl od isomerního 7-methyl derivátu, má žádanou aktivitu a že odstraněním jakéhokoli substituentu OC nebo jeho zkrácením na aminoskupinu (C2 a C6) dochází k významné ztrátě aktivity, či dokonce k deaktivaci dané sloučeniny. Kinetická analýza prokázala, že inhibice CDK1 olomoucínem je kompetitivní vzhledem k ATP a nekompetitivní vůči histonu, který je při testech používán jako substrát. Rentgeno-strukturní analýza kokryystalu CDK2 s OC (Schultze-Gahmen et al. 1995) rovněž potvrdila, že OC se váže ve vazebném místě pro ATP. Tyto poznatky tehdy vybočovaly z obecných představ, že selektivní inhibitory kinas nebudou nalezeny mezi látkami kompetujícími o vazbu s ATP.



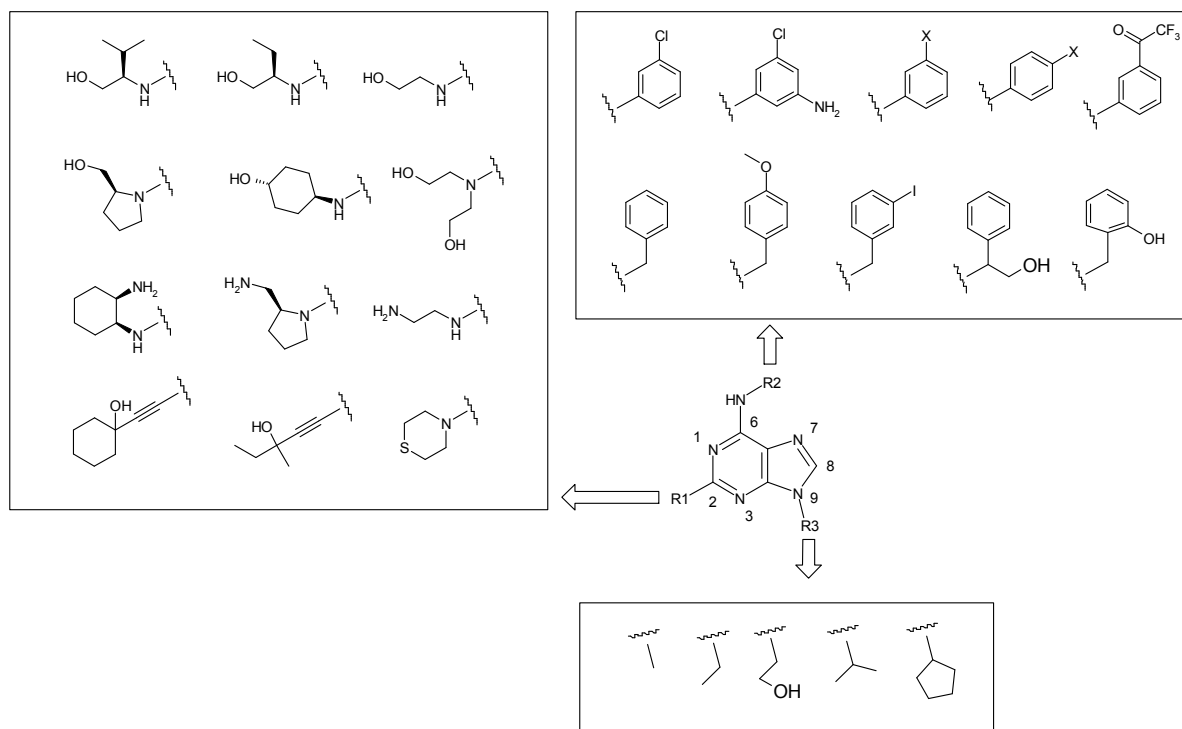
Obr. 4. Struktura některých purinových derivátů s CDK inhibičními vlastnostmi.

3.4.2. Vztahy mezi strukturou a CDK inhibiční aktivitou derivátů olomoucínového typu

Brzy se nám podařilo zvýšit aktivitu trisubstituovaných purinů náhradou methylu OC N9-isopropylem (Havlíček et al. 1997). Ve všech dosud provedených studiích vyšel tento substituent N9 jako optimální. Studie ukazují toto pořadí vhodných substituentů N9: isopropyl, cyklopentyl > hydroxyethyl, Et > Me, kde zařazení cyklopentylu není zcela jednoznačné a záleží na použitém testu. Objemnější substituenty prakticky ruší žádanou inhibiční aktivitu. Zajímavý je ojedinělý nález CDKI aktivity u N9-oleyl derivátu (Schow et al. 1997) naznačující možnost zcela jiného vazebného módu sloučeniny ve vazebném místě. Detaily SAR jsou ilustrovány na obr. 5.

Velmi významný je pro účinek purinových CDKI substituent na uhlíku C2. Náhradou 2-hydroxyethylamino skupiny za (R)-1-(hydroxymethyl)propylamino se nám podařilo vyvinout asi 15-krát účinnější derivát triviálně pojmenovaný roscovitin (Havlíček et al. 1997). Použitím C2 substituentu rozvětvenějšího o jeden methyl / (R)-1-(hydroxymethyl)-2-methylpropylamino/ v kombinaci s vhodnými C6 substituenty /3-chloranilino a jeho deriváty/ byl završen kombinatorní přístup skupiny P.G. Schultze, který vedl k nalezení dosud nejúčinnějších purinových inhibitorů CDK, purvalanolů (asi 1000-krát účinnější než

olomoucín) (Gray et al. 1998). Také u těchto látek byla analyzována struktura ko-krytalů s CDK2 enzymem a bylo zjištěno, že se váží stejným způsobem jako dříve popsané slabší purinové inhibitory. Z provedených SAR studií vyplývá, že vhodnými substituenty C2 purinového skeletu jsou deriváty (obr. 5) s 2-hydroxy- nebo 2-amino-ethylamino skupinou, ale i alifatickými skupinami, které nesou ve vhodné vzdálenosti od purinového jádra hydroxy nebo aminoskupinu(y). Substituce na aromatickém kruhu C2 substituentů vedla zatím k neúčinným derivátům. Krystalové strukturní analýzy naznačují, že NH skupina, kterou je nukleofilně připojen substituent k C2 heterocyklu, netvoří s enzymem vodíkovou vazbu. To potvrdil dále i vývoj účinných derivátů, ve kterých je tento dusík terciární a je nahrazen atomem síry nebo uhlíkem (v *sp* hybridizaci) (Legravered et al. 1998, 2001). Překvapivé je tvrzení, že přes dusík vázaný thiomorfolinový kruh na C2 vedl k relativně aktivnímu derivátu (Oh et al. 1999), protože analogický morfolinový derivát podle našich zkušeností poskytuje neaktivní sloučeniny. Výběr substituentu C6 purinového jádra je ve srovnání s C2 substituentem méně kritický a drobné obměny substituentu vedou k menším změnám v aktivitě. Kritická je však přítomnost exocyklické C6-NH skupiny. Krystalové struktury komplexů CDK2/purinový inhibitor prokázaly tvorbu důležitého vodíkového můstku mezi C6-NH skupinou na purinu a karbonylem Leu⁸² v aktivním ATP vazebném místě enzymu. Další substituce tohoto dusíku (vzniká terciární N, např. methylací) vedla vždy k neúčinným látkám (v enzymatickém i cytotoxickém testu). Také náhrada NH atomem síry vede k neaktivním sloučeninám. Zatím nejúčinnějšími nalezenými sloučeninami jsou deriváty substituované na C6 purinového jádra anilinem a jeho analogy (Gray et al. 1997, 1998, Jeffrey et al. 1995). Substituce anilinového kruhu v *ortho* poloze vede ke snížení aktivity. Významné zvýšení aktivity lze ale pozorovat u chlor- a brom-derivátů v *meta*-poloze. Totéž platí v menší míře o substitucích v *para*-poloze. Nejaktivnější inhibitory CDK1 vznikly po substituci C6 purinu 3-chlor-4-karboxylanilino- (purvalanol B) či 3-chlor-5-aminoanilino- skupinou (aminopurvalanol). U purvalanolu B je vysoká afinita k enzymu způsobena iontovou vazbou mezi karboxylem a aminoskupinou Lys⁸⁹ v ATP vazebném místě (Gray et al. 1998). U této látky je však zvýšení CDK inhibiční aktivity spojeno s nežádoucím poklesem protinádorové aktivity v důsledku nízké prostupnosti buněčnou membránou. Počáteční studie inhibitorů CDK na bázi OC se soustředily na C6-aminobenzylové deriváty (De Azevedo et al. 1997, Schow et al. 1997, Havlíček et al. 1997, Nugiel et al. 1997, Ducrot et al. 2000). U této série látek se podařilo prokázat, že další modifikace fenylu nemají tak dramatický vliv na CDK inhibiční aktivitu jako je tomu u C6-anilino-derivátů. Některé substituce – methoxy nebo jod v *meta*- nebo *para*-poloze se ukázaly v některých případech mírně výhodné. Zaměřili jsme se proto na vývoj hydroxy-derivátů, protože ty podle našich zjištění, vznikají *in vivo* z C6-benzylamino-derivátů (viz. metabolismus boheminu – Chmela et al. 2001, Rypka et al. 2002). Předpokládali jsme rovněž, že by tyto deriváty měly mít výhodnější farmakokinetické vlastnosti díky nižší lipofilitě, která je např. u purvalanolu jednoznačně zodpovědná za nízkou protinádorovou aktivitu. Výrazný nárůst aktivity jsme zjistili po zavedení hydroxy skupiny do *ortho*-polohy. To nás vedlo k racionální syntéze sloučeniny odvozené od roskovitinu a pojmenované olomoucín II (Kryštof et al. 2002). Nárůst účinnosti v CDK testech koreluje se vzrůstající protinádorovou aktivitou *in vitro*. Podobné, ale menší zvýšení účinnosti lze dosáhnout po substituci amino-skupinou v *ortho*-poloze či hydroxy nebo amino skupinou v *meta*-poloze. *Para*-substituované /C6-(4-substituované-benzyl)amino/ deriváty jsou podle našich zkušeností málo účinné (Kryštof et al. 2002).



Obr. 5. Vztahy mezi strukturou a aktivitou 2,6,9-trisubstituovaných purinů. Zobrazeny jsou vybrané substituenty pro každou z klíčových poloh purinových derivátů, které vedou k účinným inhibitorům CDK .

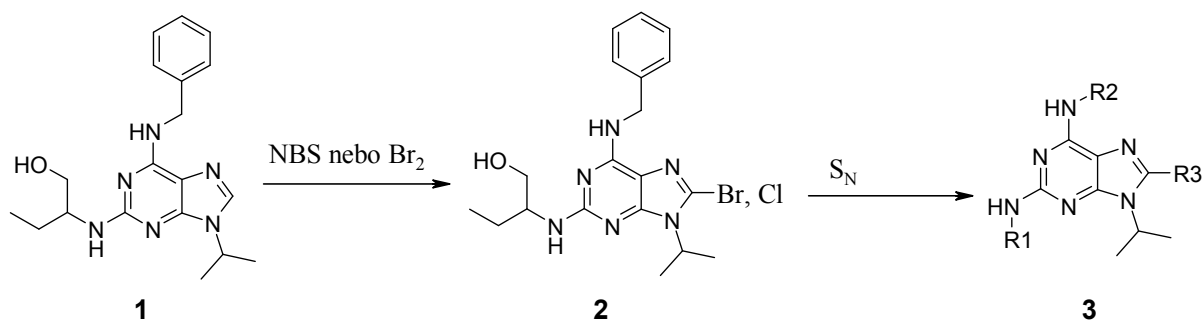
Už SAR studie (Schow et al. 1997) z roku 1997 uvádí sloučeniny relativně účinně inhibující CDK1 (desetiny až jednotky μM) a mající relativně velký C6 substituent – 4-fenylanilino, 4-fenylbenzylamino a 4-(2-thiofenyl)benzylamino. Velmi důležité poznatky přinesl zejména nedávný objev purinových látek, které inhibují vedle CDK1 a CDK2 také CDK4 (Shum et al. 2001) a je pro ně právě typický velký C6 substituent (např. (1-benzylpiperidin-4-yl)amino). Tyto sloučeniny výrazně vybočují svou specifitou pro CDK, neboť jediným známým slabým inhibitorem CDK4 je purvalanol A. Takové látky mohou být potenciálně velmi důležité zejména vzhledem ke klíčovému významu CDK4 v G1 fázi. V našich SAR studiích (Vermeulen et al. 2002) jsme rovněž narazili na sloučeniny, které jsou slabými nebo dokonce velmi slabými inhibitory CDK (např. sloučeniny s objemným C6-aminoadamantylamino nebo C2-heptylamino substituentem), které i přesto vykazují značné cytotoxické vlastnosti při testování na nádorových buněčných liniích. Zdá se pravděpodobné, že mechanismus jejich působení není založen na inhibici CDK, ale na jiném, zatím neznámém mechanismu účinku. Lze tedy očekávat, že i u známých sloučenin inhibujících CDK může být účinek na buněčné úrovni částečně dán působením i na jiné buněčné cíle. Tento faktor je sice nutné mít stále na zřeteli, ale nemusí být zásadní překážkou pro využití těchto látek v chemoterapii.

3.5. Nové deriváty purinu a pyrimidinů inhibující CDK

3.5.1. Tetrasubstituované puriny

Systematický přístup nás dále vedl k modifikaci účinných C2-,C6-,N9-trisubstituovaných purinových derivátů zavedením substituentu do poslední možné polohy purinového jádra - do C8. Ve všech testovaných případech došlo k poklesu; ten byl malý

v případě neobjemných substituentů jakými jsou F, Cl a Me, avšak významný u objemnějších substituentů (Moravec et al. 2003).



Obr. 6. Schéma přípravy tetrasubstituovaných purinů.

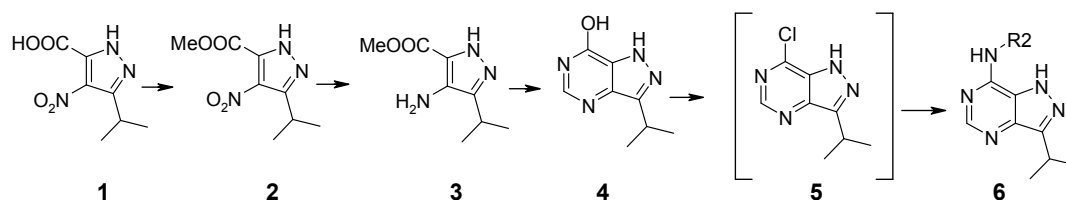
Byly studovány tyto deriváty roskovitinu: 8-chlor, 8-methyl, 8-merkpto, 8-nitro, 8-hydroxy, 8-amino, 8-brom, 8-propyloxy, 8-(3-hydroxypropyl)amino. V uvedeném pořadí klesá i účinnost ve vztahu k inhibici CDK1. To znamená, že jakákoli i sebemenší substituce v této poloze vždy vede k méně účinnému inhibitoru CDK1 v porovnání s výchozím trisubstituovaným derivátem. Zejména velké C-8 postranní substituenty snižovaly inhibiční aktivitu na úroveň detekovatelnosti. Méně aktivní sloučeninu jsme získali i po převedení boheminu na příslušný 8-fluorderivát. Nejúčinnějším derivátem v syntetizované sérii byl po C8 derivatizaci 6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-2-[(1-(hydroxymethyl)propyl)amino]-8-chlor-9-isopropylpurin (IC_{50} (CDK1) = 6 μ M), což opět potvrdilo pozitivní vliv fenolických modifikací u C6 substituentu. U tetrasubstituovaných derivátů byly studovány rovněž jejich cytotoxické vlastnosti na nádorových buněčných liniích MCF7 a K562. Rychlý pokles anti-CDK aktivity nebyl často provázen odpovídajícím poklesem protinádorové účinnosti. Deriváty roskovitinu s relativně velkými C-8 postranními řetězci (8-propyloxy, 8-(3-hydroxypropyl)amino) totiž vykazovaly překvapivě dokonce mírně vyšší cytotoxicitu na linii K562 než původní roskovitin. Nejvíce cytotoxickou sloučeninou v této sérii sloučenin byl 2-[(4-aminocyklohexyl)amino]-6-(3-chlorfenyl)amino-9-isopropyl-8-methylpurin (CI_{50} = 3,5 μ M pro K562 a 8,0 μ M pro MCF7). Zavedením 8-methyl skupiny zde došlo k velmi výraznému poklesu inhibice CDK1 na úroveň 2x nižší než u OC, avšak vysoká cytotoxicita sloučeniny zůstala zachována na mikromolární úrovni. Protože sloučenina má C2 substituent, který je typický pro zatím nemnohé a nedávno objevené inhibitory CDK4 (Shum et al. 2001) přichází v úvahu vysvětlení, že 8-methyl substituce by mohla vést k růstu schopnosti těchto derivátů inhibovat právě tento enzym. Tato hypotéza bude v blízké době testována.

3.5.2. Disubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny

V rámci studia vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR) jsme se nedávno rovněž zaměřili na přípravu nové skupiny inhibitorů CDK odvozených od k purinům isomerních pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů. Struktura těchto látek a zjednodušený způsob přípravy je znázorněn na obr. 7.

Nejblíže analogické 3,5,7-trisubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny jsme zatím syntetizovali pouze jako nepočetnou skupinu a nebudou proto detailně diskutovány. Na druhé straně jsme však prokázali značnou aktivitu u dobře přístupných 3,5-disubstituovaných-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů (Moravcová et al. 2003). Podobné 3,7-disubstituované deriváty pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny (s methyl skupinou v poloze C3) byly v 70. letech popsány jako

anticytokininy. Zjistili jsme, že antimotické účinky připisované anticytokininům lze spíše vysvětlit jejich schopností inhibovat CDK (Spíchal et al., článek v přípravě). Výsledky testování nové generace pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů jsou shrnuty v Tab. 1.



Obr. 7. Schéma přípravy 3,7-disubstituovaných pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů.

Všechny nově připravené disubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny silně inhibovaly CDK1 kinasovou aktivitu při koncentracích přibližně 2-10-krát nižších než odpovídající 6,9-disubstituované puriny. SAR prokázala podobné vztahy jako u příslušných di- a trisubstituovaných purinů s tím, že pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny jsou vždy několikanásobně více účinné (Tab. 1). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s *ortho*-hydroxybenzylamino (VI_d) nebo *meta*-chloranilino (VI_k) C7-substituentem. S narůstající inhibiční aktivitou roste i antiproliferační aktivita těchto látek.

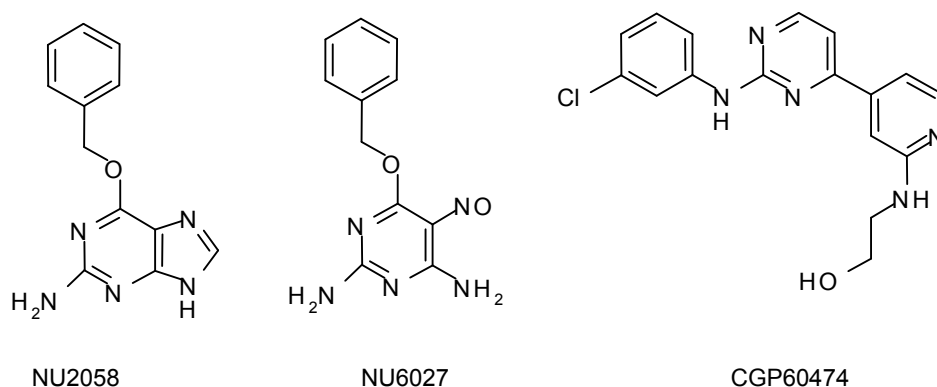
Tab. 1. Srovnání CDK1/cyklin B inhibiční a *in vitro* antiproliferační aktivity 6-substituovaných-9-isopropylpurinů a odpovídajících 3-isopropyl-7-substituovaných pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů.

Pyrazolo [4,3- <i>d</i>] pyrimidin	IC ₅₀ (μM)		isomerní purin	IC ₅₀ (μM)		C6 event.C7 substituent
	CDK1	K562		CDK1	K562	
6a	1.2	66	7a	3.6	113	benzylamino
6b	11	29	7b	23	49	2-brombenzylamino
6c	2.3	46	7c	3.8	>167	4-methoxybenzylamino
6d	0.44	54	7d	4.4	125	2-hydroxybenzylamino
6e	1.7	88	7e	3.1	>167	3-hydroxybenzylamino
6f	1.8	112	7f	4.0	>167	4-hydroxybenzylamino
6g	1.1	26	7g	4.5	104	3-hydroxy-4-methoxybenzylamino
6h	2.5	>167	7h	9.1	>167	furfurylamino
6i	1.2	61	7i	6.9	144	pentylamino
6j	4.5	152	7j	17	>167	isopent-2-en-1-ylamino
6k	0.9	18	7k	5.9	54	3-chloranilino
			olomoucin	7	163	

3.5.3. Deriváty guaninu a pyrimidinů

Nová série purinových inhibitorů CDK reprezentovaná sloučeninou O⁶-cyclohexyl-methylguanine (viz. obr. 8), která byla nedávno vyvinuta, je charakteristická relativně nízkou

inhibiční aktivitou pro CDK1 (srovnatelná s olomoucinem), avšak vykazuje 50-krát vyšší účinnost pro CDK4 (Arris et al. 2000). Krystalové struktury vybraných sloučenin z této série



Obr. 8. Nové purinové a pyrimidinové inhibitory CDK.

ukázaly, že způsob zapadnutí těchto látek do ATP vazebné kapsy se v porovnání se všemi známými purinovými inhibitory CDK ko-krystalovanými s CDK2 liší. O⁶-alkylový substituent totiž překrývá vazebné místo ribosy ATP ve vazebné doméně. Je zajímavé, že odstranění 2-amino skupiny z NU2058 redukovalo schopnost inhibovat CDK1, ale jen nevýznamně potlačilo inhibici CDK2. Methylace na N9 redukovala účinnost pro obě kinas. Dalšími popsány inhibitory jsou pyrimidinové sloučeniny 2,4-diamino-5-nitroso-pyrimidin (Arris et al. 1999, 2000) (NU6027) a látka označená CGP60474 (Meyer et al. 1998, obr. 8). Sloučeniny jsou účinnými inhibitory CDK1 a CDK2. Sloučenina CGP60474 vykazuje velmi slibné protinádorové účinky *in vitro* na řadě nádorových buněčných linií (IC₅₀ 10 – 100 nM) a rovněž *in vivo* protinádorovou účinnost na lidských nádorech transplantovaných nahým myším (Meyer et al. 1998).

3.6. Náhled do krystalových struktur CDK2 s purinovými antagonisty ATP

Podařilo se rovněž připravit ko-krystaly vybraných inhibitorů s některými proteinkinasami, zejména CDK2. Úseky CDK2 a vybraných buněčných proteinkinas, které se podílejí aktivními postranními řetězci svých residuí na vazbě inhibitorů, jsou ve všech komplexech s antagonisty ATP prakticky identické a srovnatelné rovněž s výsledky získanými u CDK2 apoenzymu, komplexu s ATP (De Bondt et al. 1993, Schulze-Gahmen et al. 1996) či komplexu CDK2/cyklin A (Jeffrey et al. 1995). Molekuly inhibitorů se obecně váží do hluboké ATP vazebné štěrbině umístěné mezi N- a C-terminálními laloky CDK2 (viz. obr. 9, ko-krystal CDK2 s roskovitinem). Zjištěná flexibilita residuí postranních řetězců uvnitř vazebného místa v rámci jednotlivých CDK dává šanci vývoji inhibitorů specifických pro jednotlivé členy této rodiny kinas. Využití sekvenčních diferencí konzervativní ATP vazebné oblasti mezi jednotlivými kinasami, stejně jako nové, nepopsané interakce uvnitř vazebné štěrbině, tvoří východisko pro racionální design a následující vývoj nových účinných a selektivních inhibitorů proteinkinas (Toledo, Lydon 1997).



Obr. 9. Roskovitin v ATP vazebném místě CDK2 proteinkinasy.

V případě cytokininu isopentenyladeninu je purinový kruh otočen o cca 180° v porovnání s ATP, a to kolem osy tvořené N3 a N7 dusíkovými atomy. To umožňuje vazbu isopentenylové skupiny v místě, kde se normálně váže ribosa ATP. V olomoucinovém komplexu s CDK2 je purinový kruh orientován rozdílně: zde se v místech vazby ribosy ATP váže hydroxyethylamino skupina polohy C2, kdežto N⁶-benzyl skupina je lokalizována mezi β -páskem 1 a $\beta 5$ - $\alpha 2$ spojovací smyčkou, která propojuje obě domény CDK2 (Schulze-Gahmen et al. 1995). Purinový kruh i postranní řetězce roskovitinu, stejně jako ostatních 2,6,9-trisubstituovaných purinů, jsou lokalizovány přibližně ve stejné pozici jako je tomu u olomoucínu (Gray et al. 1998). Velmi konzervativní pár vodíkových interakcí mezi purinovým dusíkem N7 a páteřní NH skupinou Leu⁸³, mezi N⁶-amino skupinou a hřbetním karbonylem Leu⁸³ je možné pozorovat u všech tří CDK2/purinových komplexů (olomoucin, roskovitin, purvalanol). Další pozorovaný vodíkový můstek v těchto komplexech je mezi elektron-deficitním vodíkem C8 pozice purinového kruhu a páteřním karbonylem kyslíku Glu⁸⁰. V souhlasu s výsledky SAR je N9 substituent všech purinových derivátů umístěn v malé hydrofobní kapse vytvářené Val¹⁸, Ala³¹, Phe⁸⁰, Leu¹³⁴ a Ala¹⁴⁴. C2 postranní řetězec purinů se váže v místě vazby ribosy, avšak pozice jednotlivých C2 substituentů se mírně liší: např. R-isopropyl skupina purvalanolu vytváří mnohonásobné hydrofobní kontakty na s L2 smyčkou CDK2 bohatou na glyciny a terminální hydroxyl tvoří vodíkový můstek se hřbetním karbonylem Gln¹³¹. To vede k otevření kapsy v aktivním vazebném místě lemovaném polárními postranními řetězci Lys³³, Asn¹³² a Asp¹⁴⁵. Přestože je tato oblast u flavonoid/CDK2 struktur obsazena N-methylpiperidinovým kruhem (De Azevedo et al. 1996), bylo spekulováno o tom, že další nárůst afinity derivátů olomoucínu může být pozorovatelný po připojení přídatných substituentů ke stávajícím C2 postranním řetězcům (Gray et al. 1998). Substituent s podobnými vlastnostmi však zatím nebyl připraven.

U všech tří analyzovaných purin/CDK2 komplexů rentgenovou strukturální analýzou je vázána aromatická N⁶-skupina v regionu mimo konzervativní ATP vazebné místo. Tato oblast je také obsazena fenylovou skupinou komplexů flavonoid/CDK2. Převládající typ interakcí je povahou hydrofobní a většinou zahrnuje interakce His⁸⁴, Phe⁸², Lys⁸⁹, Glu⁸ a Ile¹⁰ v CDK2. Převažuje názor, že interakce v této oblasti jsou zodpovědné za selektivitu jednotlivých derivátů purinů a flavonoidů. Právě 6-benzylamino skupina interaguje s oblastmi, které do styku s ATP vůbec nepřicházejí a jejich aminokyselinové zbytky jsou charakteristické pouze pro cyklin-dependentní kinasy. V komplexu staurosporin/CDK2 se v této oblasti váže C1-fenylový kruh. V tomto případě ale nevyčnívá tak daleko ze štěrbin jako je tomu např. u olomoucínu, kde N⁶-benzylový kruh nevytváří žádný významný kontakt s Leu¹⁰

prostřednictvím Van der Waalsových sil (Lawrie et al. 1997). Přídavné interakce mezi atomem chloru a postranním řetězcem Asp⁸⁶ byly pozorovány u purvalanolu B. Dvě rozdílné orientace byly pozorovány při cca 160° pootočení chlorofenylového kruhu, což naznačuje na částečně protonovaný stav Asp⁸⁶. Většina z vyzkoušených substitucí C4 anilinového kruhu trisubstituovaných purinů nesnižuje aktivitu, což může být využito pro jemné doladění SAR těchto inhibitorů.

4. Závěr

Studiem N⁶-substituovaných derivátů adeninu byly získány cenné informace pro vývoj dalších derivátů s významnými biologickými aktivitami, pro studium jejich výskytu v rostlinách, pro izolaci a identifikaci jejich nových metabolitů, pro vývoj imunodiagnostik k jejich kvantifikaci a imunodetekci a na závěr snad i pro vývoj potenciálních léčiv některých závažných lidských onemocnění. Mezi připravenými deriváty byly nalezeny sloučeniny schopné specificky a velmi účinně inhibovat některé cyklin-dependentní kinasy s výrazným vlivem na proliferaci nádorových buněčných linií *in vitro*, ale i látky, které nacházejí uplatnění v rostlinných biotechnologiích, zemědělství, a případně i kosmetickém průmyslu.

Získané výsledky lze shrnout v následujících bodech:

- 1) Podařilo se vyizolovat a identifikovat řadu nových, přirozeně se vyskytujících aromatických cytokininů. Jedná se zejména o hydroxy a methoxy deriváty 6-benzylaminopurinu. Tyto látky byly pojmenovány jako topoliny. Pro detekci, kvantifikaci i identifikaci těchto látek byly vypracovány originální analytické postupy založené zejména na kombinaci imunoafinitní chromatografie, HPLC-ELISA, GC-MS a HPLC-MS. Prokázali jsme, že se aromatické cytokininy vyskytují obecně v řadě rostlinných druhů a jsou tedy všeobecně rozšířeny fytohormony.
- 2) Připravili jsme velkou řadu nových derivátů aromatických cytokininů, jejichž biologická aktivita byla testována na úrovni receptorů, dále v několika cytokininových biotestech a rovněž v polních podmínkách. Některé z těchto látek vykazují velmi silnou cytokininovou aktivitu a již dnes nacházejí uplatnění v rostlinných biotechnologiích (zejména při mikropropagaci okrasných rostlin) a dále v kosmetickém průmyslu (inhibice senescence lidských fibroblastů).
- 3) Po nalezení olomoucínu jsme vyřešili základní vztahy mezi strukturou a aktivitou těchto látek pro CDK1 a 2. Podařilo se nám vyvinout mnohem účinnější purinové inhibitory CDK1 než olomoucín. Racionální design těchto látek a následná syntéza a testování poskytly účinné purinové inhibitory CDK, jakými jsou např. bohemin, roskovitin, olomoucín II a další. U těchto látek byla prokázána *in vivo* protinádorová účinnost na řadě zvířecích modelů. Roskovitin byl licencován firmou Cyclacel (Dundee, U.K.) a v současné době se nachází v II. fázi klinických zkoušek v Evropě.
- 4) Polární substitucí N⁶-benzylu dochází k výraznému zvýšení inhibiční aktivity 2,6,9-trisubstituovaných purinů pro CDK1. Na konci dlouhé série látek se podařilo nalézt derivát strukturou blízký původnímu olomoucínu. Jeho biologická aktivita v některých testech předčí i zatím neúčinnější inhibitor CDK purvalanol A. Nová sloučenina byla pojmenována olomoucín II.
- 5) Podařilo se rovněž prokázat statisticky významnou závislost mezi inhibicí CDK a antiproliferační aktivitou v řadě nádorových buněčných linií. Zjištěná závislost potvrzuje, že inhibici CDK purinovými deriváty je alespoň částečně zodpovědná za jejich antiproliferační účinky. Získané výsledky rovněž naznačují, že vedle CDK budou mít substituované puriny i další molekulární cíle.
- 6) Byla připravena a otestována strukturní analoga 2,6,9-trisubstituovaných purinů – 2,6,8,9-tetrasubstituované puriny. Substituce v poloze C8 vedly k poklesu inhibiční aktivity pro CDK1 ve srovnání s původními 2,6,9-trisubstituovanými puriny. Cytotoxický potenciál těchto látek však oproti olomoucínu, roskovitinu či purvalanolu A zůstal téměř nezměněn. Za výraznou cytotoxicitu tedy musí zodpovídat jiný mechanismus, než jakým je přímá inhibice CDK s následným zastavením buněčného cyklu. Toto zjištění pochopitelně představuje velkou výzvu při hledání buněčných cílů této skupiny látek. Podařilo se

připravit i velmi účinnou generaci látek na bázi pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů (blízce příbuzné s anticytokininy), které mají přibližně třikrát vyšší protinádorovou aktivitu než původní olomoucín a jeho deriváty.

- 7) Ko-krystalizací nejúčinnějších purinových derivátů s CDK2 a pomocí rentgenové strukturní analýzy byly zjištěny vazebné interakce mezi jednotlivými purinovými deriváty a CDK2. Tento přístup umožnil zavedení molekulového modelování a dokovacích technik při vývoji inhibitorů CDK.

Z příkladů uvedených v této disertační práci je zřejmé, že molekulární cíle buněčného cyklu jsou velkou nadějí při hledání nových léčiv závažných lidských onemocnění, jakými nádory a další hyperproliferativní onemocnění zajisté jsou. Věřme, že díky nástrojům, které má dnes věda v rukou, budeme schopni nalézt další nové látky ovlivňující nejen aktivitu, ale i expresi důležitých regulačních proteinů/genů buněčného dělení lidských, živočišných i rostlinných buněk.

5. Perspektivy výzkumu N⁶-substituovaných derivátů adeninu

Naším cílem je objasnit úlohu N⁶-substituovaných derivátů adeninu v rostlinných i živočišných buňkách a potenciálně využít těchto znalostí, nejen ke zvýšení produktivity zemědělských plodin a rostlinných biotechnologií, ale i k vývoji nových generací terapeuticky využitelných látek. Přiložený nástin zdaleka nevyčerpává celkový přehled našich aktivit v oblasti cytokininů, kterými bychom se chtěli zabývat. Snad je pouze nástřelem toho nejzajímavějšího, co bychom chtěli v nejbližší době studovat.

Bude zajímavé:

1) Připravit analoga aromatických cytokininů s vysokou morfogenní aktivitou v rostlinných *in vitro* kulturách, a tím výrazně zvýšit mikropropagační potenciál řady *in vitro* množených rostlinných druhů. Přínos vysoce aktivních derivátů 6-benzylaminopurinu (methoxy-, fluoro-, chloro, methyl- a dalších derivátů) není třeba zdůrazňovat. Naším zájmem je rovněž studovat účinnost nových derivátů na receptorové úrovni a studovat i jejich toxicitu. Mezi těmito látkami hledáme i ty, které dokáží inhibovat senescenci lidských fibroblastů. Víme rovněž, že většina známých cytokininů inhibuje CDK (rostlinné i živočišné) v mikromolárních koncentracích. Naším zájmem je vyvinout látky s minimálními inhibičními účinky pro rostlinné CDK. Vedle schopnosti inhibovat CDK mají některé cytokininy i schopnost inhibovat cytokininoxidasu (CKOx), čímž dochází k vzednutí hladin endogenních cytokininů. Bude určitě zajímavé tyto mechanismy detailně objasnit a hledat nejen látky s jedním mechanismem účinku, ale i takové, které jich kombinují více. Co přinesou a ukáží látky, které např. kombinují nulovou CDK inhibiční aktivitu s vysokou afinitou k cytokininovým receptorům a se silnou inhibiční aktivitou pro cytokininoxidasu. Nemohli bychom tak dospět k „supercytokininu“ nebo „superkinetinu“?

2) Vyvinout nové metodické přístupy pro analýzy fytohormonů, které budou založeny na purifikaci pomocí monoklonálních a polyklonálních protilátek. V případě, že se podaří vyvinout komplexní metodu analýzy cytokininů, pak předpokládáme, že bude možné poměrně jednoduše analyzovat minimálně 50 různých metabolitů cytokininů ve velmi krátkém časovém intervalu. První předpoklady již byly vytvořeny, neboť se nám podařilo nedávno vyvinout nový metodický postup pro analýzy cytokininů (je součástí předpokládaného schématu analýz), který je založen na purifikaci cytokininů pomocí monoklonální protilátky specifické pro cytokininy, která nerozpoznává povahu N⁶-postranního řetězce (nepublikováno). Taková protilátka může po imobilizaci na nerozpustný matrix vázat nejen široké spektrum známých isoprenoidních a aromatických cytokininů, ale i velké množství neznámých N⁶-substituovaných derivátů adeninu. Předběžné výsledky naznačily, že po aplikaci rostlinných extraktů na takovou imunoafinitní kolonu je možné získat dokonale přečištěné frakce, které obsahují zejména látky cytokininové povahy, což bylo prokázáno pomocí diode-array HPLC. Za významnou považujeme UV detekci řady neznámých látek cytokininové. Předpokládáme identifikovat tyto neznámé látky pomocí UV spektroskopie, GC/MS a HPLC/MS. Věříme, že tento nový metodický přístup snad nepovede v budoucnu k takovému znepráhlednění situace s cytokininy, jež je známá u giberelinů.

Z prezentovaného rovněž vyplývá, že bude nezbytné výrazně zdokonalit dělení cytokininů vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií. Pokusíme se i o zavedení kapilární elektroforézy, metody vykazující mnohem vyšší separační účinnost než klasická kapalinová chromatografie. Předpokládáme i zavedení nových technologií (elektrosprej HPLC/MS/MS, Q-Tof) pro identifikaci cytokininů hmotovou spektrometrií, které nám umožní identifikaci

intaktních molekul některých vysoce labilních látek cytokininové povahy jakými jsou nukleotidy, O-glukosidy a konjugáty s aminokyselinami. Chtěli bychom připravit i specifické protilátky pro O-glukosidy, které by nám poskytly možnost izolovat a stanovit intaktní molekuly těchto cytokininových metabolitů bez hydrolýzy β -glukosidasou.

3) Biosyntéza a metabolismus kontrolují endogenní hladiny ARCK v pletivech velmi striktně. Zvýšení jejich koncentrace po indukci signály z vnějšího prostředí je tak dramatické, že jiný proces, než uvolnění ribosidů či bazí z konjugovaných forem nepřichází v úvahu. Následující rychlý pokles úrovně CK v pletivech ukazuje i na vysoce účinný mechanismus metabolické inaktivace. Za základní strategii lze proto považovat charakterizaci drah tvorby a inaktivace cytokininů cestou biosyntézy, degradace či konjugace a identifikace faktorů ovlivňujících tyto procesy. Zvláštní pozornost v této oblasti budeme věnovat detailnímu popisu enzymů kontrolujících biosyntézu a degradaci cytokininů (rostlinné i bakteriální), jejich detailní charakterizaci a zařazení do EC, popisu mechanismu enzymových reakcí a expresi odpovídajících genů v rostlinách. Pokusíme se popřípadě i o izolaci a charakterizaci CKOx pro ARCK či cytokininsyntetasy v rostlinách. Máme na paměti jak vývoj inhibitorů CKOx, tak i IPT enzymů, neboť ty by mohly najít rovněž značné uplatnění v zemědělství.

4) Objasnit zvláštní úlohu cytokininů a strukturálně příbuzných látek při růstových regulacích v (ne)nádorových lidských a živočišných buňkách, kde konečným cílem by měly být nové generace protinádorových látek "specificky" indukujících apoptózu nádorových buněk. Antimitotické látky obecně prodlužují nebo inhibují buněčné dělení a jak bylo prokázáno, aktivují programované mechanismy odumírání buněk. Na druhé straně, pokles proliferacího potenciálu nádorových buněk jim může umožnit diferenciaci v normální buňky. Z těchto důvodů předpokládáme testovat antiproliferační, cytotoxickou a pro-diferenciační aktivitu olomoucínu a jeho strukturálních analogů na řadě lidských a živočišných buněčných linií. Vzhledem k tomu, že prodloužená mitóza může vést k programované smrti buněk, budeme dále analyzovat rozdíl mezi apoptotickým a nekrotickým způsobem smrti. Za velmi důležité při vývoji nové generace protinádorových látek na bázi rostlinných hormonů cytokininů pokládáme i testování jejich kancerotoxicity *in vivo* na zvířatech, studium farmakokinetiky a metabolismu vyvíjených derivátů, ale i jejich patologických a patofyziologických účinků. Věříme, že se nám podaří nalézt nové, vysoce účinné inhibitory cyklin-dependentních kinas, jež budou následně použitelné pro vývoj látek se specifickými cytostatickými účinky. Pokusíme se i objasnit zvláštní úlohu přirozeně se vyskytujících cytokininů při regulaci buněčného dělení (ne)nádorových rostlinných i živočišných buněk. Nedávné zjištění, že některé klasické cytokininy jsou velmi účinnými protinádorovými látkami vytváří další předpoklady pro vývoj nové generace přirozených cytostatických léčiv s prozatím neznámými molekulárními mechanismy účinku. Na druhé straně nebude nezajímavé se zabývat problematikou studia výskytu těchto přirozených, protinádorově aktivních cytokininů v potravinách a hledat tak pro další generace potravinové doplňky s preventivními protinádorovými účinky.

5) Předpokládáme i vývoj nových generací léčiv řady závažných lidských onemocnění, jejichž základem budou $N^6(C6)$ -substituované adeniny (puriny). V současné době již vyvíjíme nová virostatika, zejména ta sloužící k léčbě AIDS, dále látky s antiinflamatorními (záducha, vysoký krevní tlak či alergie), antimikrobiálními (antibiotika), imunosupresivními a dalšími léčebnými účinky. Máme již několik nových agonistů a antagonistů α - a β -adrenergických receptorů na bázi cytokininů, které mají mnohem silnější účinky, než všechny dosud používané látky. Struktury není prozatím možné prezentovat, neboť se jedná o látky, které jsou v patentovém řízení.

6. Použitá literatura

- Abraham, R.T., Acquarone, M., Andersen, A., Asensi, A., Belle, R., Berger, F., Bergounioux, C., Brunn, G., Buquet-Fagot, C., Fagot, D., Glab, N., Goudeau, H., Goudeau, M., Guerrier, P., Houghton, P. J., Hendriks, H., Kloareg, B., Lippai, M., Marie, D., Maro, M., Meijer, L., Mester, J., Mulner-Lorillon, O., Poulet, S. A., Schierenberg, E., Schutte, B., Vaultot, D., Verhac, M. C.: *Biol. Cell* **83**: 105, 1995.
- Arris, C. E., Boyle, F. T., Calvert, A. H., Curtin, N. J., Jewsbury, P. J., Endicott, J. A., Gibson, A. E., Golding, B. T., Grant, S., Griffin, R. J., Johnson, L. N., Noble, M. E. M., Newell, D. R.: *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **40**: Abstract 2021, 1999.
- Arris, C., Boyle, F., Calvert, A., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Garman E.F., E.Gibson, A. E., Golding, B. T., Grant, S., Griffin, R. J., Jewsbury, P., Johnson, L. N., Lawrie A. M., Newell, D. R., Noble M. E. M., Sausville E. A., Schultz R., Wyatt Y.: *J. Med. Chem.* **43**, 2797.
- Baroja-Fernandez, E., Aguirreolea, J., Martinková, H., Hanuš, J., Strnad, M.: *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 217, 2002.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T.: *Nature* **411**: 342, 2001.
- Bojanowski K., Nishio K., Fukuda M., Larsen A.K., Saijo N.: *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1574, 1994.
- Corse, J., Pacovský, R.S., Lyman, M.L., Brandon, D.L.: *J. Plant Growth Regul.* **8**: 211, 1989.
- Damman, L.G., Leonard, N.J., Schmitz, R.Y., Skoog, F.: *Phytochemistry* **13**: 329, 1974.
- De Azevedo, W. F. Jr., Mueller-Dieckmann, H.J., Schulze-Gahmen, U., Worland, P. J., Sausville, E., Kim, S. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2735, 1996.
- De Azevedo, W. F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlíček, L., Strnad, M., Kim, S.- H.: *Eur. J. Biochem.* **243**: 518, 1997.
- De Bont, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., Kim S.H.: *Nature* **363**: 595, 1993.
- Doerner, P., Jorgensen, J.E., You, R., Stepuhn, J., Lamb, C *Nature* **380**: 520, 1996.
- Doležal, K., Āstot, C., Hanuš, J., Holub, J., Peters, W., Beck, E., Sandberg, G., Strnad, M.: *Plant Growth Regul.* **36**: 181, 2002.
- Ducrot, P., Legraverend, P. D. M., Grierson, D. S.: *J. Med. Chem.* **43**: 4098, 2000.
- Duke, C.C., Letham, D.S., Parker, C.W., MacLeod, J.K., Summons, R.E.: *Phytochemistry* **18**: 819, 1979.
- Ernst, D., Schäfer, W., Oesterhelt, D.: *Planta* **159**: 222, 1983.
- Fletcher, R.A., McCullagh, D.F.: *Planta* **101**: 88, 1971.
- Fox, J. E., Sood, K.C., Buckwalter, B., McChesney, J.D *Plant Physiol.* **47**: 275-281, 1971.
- Fox, J. E., Erion, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**: 695, 1975.
- Fox, J. E., Erion, J.: In: Pilet, P. E. (ed.): *Plant Growth Regulation*. Pp. 139-146. Springer-Verlag, New York 1977.
- Fusseder, A., Ziegler, P.: *Planta* **173**: 104, 1988.
- Gadbois, D.M., Hamaguchi, J.R.: Swank, R.A., Bradbury, E.M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 80, 1992.
- Goicoechea, N., Doležal, K., Antolín, M.C., Strnad, M., Sánchez-Díaz, M.: *J. Exp. Botany* **46**: 1543, 1995.
- Goicoechea, N., Antolín, M.C., Strnad, M., Sánchez-Díaz, M.: *J. Exp. Botany* **47**: 683, 1996.
- Gray, N. S., Kwon, S., Schultz, P. G.: *Tetrahedron Lett* **38**: 1161, 1997.
- Gray, N.S., Wodicka, L., Thunnissen, A.-M.W.H., Norman, T., Kwon, S., Espinoza, H., Morgan, D.O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S.-H., Lockhart, D.J., Schulttz, P.G.: *Science* **281**: 533, 1998.
- Haberer, G., Kieber, J.J.: *Plant Phys.* **128**: 354, 2002.
- Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M.: *J. Med. Chem.* **40**: 408, 1997.
- Herwig S., Strauss M.: *Eur J Biochem* **246**: 58, 1997.
- Hewett, E.W., Wareing, P.F.: *Planta* **114**: 119, 1973.
- Hoeijmakers, J.H.J.: *Nature* **411**: 366, 2001.
- Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D.E., Strnad, M.: *Plant Growth Regul.* **26**: 109, 1998.
- Holub, J., Hanuš, J., Strnad, M.: VII. Conference on Plant Physiology. Nitra, Slovak Republic, 101, 1995.
- Holub, J., Hanuš, J., Vaněk, T., Strnad, M.: 14th Conf. on Plant Growth Substances, Amsterdam, 70, 1991.
- Horgan, R., Hewett, E.W., Purse, J.G., Wareing, P.F.: *Tetrahedron Lett.* **30**: 2827, 1973.
- Horgan, R., Hewett, E.W., Horgan, J., Purse, J., Wareing, P.F.: *Phytochemistry* **14**: 1005, 1975.
- Horgan, R., Scott, I.M.: In: Rivier, L., Crozier, A. (eds.): *The Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. Vol. 2. Pp. 303-365. Academic Press, London 1987.
- Horgan, R.: In: Kamínek, M., Mok, D.W.S., Zažímalová, E., (eds.): *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. Pp. 3-13. SPB Academic Publ., The Hague 1992.
- Chaves das Neves, H.J., Pais, M.S.S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1387, 1980a.

- Chaves das Neves, H.J., Pais, M.S.S.: *Tetrahedron Lett.* **21**: 4387, 1980b.
- Chmela, Z., Veselý, J., Lemr, K., Rypka, M., Hanuš, J., Havlíček, L., Kryštof, V., Michnová, L., Fuksová, K., Lukeš, J.: *Drug Metabol. Disp.* **29**: 326, 2001.
- Iwamura, H., Fujita, T., Koyama, S., Koshimiza, K., Kumazawa, Z.: *Phytochemistry* **19**: 1309, 1980.
- Jeffrey P.D., Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N.P.: *Nature* **376**: 313, 1995.
- Jindrová, M., Kubaláková, M., Strnad, M.: VII. Conference on Plant Physiology. Nitra, Pp. 66, 1995.
- Jones, L.H., Martínková, H., Strnad, M., Hanke, D.: *J. Plant Growth Regul.* **15**: 39, 1996.
- Kamínek, M., Vaněk, T., Motyka, V.: *J. Plant Growth Regul.* **6**: 113, 1987.
- Kawakami, K., Futami, H., Takahara, J., Yamaguchi, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**: 778, 1996.
- Keim, P., Erion, J., Fox, J.E.: In: Guern, J., Péaud-Lenoël, C. (eds.): *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Pp.179-190. Springer-Verlag, Berlin 1981.
- Kende, H., Tavares, J. E.: *Plant Physiol.* **43**: 1244, 1968.
- Keyomarsi, K., Pardee, A.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 112, 1995.
- Kitagawa, M., Okaba, T., Ogino, H., Matsumoto, H., Suzuki-Takahashi, I., Kokubo, T., Kihashi, H., Saitoh, S., Taya, Y., Yasuda, H., Ohba, Y., Nishimura, S., Tanaka, N., Okuyama, A.: *Oncogene* **8**: 2425, 1993.
- Ko J.L., Prives C.: *Genes Dev* **10**: 1054, 1996.
- Kryštof, V., Lenobel, R., Havlíček, L., Kuzma, M., Strnad, M.: *Bioorg Med Chem Lett* **12**: 3283, 2002.
- Kubaláková, M., Strnad, M.: *Biol. Plant.* **34** (Suppl.): 578, 1993.
- Kuraishi, S.: *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo*, **9**: 67, 1959.
- Laloue, M., Terrine, C., Gawer, M.: *FEBS Let.* **46**: 45, 1974.
- Laloue, M., Terrine, C., Gawer, M.: *Physiol. Veg.* **13**: 781, 1975.
- Laloue, M., Terrine, C., Guern, J.: *Plant Physiol.* **59**: 478, 1977.
- Laloue, M., Pethe-Terrine, C., Guern, J.: In: Guern, J., Péaud-Lenoël, C., (eds.): *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Pp.80-96. Springer-Verlag, Berlin 1981.
- Laloue, M., Pethe, C.: In: Wareing, P.F. (ed.): *Plant Growth Substances 1982*. Pp. 185-195. Academic Press, London 1982.
- Laloue, M., Fox, J.E.: In: Bopp, M., Knopp, B., Rademacher, W. (eds.): *Abstract of 12th International Conference on Plant Growth Substances*. Pp. 23. Heidelberg 1985.
- Laloue, M., Fox, J.E.: *Plant Physiol* **90**: 899, 1989.
- Lawrie, A. M., Noble, M. E., Tunnah, P., Brown, N. R., Johnson, L. N., Endicott, J. A.: *Nature Struct. Biol.* **4**: 796, 1997.
- Legravered, M., Ludwig, O., Bisagni, E., Leclerc, S., Meijer, L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 793, 1998.
- Legravered, M., Ludwig, O., Leclerc, S., Meijer, L.: *J. Heterocyclic Chem.* **38**: 299, 2001.
- Letham, D.S.: *Planta* **181**: 361, 1974.
- Letham, D.S.: In: Letham, D.S., Goodwin, P.B., Highins, T.J.W. (eds.): *Phytohormones and Related Compounds*. Pp. 205-249. Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Amsterdam 1978.
- Letham, D.S., Summons, R.E., Parker, C.W., MacLeod, J.K.: *Planta* **146**: 71, 1979.
- Letham, D.S., Palni, L.M.S., Tao, G.-Q., Gollnow, B.I., Bates, C.M.: *J. Plant Growth Regul.* **2**: 103, 1983.
- Letham, D.S., Palni, L.M.S.: *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **34**: 163, 1983.
- Letham, D.S., Zhang, R.: *Plant Sci.* **64**: 161, 1989.
- Letham, D.S.: In: Pharis, R.P., Rood, S.B. (eds.): *Plant Growth Substances*. Pp. 275-281. Springer-Verlag, Berlin 1990.
- Losiewicz, M. D., Carlson, B. A. Kaur, G., Sausville, E. A., Worland, P. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 589, 1994.
- MacLeod, J.K., Summons, R.E., Letham, D.S.: *J. Org. Chem.* **41**: 3959, 1976.
- Maller J.L., Gautier J., Langan T.A., Lohka M.J., Shenoy S., Shalloway D., Nurse P.: *J Cell Sci Suppl* **12**: 53, 1989.
- Masaque, J., Blain, S.W., Lo, R.S.: *Cell* **103**: 295, 2000.
- Matsubara, S.: *Phytochemistry* **19**: 2239, 1980.
- Meijer L.: *Trends in Cell Biology* **6**: 393, 1996.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G., Moulinoux, J. P.: *Eur. J. Biochem.* **243**: 527, 1997.
- Meijer, L.: *Prog. Cell Cycle Res.* **1**: 351, 1995.
- Meins, F., Jr.: *Annu. Rev. Genet.* **23**: 395, 1989.
- Meyer, T., Zimmermann, J., Geiger, T., Mett, H., Buchdunger, E., Müller, M., Ofeilly, T., Cozens, R., Ruetz, S., Fabbro, D.: *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **39**: Abst. 3794, 1998.
- Miller, C.O., Skoog, F., van Salza, M.H., Strong, F.M.: *J. Am. Chem. Soc.* **77**: 1392, 1955.
- Mok, D.W.S., Mok, M.C.: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994.

- Mok, D.W.S., Mok, M.C., Martin, R.C., Bassil, N.V., Lightfoot, D.A.: In: Karssen, C.M., van Loon, L.C., Vreugdenhil, D. (eds.): *Progress in Plant Growth Regulation*. Pp. 597-606. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992.
- Mok, M.C., Mok, D.W.S., Marsden, K.E., Shaw, G.: *J. Plant Physiol.* **130**: 423, 1987.
- Mok, M.C., Mok, D.W.S.: *Plant Physiol.* **84**: 596, 1987.
- Moravec, J., Kryštof, V., Hanuš, J., Havlíček, L., Moravcová, D., Fuksová, K., Kuzma, M., Lenobel, R., Otyepka, M., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 2993, 2003.
- Moravcová, D., Kryštof, V., Havlíček, L., Moravec, J., Lenobel, R., Strnad, M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 2989, 2003.
- Motyka, C., Kamínek, M.: In: Kamínek, M., Mok, D.W.S., Zažímalová, E. (eds.): *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. Pp. 33-39. SPB Academic Publ., The Hague, 1992.
- Mueller P.R., Coleman T.R., Kumagai A., Dunphy W.G.: *Science* **270**: 86, 1995.
- Nandi, S.K., Letham, D.S., Palni, L.M.S., Wong, O.C., Summons, R.E.: *Plant Sci.* **61**: 189, 1989.
- Nath, J., Rebhun, L. I.: *Exp. Cell Res.* **77**: 319, 1973.
- Nishio, K., Ishida, T., Arioka, H., Kurokawa, H., Fukuoka, K., Nomoto, T., Fukumoto, H., Yokote, H., Saijo, N.: *Anticancer Res.* **16**: 3387, 1996.
- Nugiel, D.A., Cornelius L. A. M., Corbett, J. W.: *J. Org. Chem.* **6**: 201, 1997.
- Nurse, P.: *Nature* **344**: 503, 1990.
- Oh, C. H., Lee, S.C., Lee, K. S., Woo, E. R., Hong, C. Y., Yang, B. S., Baek, D. J., Cho, J. H.: *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **332**: 187, 1999.
- Ohashi M., Sukigawa E., Nakanishi N.: *Jpn J Cancer Res* **96**: 819, 1995.
- Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N.: *Jpn. J. Cancer Res.* **86**: 81, 1995.
- Ördög, V., Stirk, W.A., van Staden, J., Novák, O., Strnad, M.: *J. Phycol.* **1**: 88, 2004.
- Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., Sieglarová V., Strnad M., Koča J.: *J Med Chem* **43**: 2506, 2000.
- Pačes, V., Rosenberg, I., Kamínek, M., Holý, A.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* **42**: 2452, 1977.
- Palni, L.M.S., Palmer, M.V., Letham, D.S.: *Planta* **160**: 242, 1984.
- Parker C.W., Entsch B., Letham D.S.: *Phytochemistry* **25**: 303, 1986.
- Parker, C.W., Letham, D.S., Gollnow, B.I., Summons, R.E., Duke, C.C., MacLeod, J.K.: *Planta* **142**: 239, 1978.
- Pietrafesa, W.J., Blaydes, D.F.: *Physiol. Plant.* **53**: 249, 1981.
- Raman, N., Elumalai, S.: *Ind. J. Exp. Biol.* **34**: 577, 1996.
- Ratti, N., Jonardhana, K.K.: *Ind. J. Exp. Biol.* **34**: 1126, 1996.
- Rialet V., Meijer L.: *Anticancer Res* **11**: 1581, 1991.
- Richtmyer, N.K., Yeakel, E.H.: *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 2495, 1934.
- Rosania, G. R., Merlie, J., Gray, N., Chang, Y.-T., Schultz, P. G., Heald, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4797, 1999.
- Rovers, K., Assoian, R.K.: *BioEssays* **22**: 818, 2000.
- Rypka, M., Veselý, J., Chmela, Z., Rigrová, D., Červenková, K., Havlíček, L., Lemr, K., Hanuš, J., Černý, B., Lukeš, J., Michalíková, K.: *Xenobiotika* **32**: 1017, 2002.
- Sáenz, L., Jones, L.H., Oropeza, Vláčil, D., Strnad, M.: *Plant Growth Regul.* **39**: 205, 2003.
- Sangfelt, O., Ericksom, S., Grandner, D.: *Front. Biosci.* **5**: D479, 2000.
- Sedláček, H. H., Czech, J., Naik, R., Kaur, G., Worland, P., Losiewicz, M., Parker, B., Carlson, B., Smith, A.: *Int. J. Oncol.* **9**: 1143, 1996.
- Sherr, C.J.: *Science* **274**: 1672, 1996.
- Schow, S.R., Mackman, R.L., Blum, C.L., Brooks, E., Horsma, A.G., Joly, A., Kerwar, S.S., Lee, G., Shiffman, D., Nelson, M., Wang, X., Wick, M.M., Zhang, X., Lum, R.T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**: 2697, 1997.
- Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L., Kunick, C.: *J. Med. Chem.* **42**: 2909, 1999.
- Schulze-Gahmen, U., Brandsen, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., Meijer, L., Veselý, J. & Kim, S. H.: *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **22**: 378, 1995.
- Schulze-Gahmen, U., De Bondt, H. L., Kim, S. H.: *J. Med. Chem.* **39**: 4540, 1996.
- Sielecki, T.M., Boylan, J.F., Benfield, P.A., Trainor, G.L.: *J. Med. Chem.* **43**: 1, 2000.
- Skinner, C.G., Shive, W.: *J. Chem. Soc.* **77**: 6692, 1955.
- Skoog, F., Armstrong, D.J.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**: 359, 1970.
- Skoog, F., Hamzi, H.Q., Szweykowska, A.M., Leonard, A.J., Carraway, K.L., Fuji, T., Helgeson, J.P., Loepfky, R.N.: *Phytochemistry* **6**: 1169, 1967.
- Skoog, F., Miller, C.O.: *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**: 118, 1957.
- Spíchal, L., Natalia Yu. Rakova N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Strnad, M., Georgy A. Romanov, G.A., Schmölling, T.: *Plant Cell Physiol.* 2004 (in press).

- Stirk, W.A., Novák, O., Strnad, M., Van Staden, J.: *Plant Growth Regul.* **41**: 13, 2003.
- Stirk, W.A., Arthur, G.D., Lourens, A.F., Novák, O., Strnad, M., van Staden, J.: *J. Appl. Phycol.* **16**: 31, 2004.
- Strnad, M.: *J Plant Growth Regul.* **15**:179, 1996.
- Strnad, M. *Physiol. Plant.* **101**: 674, 1997.
- Strnad, M., Hanuš, J., Peters, W., Beck, E.: *Phytochemistry* **37**: 1059, 1994.
- Strnad, M., Hanuš, J., Vaněk, T., Kamínek, M., Hanke, D.E.: *Phytochemistry* **45**: 213, 1997.
- Strnad, M., Peters, W., Beck, E., Kamínek, M.: *Plant Physiol.* **99**: 74, 1992b.
- Strnad, M., Vaněk, T., Binarová, P., Kamínek, M. & Hanuš, J.: In: Kutáček, M., Elliott, M.C., Macháčková, I., (eds.): *Molecular Aspects of Hormonal Regulation of Plant Development*. Pp. 41-54. SPB Academic Publ., The Hague 1990.
- Strnad, M., Vereš, K., Hanuš, J., Siglerová, V.: In: Kamínek, M., Mok, D.W.S., Zažímalová, E., (eds.): *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. Pp. 78-92. SPB Academic Publ., The Hague 1992a.
- Strnad, M.: *Biol. Plant.* **34** (Suppl.): 58, 1993.
- Sussman, M.R., Kende, H.: *Planta* **140**: 251, 1978.
- Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Āstot, C., Schmülling, T., Holub, J., Fuksová, K., Sandberg, G., Strnad, M.: *Physiol. Plant.* **117**: 579, 2003
- Toledo L.M., Lydon L.B.: *Structure* **5**: 1551, 1997.
- Vaňková, R.: In: Strnad, M., Peč, P., Beck, E. H., (eds.), *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*. Pp. 67-78. Peres Publ., Prague, 1999.
- Van Staden, J., Drewes, F. E. J. *Plant Physiol.* **140**: 92, 1992.
- Van Staden, J., Drewes, F. E.: *J Plant Growth Regul.* **10**: 109, 1991.
- Vermeulen, K., Strnad, M., Kryštof, V., Havlíček, L., Aa, A., Lenjou, M., Nijs, G., Rodrigus, I., Stockman, B., Onckelen, H., Bockstaele, DR., Berneman, Z.N.: *Leukemia* **16**: 299, 2002.
- 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.: *Eur. J. Biochem.* **224**: 771, 1994.
- Werbrouck, S.P.O., Strnad, M., Van Onckelen, H.A., Debergh, P.C.: *Physiol. Plant.* **98**: 291, 1996.
- Werner, T., Hanuš, J., Holub, J., Schmulling, T., Van Onckelen, H., Strnad, M.: *Physiol. Plant.* **118**: 127, 2003.
- Young, H., Letham, D.S.: *Phytochemistry* **8**:1199, 1969.
- Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A. M., Lahusen, T., Kunick, K., Meijer, L., Sausville, E. A.: *Cancer Res.* **59**: 2566, 1999.
- Zhang, R., Letham, D.S., Wong, O.C., Nooden, L.D., Parker, C.W.: *Plant Physiol.* **83**: 334, 1987.
- Zhang, R., Letham, D.S.: *J. Plant Growth Regul.* **8**: 181, 1989.
- Zhu, L., Skoultchi, A.I.: *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 91, 2001.

7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI - Miroslav Strnad (IF 1996-2003)

BOOKS

- 1) STRNAD, M., PEČ, P., BECK, E.: Advances in Regulation of Plant Growth and Development. Peres Publ., Prague, 1999, 258 p. ISBN 80-86360-06-7.

CYTOKININS

A) PATENTS

- 2) STRNAD, M.: Conjugates of enzymes with haptens and ways of preparation. - PV 04387-89.
- 3) STRNAD, M., KAMÍNEK, M., ŘÍHOVÁ, B., VANĚK, T.: Way of preparation of enzyme immunoassays for estimation of 6-(o-hydroxybenzylamino)purinylriboside. - PV 01133-89.
- 4) DOLEŽAL, K., POPA, I., ZATLOUKAL, M., LENOBEL, R., HRADECKÁ, D., VOJTĚŠEK, B., ULDRIJAN, S., MLEJNEK, P., WERBROUCK, S., STRNAD, M.: Substitution derivatives of N⁶-benzyladenosine, way of their preparation, these derivatives as medical drugs, cosmetic preparations and growth regulators. - Czech Patent Application PV 2002-4273.

B) CHAPTERS IN BOOKS AND PROCEEDINGS

- 5) STRNAD, M., VANĚK, T., BINAROVÁ, P., KAMÍNEK, M., HANUŠ, J.: Enzyme immunoassays for cytokinins and their use for immunodetection of cytokinins in alfalfa cell culture. Pp. 41-54. In: Kutáček, M., Elliot, M.C., Macháčková, I. (eds.), Molecular Aspects of Hormonal Regulation of Plant Development, SPB Academic Publ., The Hague, 1990.
- 6) STRNAD, M., VEREŠ, K., HANUŠ, J., SIGLEROVÁ, V.: Immunological methods for quantification and identification of cytokinins. Pp. 437-446. In: Kamínek, M., Mok, M.C.C., Zažímalová, E. (eds.), Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants, SPB Academic Publ., The Hague 1992.
- 7) MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., STRNAD, M., EDER, J.: Cytokinin changes during photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. Pp. 353-356. In: Kamínek, M., Mok, M.C.C., Zažímalová, E. (eds.), Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants, SPB Academic Publ., The Hague 1992.
- 8) PRINSEN, E., REDIG, P., STRNAD, M., GALIS, I., VAN DONGEN, W., VAN ONCKELEN, H.: Quantifying phytohormones in transformed plants. pp. 245-262. In: Gartland, K., Davey, M. (eds.), Methods in Molecular Biology, *Agrobacterium* protocols., Humann Press Inc., N. Jersey, 1995.
- 9) GALUSZKA, P., FRÉBORT, I., ŠEBELA, M., STRNAD, M., PEČ, P.: Cytokinin oxidase: the key enzyme in the biodegradation of cytokinins. pp. 39-48. In: Strnad, M., Peč, P., Beck, E. H. (eds.), Advances in Regulation of Plant Growth and Development, Peres Publ., Prague, 1999.
- 10) STRNAD, M.: Protocols for quantification of phytohormones in plants and mycorrhiza. Pp. 1-13, Cost E6, Eurosilva Forest Tree Physiology Technical Workshop: Methods in Root-Soil Interactions Research, Slovenia, September 1999,

C) ARTICLES IN THE IMPACTED JOURNALS (IF > 0.5)

- 11) STRNAD, M., PETERS, W., BECK, E., KAMÍNEK, M.: Immunodetection and identification of N⁶-(o-hydroxybenzylamino)purine as naturally occurring cytokinin in *Populus x canadensis* cv Robusta leaves. - Plant Physiol. **99**: 74-80, 1992. **IF = 4,521**

- 12) MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., EDER, J., SEIDLOVÁ, F., STRNAD, M.: Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. - *Physiol. Plant.* **87**:160-166, 1993. **IF = 2,160**
- 13) STRNAD, M., PETERS, W., HANUŠ, J., BECK, E.: *Ortho*-topolin-9-glucoside, a new aromatic cytokinin from *Populus x canadensis* cv Robusta leaves. - *Phytochemistry* **37**:1059-1062, 1994. **IF = 1,179**
- 14) GOICOECHEA, N., DOLEŽAL, K., ANTOLÍN, M.C., STRNAD, M., SÁNCHEZ-DÍAZ, M.: Influence of mycorrhizae and *Rhizobium* on cytokinin content in drought-stressed alfalfa. - *J. Exp. Botany* **46**: 1543-1549, 1995. **IF = 2,218**
- 15) GOICOECHEA, N., ANTOLÍN, M.C., STRNAD, M., SÁNCHEZ-DÍAZ, M.: Root cytokinins, acid phosphatase and nodule activity in drought-stressed mycorrhizal or nitrogen fixing alfalfa plants. - *J. Exp. Botany* **47**: 683-686, 1996. **IF = 2,218**
- 16) FAISS, M., STRNAD, M., REDIG, P., DOLEŽAL, K., HANUŠ, J., Van ONCKELEN, H., SCHMULLING, T.: Chemically induced expression of the *rolC* encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyse endogenous cytokinin glucosides in *planta*. - *Plant J.* **10**: 33-46, 1996. **IF = 5,765**
- 17) JONES, L.H., MARTÍNKOVÁ, H., STRNAD, M., HANKE, D.: Occurrence of aromatic cytokinins in oil palm. - *J. Plant Growth Regul.* **15**: 39-49, 1996. **IF = 0,824**
- 18) MOTYKA, V., FAISS, M., STRNAD, M., KAMÍNEK, M., SCHMULLING, T.: Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. - *Plant Physiol.* **112**: 1035-1043, 1996. **IF = 4,521**
- 19) WERBROUCK, S.P.O., STRNAD, M., VAN ONCKELEN, H.A., DEBERGH, P.C.: *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? - *Physiol. Plant.* **98**: 291-297, 1996. **IF = 2,160**
- 20) STRNAD, M.: Enzyme immunoassay for N^6 -benzyladenine and N^6 -(3-hydroxybenzyl)-adenine cytokinins. - *J Plant Growth Regul.* **15**: 179-188, 1996. **IF = 0,824**
- 21) FAISS, M., ZALUBILOVÁ, J., STRNAD, M., SCHMULLING, T.: Conditional expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signalling in whole tobacco plants. - *Plant J.* **12**: 401-415, 1997. **IF = 5,765**
- 22) STRNAD, M., HANUŠ, J., VANĚK, T., KAMÍNEK, M., HANKE, D.E.: *meta*-Topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*). - *Phytochemistry* **45**: 213-218, 1997. **IF = 1,179**
- 23) STRNAD, M. The aromatic cytokinins. - *Physiol. Plant.* **101**: 674-688, 1997. **IF = 2,160**
- 24) VAŇKOVÁ, R., GAUDINOVÁ, A., SÜSSENBEKOVÁ, H., DOBREV, P., STRNAD, M., HOLÍK, J., LENFELD, J.: Comparison of oriented and random immobilisation in immunoaffinity chromatography of cytokinins. - *J. Chrom.* **811**: 77-84, 1998. **IF = 2,321**
- 25) HOLUB, J., HANUŠ, J., HANKE, D.E., STRNAD, M.: Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. - *Plant. Growth Regul.* **26**: 109-115, 1998. **IF = 0,824**
- 26) GALUSZKA, P., ŠEBELA, M., LUHOVÁ, L., ZAJONCOVÁ, L., FRÉBORT, I., STRNAD, M., PEČ, P.: Cytokinins as inhibitors of copper amine oxidase. - *J. Enz. Inhib.* **13**: 457-463, 1998. **IF = 0,887**
- 27) DEWITTE, W., CHIAPPETTA, A., AZMI, A., WITTERS, E., STRNAD, M., REMBUR, J., NOIN, M., CHRIQUI, D., VAN ONCKELEN, H.: Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day neutral tobacco during floral transition and flower formation. - *Plant Physiol.* **119**: 111-121, 1999. **IF = 4,521**

- 28) RUPP, H.-M., FRANK, M., WERNER, T., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T.: Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. - *Plant J.* **18**: 557-563, 1999. **IF = 5,765**
- 29) TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., BILER, M.; HAJDŮCH, M., BROŽ, P., DOLEŽAL, K., HOLUB, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Synthesis, characterisation and biological activity of two nickel(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine. - *Transition Met. Chem.* **25**: 265-269, 2000. **IF = 0,684**
- 30) TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., BILER, M., HAJDŮCH, M., BROŽ, P., DOLEŽAL, K.; HOLUB, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Synthesis, characterisation and biological activity of two nickel(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine. - *Transition Met. Chem.* **25**: 265-269, 2000. **IF = 0,684**
- 31) WERNER, T., MOTYKA, V., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T.: Regulation of plant growth by cytokinin. - *PNAS* **98**: 10487-10492, 2001. **IF = 10,789**
- 32) MALOŇ, M., TRÁVNÍČEK, Z., MARYŠKO, M., ZBOŘIL, R., MAŠLÁŇ, M., MAREK, J., DOLEŽAL, K., ROLČÍK, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Metal complexes as anticancer agents. Iron(III) and copper(II) bio-active complexes with 6-benzylaminopurine derivatives. - *Inorg. Chim. Acta.* **323**: 119-129, 2001. **IF = 1,394**
- 33) TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., ŠINDELÁŘ, Z., DOLEŽAL, K., ROLČÍK, J., KRYŠTOF, V., STRNAD, M., MAREK, J.: Preparation, physicochemical properties and biological activity of copper(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine (HL₁) or 6-(3-chlorobenzylamino)purine (HL₂). The single-crystal X-ray structure of /Cu(H⁺L₂)Cl₃/Cl.H₂O. - *J. Inorg. Biochem.* **84**: 23-32, 2001. **IF = 1,729**
- 34) BAROJA-FERNANDEZ, E., AGUIRREOLEA, J., MARTÍNKOVÁ, H., HANUŠ, J., STRNAD, M.: Endogenous cytokinins in two micropropagated potato cultivars in relation to transplanting survival. - *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 217-224, 2002. **IF = 1,582**
- 35) DOLEŽAL, K., ĀSTOT, C., HANUŠ, J., HOLUB, J., PETERS, W., BECK, E., SANDBERG, G., STRNAD, M.: Identification of aromatic cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid -chromatography/frit - fast atom bombardment mass spectrometry. - *Plant Growth Regul.* **36**: 181-189, 2002. **IF = 0,850**
- 36) MALOŇ, M., TRÁVNÍČEK, Z., MARYŠKO, M., MAREK, J., DOLEŽAL, K., ROLČÍK, J., STRNAD, M.: Synthesis, characterisation and antitumour activity of copper(II) 6-(4-chlorobenzylamino)purine complexes. X-ray structure of 6-(4-chloro-benzylamino)purinium perchlorate. - *Transition Met. Chem.* **27**: 580-586, 2002. **IF = 0,949**
- 37) ROLČÍK, J., LENOBEL, R., SIGLEROVÁ, V., STRNAD, M.: Isolation of melatonin by : immunoaffinity chromatography. - *J. Chromatogr. B* **775**: 9-15, 2002. **IF = 1,913**
- 38) TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., POPA, I., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: Preparation and cytotoxic activity of nickel (II) complexes with 6-benzylaminopurine derivatives - *Transition Met. Chem.* **27**: 918-923, 2002. **IF = 0,949**
- 39) TARKOWSKÁ, D., DOLEŽAL, K., TARKOWSKI, P., ĀSTOT, C., SCHMÜLLING, T., HOLUB, J., FUKSOVÁ, K., SANDBERG, G., STRNAD, M.: Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana*, poplar leaves and *Agrobacterium tumefaciens* strains by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit - fast atom bombardment mass spectrometry. - *Physiol. Plant.* **117**: 579-590, 2003 **IF = 1,565**
- 40) LAUKENS, K., LENOBEL, R., STRNAD, M., VAN ONCKELEN, H., WITTERS, E.: Cytokinin affinity purification and identification of a tobacco adenosine BY-2 kinase. - *FEBS Lett.* **533**: 63-66, 2003. **IF = 3,912**
- 41) NOVÁK, O., TARKOWSKI, P., TARKOWSKÁ, D., DOLEŽAL, K., LENOBEL, R., STRNAD, M.: Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. - *Anal. Chim. Acta* **480**: 207-218, 2003. **IF = 2,114**

- 42) SÁENZ, L., JONES, L.H., OROPEZA, VLÁČIL, D., STRNAD, M.: Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). – Plant Growth Regul. **39**: 205-215, 2003. **IF = 0,850**
- 43) WERNER, T., HANUŠ, J., HOLUB, J., SCHMULLING, T., VAN ONCKELEN, H., STRNAD, M.: New cytokinin metabolites in IPT transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. - Physiol. Plant. **118**: 127-137, 2003. **IF = 1,565**
- 44) TRÁVNÍČEK, Z., MALOŇ, M., ZATLOUKAL, M., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., MAREK J: Mixed ligand complexes of platinum(II) and palladium(II) with cytokinin-derived compounds Bohemine and Olomoucine: X-ray structure of $[Pt(BohH^+-N7)Cl_3] \cdot 9/5 H_2O$ {Boh = 6-(benzylamino)-2-[(3-(hydroxypropyl) amino]-9-isopropylpurine, Bohemine}. – J. Inorg. Biochem. **94**: 307-316, 2003. **IF = 2,204**
- 45) STIRK, W.A., NOVÁK, O., STRNAD, M., VAN STADEN, J.: Cytokinins in macroalgae. - Plant Growth Regul. **41**: 13-24, 2003. **IF = 0,850**

D)ARTICLES IN THE IMPACTED JOURNALS (IF = 0.1 – 0.5)

- 46) TRÁVNÍČEK, Z., MAREK, J., DOLEŽAL, K., STRNAD, M.: The structure of 6-(2-hydroxybenzylamino)purine acetic acid solvate.- Z. Kristallogr. **212**: 538-541, 1997. **IF = 0,447**
- 47) KRAIGHER, H., STRNAD, M., HANKE, D.E., BATIČ, F.: Cytokinin content in needles of Norway spruce (*Picea abies*/L./ Karst.) inoculated with two strains of the ectomycorrhizal fungus *Thelephora terrestris* (Ehrh.) Fr.- Forstw.Cbl. **112**: 107-111, 1993. **IF = 0,290**

REGULATION OF CELL DIVISION CYCLE

A)PATENTS

- 48) MEIJER, L., BISAGNI, E., LEGRAVEREND, M., STRNAD, M.: Novel purine derivatives having, in particular, antiproliferative properties, and biological uses thereof. - WO 97/20842.
- 49) HAVLÍČEK, L., HAJDÚCH, M., STRNAD, M.: Cyclin-dependent kinase inhibitor. Patent Applied in Australia, Canada, Japan, Korea and USA, 1998.
- 50) FUKSOVÁ, K., HAVLÍČEK, L., KRYŠTOF, V., LENOBEL, R., STRNAD, M.: Azapurine derivatives. PO12166GB NJN.
- 51) HANUŠ, J., KRYŠTOF, V., HAJDÚCH, M., VESELÝ, J., STRNAD, M.: Substituted nitrogen heterocyclic derivatives and pharmaceutical use thereof. WO 00/43394.
- 52) DOLEŽAL, K., POPA, I., HOLUB, J., LENOBEL, R., WERBROUCK, S., STRNAD, M.: Heterocycklické sloučeniny na bázi N⁶-substituovaného adeninu, způsoby jejich přípravy, tyto deriváty pro použití jako léčiva, kosmetické přípravky a růstové regulátory. PV 2001-2818.
- 53) HAVLÍČEK, L., KRYŠTOF, V., SIGLEROVÁ, V., LENOBEL, R., VAN ONCKELEN, H., RERNEMAN, Z., SLEGGERS, H., ESMANS, E., STRNAD, M., WERMEULEN, K.: Purine derivatives, process for their preparation and use thereof. WO 01/49688.
- 54) MORAVCOVÁ, D., HAVLÍČEK, L., LENOBEL, R., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Novel pyrazolo-pyrimidine derivatives with antiinflammatory, anticancer, immunosuppressive and neurogenerative properties and their use thereof. EP 24128-099.
- 55) MORAVCOVÁ, D., HAVLÍČEK, L., LENOBEL, R., KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Disubstituted pyrazolo-pyrimidine derivatives with CDK inhibitory activity and their use thereof. EP 37456-099.

B) CHAPTERS IN BOOKS AND PROCEEDINGS

- 56) HAJDÚCH, M., NOSKOVÁ, V., FEKETOVÁ, G., NOVOTNÝ, R., JESS, K., GOJOVÁ, L., KAŠPÁREK, I., KRYŠTOF, V., VESELÝ, J., STRNAD, M., MIHÁL, V.: Olomoucine derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors. Pp.341-353. In: PIETERS, R., VEERMAN, A., KASPERS, G.J.L (eds.), New generation of potent anti-cancer drugs. Drug Resistance in Leukaemia and Lymphoma, Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, New York, 1999.
- 57) STRNAD, M., KRYŠTOF, V., HAVLÍČEK, L.: Control of tumour development in plants and animals: A comparative treatise. Pp. 193 – 202. In: STRNAD, M., PEČ, P., BECK, E.(eds.), Advances in Regulation of Plant Growth and Development. Peres Publ., Prague, 1999.
- 58) FRANĚK, F., STRNAD, M., HAVLÍČEK, L., SIGLEROVÁ, V.: Antiproliferative and growth-stimulating activities of synthetic cytokinin analogs. Pp. 315-319. In: SHIRATA, S., et al. (eds.), Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects. Vol. 12. Kluwer Acad. Publ., The Netherlands, 2002.

C) ARTICLES IN THE IMPACTED JOURNALS

- 59) 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.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. - Eur. J. Biochem. **224**: 771-786, 1994. **IF = 2,852**
- 60) HAVLÍČEK, L., HANUŠ, J., VESELÝ, J., LECLERC, S., MEIJER, L., SHAW, G., STRNAD, M.: Cytokinin-derived cyclin dependent kinase inhibitors. Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. - J. Med. Chem. **40**: 408-412, 1997. **IF = 4,134**
- 61) DE AZEVEDO, W. F., LECLERC, S., MEIJER, L., HAVLÍČEK, L., STRNAD, M., KIM, S.- H. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. - Eur. J. Biochem. **243**: 518-526, 1997. **IF = 2,852**
- 62) HAJDÚCH, M., KOLÁŘ, Z., NOVOTNÝ, R., HANUŠ, J., MIHÁL, V., HLOBÍLKOVÁ, A., NOSKOVÁ, V., STRNAD, M.: Induction of apoptosis and regression of spontaneous dog melanoma following in vivo application of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine. - Anti-Cancer Drugs **8**: 1007-1013, 1997. **IF = 1,570**
- 63) BINAROVÁ, P., BÖGRE, L., DOLEŽEL, J., HIRT, H., HEBERLE-BORS, E., STRNAD, M.: Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. - Plant J. **16**: 697-707, 1998. **IF = 5,629**
- 64) OTYEPKA, M., KRYŠTOF, V., HAVLÍČEK, L., SIGLEROVÁ, V., STRNAD, M., KOČA, J.: Docking-based development of purine-like inhibitors of Cdk2. - J Med. Chem. **43**: 2506-2511, 2000. **IF = 4,134**
- 65) KOVÁŘOVÁ, H., HAJDÚCH, M., KOŘÍNKOVÁ, G., HALADA, P., KRUPÍČKOVÁ, S., GOULDSWORTHY, A., ZHELEV, A., STRNAD, M.: Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine. - Electrophoresis **21**: 345-478, 2000. **IF = 3,385**
- 66) KOTALA, V., ULDRIJAN, S., HORKÝ, M., TRBUSEK, M., STRNAD, M., VOJTĚŠEK, B.: Potent induction of wild-type p53-dependent transcription in tumour cells by a synthetic inhibitor of cyclin-dependent kinases. - CMLS **58**: 1333-1339, 2001. **IF = 3,668**
- 67) FRANĚK, F., STRNAD, M., HAVLÍČEK, L., SIGLEROVÁ, V., ECKSCHLAGER, T.: Concentration- and time-dependent activities of bohemine, a novel cytostatic agent. Cytotechnology **36**: 115-122, 2001. **IF = 0,925**

- 68) KRYŠTOF, V., STRNAD, M.: Inhibitors of cyclin-dependent kinases. - Chem. Listy **95**: 295-300, 2001. **IF = 0,317**
- 69) FRANĚK, F., SIGLEROVÁ, V., HAVLÍČEK, L., STRAND, M., ECKSCHLAGER, T., WEIGL, E.: Effect of purine derivative myoseverin and of its analogies on cultured hybridoma cells. - Coll. Czech Chem. Commun. - **67**: 257-266, 2002. **IF = 0,550**
- 70) KOLÁŘ Z, MURRAY PG, MAĐAROVÁ J, LUKEŠOVÁ M, HLOBILKOVÁ A, ŘIHÁKOVÁ P, FLAVELL JR, STRNAD M, STUDENT V, VOJTĚŠEK B: Nuclear receptors in early hormone refractory prostate cancer and their relationship to apoptosis-related proteins. - Neoplasma **49**: 172-177, 2002. **IF = 0,448**
- 71) KRYŠTOF, V., LENOBEL, R., HAVLÍČEK, L., KUZMA, M., STRNAD, M.: Synthesis and biological activity of olomoucine II. – Bioorg. Med. Chem. Lett. **12**: 3283-3286, 2002. **IF = 1,759**
- 72) MAĐAROVÁ, J., LUKEŠOVÁ, M., HLOBILKOVÁ, A., STRNAD, M., VOJTĚŠEK, B., LENOBEL, R., HAJDÚCH, M., MURRAY, P.G., PERERA, S., KOLÁŘ, Z.: Synthetic inhibitors of CDKs induce different responses in androgen sensitive and androgen insensitive prostatic cancer cell lines. – Mol. Pathol. **55**: 227-234, 2002. **IF = 1,657**
- 73) VERMEULEN, K., STRNAD, M., KRYŠTOF, V., HAVLÍČEK, L., VAN DER, A.A .A., LENJOU, M., NIJS, G., RODRIGUS, I., STOCKMAN, B., VAN ONCKELEN, H., VAN BOCKSTAELE, D.R., BERNEMAN, Z.N.: Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. - Leukemia **16**: 299-305, 2002. **IF = 3,562**
- 74) VERMEULEN, K., STRNAD, M., HAVLÍČEK, L., VAN ONCKELEN, H., LENJOU, M., NIJS, G., VAN BOCKSTAELE, D., BERNEMAN, Z.: Plant cytokinin analogues with inhibitory activity on cyclin-dependent kinases exert their antiproliferative effect through induction of apoptosis initiated by the mitochondrial pathway. Determination by a multiparametric flow cytometric analysis. - Exp. Hematol. **30**: 1107-1114, 2002. **IF = 3,258**
- 75) LINK, V.L., HOFMANN, M.G., SINHA, A.K., EHNESS, R., STRNAD, M., ROITSCH, T.: Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli - Plant Physiol. **128**: 271-281, 2002. **IF = 5,800**
- 76) MORAVEC, J., KRYŠTOF, V., HANUŠ, J., HAVLÍČEK, L., MORAVCOVÁ, D., FUKSOVÁ, K., KUZMA, M., LENOBEL, R., OTYEPKA, M., STRNAD, M.: 2,6,8,9-Tetrasubstituted purines as new CDK1 inhibitors. - Bioorg. Med. Chem. Lett. **13**: 2993-2996, 2003. **IF = 2,051**
- 77) MORAVCOVÁ, D., KRYŠTOF, V., HAVLÍČEK, L., MORAVEC, J., LENOBEL, R., OTYEPKA, M., STRNAD, M.: Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. - Bioorg. Med. Chem. Lett. **13**: 2989-2992, 2003. **IF = 2,051**

8. Summary

This thesis is related to N⁶-substituted adenine derivatives with growth regulatory properties. It consists of two main topics related either to isolation and unequivocal identification of new natural aromatic cytokinins in plants or development of cytokinin-derived inhibitors of cyclin-dependent kinases.

The isolation and unequivocal identification of natural BAP and the high biological activity of its *meta*-hydroxylated analogues stimulated us to search for other natural aromatic cytokinins. Screening was done by ELISAs of HPLC fractions using specific antibodies against *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenosine. Subsequent isolation and unequivocal identification by mass spectrometry led to discovery of a broad spectrum of endogenous plant growth substances structurally similar to a highly active compound, *meta*-topolin /6-(3-hydroxybenzylamino)purine/, and to its less active analogue, *ortho*-topolin /6-(2-hydroxybenzylamino)purine/. The structure of aromatic cytokinins suggests considerably different biosynthetic and metabolic pathways from that of zeatin and related isoprenoid cytokinins. From a physiological viewpoint, the aromatic cytokinins exhibit interesting biological activities, especially those involving organogeneses. Collectively, mT, oT, BAP (Fig. 1), and their derivatives constitute the natural aromatic cytokinins (ARCKs), distinguishable from the isoprenoid cytokinins according to their biochemical properties as well as their spectrum of biological activities. The biological activity of mT and its riboside in different bioassays is comparable to that of the most active isoprenoid cytokinin, zeatin. mT is already of practical use in plant biotechnology because it combines a good shoot production with *in vitro* root formation. This is the first evidence for special biological activity of a cytokinin *in vitro* because the cytokinin application usually induces suppression of root formation. Furthermore, the limited malformation and vitrification effects of mT have been observed during *in vitro* multiplication, the defects, which are usually observed on shoots of plants micropropagated with BAP. We have recently showed that mT plays important role in acclimatisation of potato microplants *in vivo*. Furthermore, mT(R) accumulation is probably phytochrome controlled as observed after red light treatment of *Alstromeria* leaves. New series of cytokinins derived from 6-benzylaminopurine (BAP, Fig. 1) have been also developed for agricultural and biotechnological applications. These compounds exhibit very high biological activities in different cytokinin bioassays. Preferentially, the methoxy and fluoro derivatives had 2-10 times higher activity than *trans*-zeatin and expressed very positive antisenescent and morphogenetic properties in different *in vitro* cultures of some horticulture species.

Our research focused on the primary mechanism of action of plant hormones cytokinins in cell division cycle has showed that natural plant cytokinins are rather non-specific inhibitors of various protein kinases. Surprisingly, among aromatic cytokinin derivatives, we have discovered a compound, 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurine, named "olomoucine" (OC, Fig. 1), which specifically inhibits some cyclin-dependent kinases (CDKs) at micromolar concentration. One of the inhibited kinases, the p34^{cdc2}/cyclin B kinase, assumed to be a key mitotic factor, which is highly conserved and strongly implicated in cell cycle transitions in all eukaryotic cells. The design and inhibitory activity of OC was further improved by modifications at positions 2, 6, and 9, i.e., the positions that control binding to CDK1. This has recently led to discovery of novel specific CDK inhibitors named roscovitine, olomoucine II and purvalanol A (Fig. 1), which display an enhanced inhibitory activity toward CDK1, a higher selectivity for some CDKs, an increased antimitotic activity at the G1/S and G2/M points of the cell cycle, and stronger and more selective antitumour effects. The compounds are also effective *in vivo* and two of them are already in clinical trials. The purine analogue bohemine and roscovitine were also used, to study the role on CDKs in cell cycle progression and microtubule organisation in *Vicia faba* root tip cells. Both drugs inhibited the activity of immunopurified *Vicia faba* and alfalfa CDC2-kinase. An observed transient arrest at the G1/S and G2/M regulatory points indicated that inhibition of the CDC2-kinase had an effect on both transitions. In contrast to the regular bipolar spindle in untreated cells, in drug treated metaphase cells abnormally short and dense kinetochore microtubule fibres were observed. The chromosomes were not aligned on the metaphase plate but were arranged in a circle, with kinetochores pointing inwards and chromosome arms pointing outwards. γ -Tubulin, which plays a role in microtubule nucleation, also localised to the centre on the monopolar spindle. The observed abnormalities in mitosis, after inhibition of CDC2-kinase by specific CDK drugs, suggest a role for this enzyme in regulating some of the steps in plants leading to a bipolar spindle structure. These compounds also induce apoptosis of different plant cells *in vivo*.

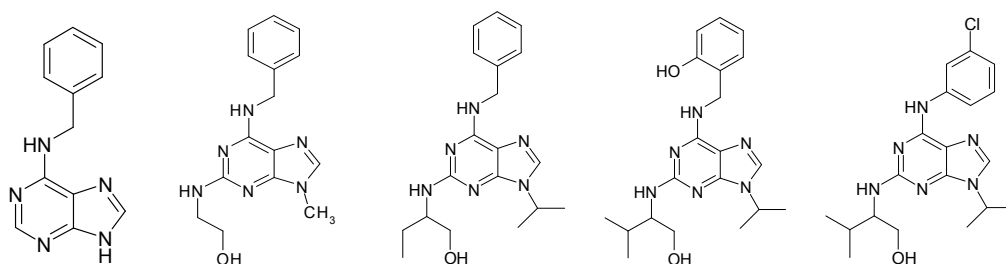


Fig. 1. Chemical structures of 6-benzylaminopurine (BAP), olomoucine, roscovitine, olomoucine II and purvalanol (from left to right).