



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Příprava giberelinových derivátů určených k identifikaci
struktury neznámého endogenního giberelinu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|--|
| Autor: | Bc. Markéta Fuksová |
| Studijní program: | N1501 Biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2021 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Markéta Fuksová |
| Název práce | Příprava giberelinových derivátů určených k identifikaci struktury neznámého endogenního giberelinu |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2021 |
| Abstrakt | <p>Předložená diplomová práce se primárně zabývá syntézou předpokládané struktury nově detekovaného endogenního giberelinu. Tato látka byla nedávno detekována ve vzorku cukrové třtiny v laboratoři prof. Heddena v Rotsam Research center a strukturně se liší od všech již známých 136 giberelinů. Na tomto základě byla navržena totální syntéza tohoto neznámého giberelinu založená na komerčně dostupných giberelinech A₃ a A₇. Cílem bylo prozkoumat navrženou syntetickou cestu, která by měla vyvrcholit přípravou klíčového intermediátu. Současně byla připravena knihovna giberelinových derivátů odvozených od komerčně dostupných GA₃ a GA₇, která byla otestována na jejich biologickou aktivitu (cytotoxicita na nádorových a normálních buněčných liniích a anthelmintické účinky na <i>Caenorhabditis elegans</i>). Teoretická část shrnuje poznatky o struktuře a aktivitě giberelinů, přičemž největší pozornost je věnována jejich využití v zemědělství a medicíně.</p> |
| Klíčová slova | rostlinné hormony, gibereliny, organická syntéza, syntéza přírodních látek, biologická aktivita |
| Počet stran | 81 |
| Počet příloh | 2 |
| Jazyk | Český (anglický) |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Bc. Markéta Fuksová |
| Title of thesis | Attempted identification of unknown endogenic gibberellin via synthesis |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | Assoc. prof. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D. |
| The year of presentation | 2021 |
| Abstract | <p>This diploma thesis is primarily focused on the synthesis of recently isolated previously unknown gibberellin plant hormone. Such compound was detected in sugar beet samples in the laboratory of prof. Hedden at the Rotham Research Center. Detected compound differs from any of previously known 136 gibberellins. Relevant structure of such gibberellin was proposed along with the synthetic scheme towards it. Chosen sequence is based on commercially available gibberellins A₃ and A₇. The aim of the Theses is to explore proposed synthesis of a key intermediate of the route and to generate chemical library of gibberellin derivatives. All prepared compounds are tested for their biological properties (cytotoxicity on cancer and noncancer cell lines, and for anthelmintic activity on <i>Caenorhabditis elegans</i>). Theoretical part summarizes the knowledge about the structure and activity of gibberellins, and focuses on their application in agriculture and medicine.</p> |
| keywords | phytohormones, gibberellins, organic synthesis, natural product synthesis, biological activity |
| Number of pages | 81 |
| Number of appendices | 2 |
| Language | Czech (English) |

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

V Olomouci dne 17.05.2021

/Markéta Fuksová/

Poděkování:

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, vstřícnost, ochotu a především jeho cenné rady nejenom v oblasti organické syntézy. Dále bych ráda poděkovala Ing. Bc. Tereze Štenclové, Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. a Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D. za vedení v průběhu biologického testování. Taktéž děkuji Mgr. Pavlu Jaworkovi, Ph.D. za provedení vybraných experimentů. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu Katedry chemické biologie.

Za finanční podporu děkuji Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2021_011).

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 Úvod..... | 9 |
| 2 Cíle práce..... | 11 |
| 3 Teoretická část..... | 13 |
| 3.1 Gibereliny | 13 |
| 3.2 Úvod do výzkumu giberelinů..... | 14 |
| 3.2.1 Struktura giberelinů a jejich aktivita | 16 |
| 3.3 Metabolická dráha giberelinů..... | 19 |
| 3.3.1 Biosyntéza bioaktivních giberelinů v rostlinách | 19 |
| 3.3.2 <i>In planta</i> deaktivace giberelinů | 21 |
| 3.4 Jak gibereliny ovlivňují rostlinu – signalizace..... | 22 |
| 3.4.1 Gibereliny a jejich signální dráha..... | 23 |
| 3.5 Využití giberelinů v zemědělství | 25 |
| 3.5.1 Exogenní přídavky giberelinů | 25 |
| 3.5.2 Využití inhibitorů biosyntézy giberelinů..... | 27 |
| 3.6 Gibereliny jako potenciální léčiva s protinádorovým účinkem | 29 |
| 3.6.1 Vývoj molekuly GA-13315..... | 30 |
| 3.6.1.1 Molekulární cíle GA-13315..... | 31 |
| 3.6.1.2 Konjugáty GA-13315 a dalších giberelinových derivátů | 31 |
| 3.7 Předchozí dosažené výsledky v rámci naší skupiny | 33 |
| 4 Experimentální část | 35 |
| 4.1 Chemikálie | 35 |
| 4.2 Metody a materiál | 35 |
| 4.2.1 Obecné metody organické syntézy..... | 35 |
| 4.2.1.1 Vizualizační TLC roztoky – příprava | 36 |
| 4.2.2 Biologický materiál | 36 |
| 4.2.2.1 Buněčné linie | 36 |
| 4.2.2.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> | 36 |
| 4.2.2.3 Kompetitivní inhibice giberelin 2-oxidázy (GA3ox2)..... | 37 |
| 4.3 Organická syntéza | 38 |
| 4.3.1 Syntéza vycházející z giberelinu A ₇ | 38 |
| 4.3.1.1 Selektivní silylace GA ₇ ze směsi GA ₄ /GA ₇ | 38 |
| 4.3.1.2 Desilylace GA ₇ -silyl etheru 23 | 39 |
| 4.3.1.3 Příprava GA ₇ -methyl esteru 24..... | 40 |
| 4.3.1.4 Příprava dienu 25 pomocí hydrazinolýzy | 40 |
| 4.3.1.5 Chránění C19 karboxylu molekuly 25..... | 41 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.3.1.6 | Chránění C7 karboxylu molekuly GA ₇ | 42 |
| 4.3.2 | Syntéza vycházející z giberelinu A ₃ | 42 |
| 4.3.2.1 | Chránění C7 karboxylu u GA ₃ | 42 |
| 4.3.2.2 | Příprava dienu 30 pomocí hydrazinolýzy..... | 44 |
| 4.3.2.3 | Chránění C19 karboxylu molekuly 30..... | 44 |
| 4.3.2.4 | Selektivní oxidace C3 alkoholu..... | 47 |
| 4.3.2.5 | Redukce C3 ketonové skupiny a nasycené vazby A kruhu..... | 48 |
| 4.3.2.6 | Syntéza vycházející z GA ₄ | 50 |
| 4.4 | Biologické testování připravených látek..... | 51 |
| 4.4.1 | <i>In vitro</i> testování na buněčných liniích..... | 51 |
| 4.4.2 | Anthelmintická aktivita..... | 51 |
| 4.4.2.1 | Věková synchronizace červů..... | 51 |
| 4.4.2.2 | Hodnocení anthelmintické aktivity..... | 52 |
| 4.4.3 | Kompetitivní inhibice GA3ox2..... | 52 |
| 5 | Výsledky a diskuse..... | 54 |
| 5.1 | Organická syntéza..... | 55 |
| 5.1.1 | Syntéza vycházející z giberelinu A ₇ | 55 |
| 5.1.1.1 | Izolace GA ₇ ze směsi GA ₄ /GA ₇ | 55 |
| 5.1.1.2 | Modifikace giberelinu A ₇ | 57 |
| 5.1.2 | Syntéza vycházející z giberelinu A ₃ | 59 |
| 5.1.2.1 | Otevření laktonu v 28 za vzniku dienu 30..... | 60 |
| 5.1.2.2 | Selektivní chránění C19 karboxylu molekuly 30 a její další modifikace..... | 62 |
| 5.1.2.2.1 | Modifikace molekuly 31..... | 63 |
| 5.1.2.2.2 | Modifikace molekuly 32..... | 64 |
| 5.1.2.2.3 | Modifikace molekuly 33..... | 65 |
| 5.1.2.3 | Redukce C7 karboxylu na alkohol..... | 66 |
| 5.1.3 | Syntéza vycházející z giberelinu A ₄ | 68 |
| 5.1.3.1 | Otevření laktonu u methyl (50) a MOM (58) derivátu GA ₄ | 68 |
| 5.2 | Biologické testování..... | 71 |
| 5.2.1 | <i>In vitro</i> testování na buněčných liniích..... | 71 |
| 5.2.2 | Anthelmintická aktivita..... | 72 |
| 5.2.3 | Kompetitivní inhibice giberelin 2-oxidázy (GA3ox2)..... | 72 |
| 6 | Závěr..... | 73 |
| 7 | Použitá literatura..... | 74 |
| 8 | Příloha č. 1: Charakterizace jednotlivých připravených látek – kopie ¹ H a ¹³ C NMR spekter 82 | |
| 9 | Příloha č. 2: Mapa provedených syntéz vycházející z giberelinu A ₃ | 102 |

Seznam zkratek

| | |
|--|---|
| Ac – acetyl | m – multiplet |
| AIBN – azobisisobutyronitril | MDR – mnohočetná léková rezistence |
| Bn – benzyl | Me – methyl |
| BnBr – benzyl bromid | MOM – methoxymethyl ether |
| CD – cyklodextrin | MOM-Cl – chloromethyl methyl ether |
| CDCl ₃ – deuterovaný chloroform | MS – hmotnostní spektrometrie |
| d – dublet | MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid |
| DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en | NCS – N-chlorsukcinimid |
| DCM – dichlormethan | NH ₂ NH ₂ •HBr – hydrazin monohydrochlorid |
| DIC – <i>N,N'</i> -diisopropyl karbodiimid | NH ₂ NH ₂ •H ₂ O – hydrazin hydrát |
| DIPEA – <i>N,N'</i> -diisopropylethylamin | NH ₂ NH ₂ •HCl – hydrazin monohydrochlorid |
| DMEM – Dulbeccovo modifikované | NMR – nukleární magnetická rezonance |
| Eagleho médium | PBS – fosfátový pufr |
| DMF – dimethylformamid | PE – petrolether |
| DMP – Dess-Martinovo činidlo | ppm – parts per milion |
| EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová | R.t. – retenční čas |
| ekviv. – počet ekvivalentů | RT – laboratorní teplota |
| EtOAc – ethylacetát | RVO – rotační vakuová odparka |
| GA – giberelin | s – singlet |
| GA ₃ – kyselina giberelová | SEM – trimethylsilylethoxymethyl skupina |
| GA ₃ ox – giberelin 3-oxidáza | SEM-Cl – chloromethyl 2-trimethylsilylethyl ether |
| GID1 – GIBBERELLIN INSENSITIVE | SMF – ponorná fermentace |
| DWARF 1 | SSF – fermentace na pevné fázi |
| GGPP – geranylgeranyl difosfát | TBAC – tetrabutylamonium chlorid |
| IC ₅₀ – polovina maximální inhibiční koncentrace | TBSCl – <i>tert</i> -butyldimethylsilyl chlorid |
| J – štěpící konstanta | <i>t</i> BuOK – <i>tert</i> -butoxid draselný |
| KAO – oxidáza <i>ent</i> -kaurenové kyseliny | THF – tetrahydrofuran |
| KO – <i>ent</i> -kauren oxidáza | TLC – chromatografie na tenké vrstvě |
| KS – <i>ent</i> -kauren syntáza | <i>t</i> Bu – <i>tert</i> -butyl |
| LC – kapalinová chromatografie | δ – chemický posun |
| LC-MS/MS – spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií | |

1 Úvod

Gibereliny (GA) tvoří významnou skupinu rostlinných hormonů zapojených do mnoha aspektů růstu a vývoje vyšších rostlin v průběhu jejich celého životního cyklu. Mezi jejich funkce patří indukce klíčení přerušením vegetačního klidu semen, stimulace dlouhivého růstu stonku, iniciace kvetení a tvorba plodů. Mohou také způsobit partenokarpický vývoj ovoce při absenci oplodnění a opoždění stárnutí listů. Ze strukturního hlediska gibereliny patří mezi tetracyklické diterpenoidní karboxylové kyseliny, jejichž syntéza probíhá v mladých semenech, vyvíjejících se plodech a dalších aktivně rostoucích a reprodukčních orgánech jako jsou mladé listy, pupeny či tyčinky.¹ Pro normální růst a vývoj rostlin je důležité, aby rostliny produkovaly a udržovaly optimální hladinu bioaktivních GA. Nadměrná koncentrace GA v rostlinách může způsobit jejich nadměrný růst spojený se zvýšenou sterilitou². Naopak u mutantních rostlin exprimujících nižší hladiny GA pozorujeme trpasličí a pozdně kvetoucí fenotyp. Ten je ale také doprovázen nízkou plodností.¹ V tomto případě ovšem endogenní přídavek GA obnoví normální růst a uvede rostlinu do normálního cyklu. Není tedy překvapením, že GA našly značné uplatnění v moderním zemědělství a zahradnictví při iniciaci a kontrole kvetení a vývoji plodů. Gibereliny se tak staly velmi užitečnou zemědělskou fytochemikálií určenou pro regulaci růstu a vývoj řady ovocných a zeleninových plodin jako jsou hrozny, citrusy, jablka, rajčata, rýže a obiloviny.³ Bohužel je jejich další rozšíření limitováno jejich dostupností. Pouze tři z nich, gibereliny A₃, A₄ a směs giberelinů A₄/A₇, jsou totiž komerčně dostupné v dostatečných množstvích a za přijatelnou cenu. A mají tedy praktické využití.

V současnosti je identifikováno a charakterizováno 136 endogenních giberelinů u vyšších rostlin, hub a bakterií. Kromě toho bylo v rostlinách detekováno množství GA konjugátů (např. GA-glykosidy), u kterých se předpokládá, že jsou zodpovědné za transport a skladování giberelinů v rostlinách.⁴ Samotné gibereliny jsou však v rostlinách přítomny pouze ve velice nízkých koncentracích, které se v závislosti na druhu rostliny a typu pletiva pohybují v rozmezí od 10⁻⁹–10⁻¹⁵ mol/g čerstvé hmoty. Detekce a následná strukturní charakterizace těchto fytohormonů je tedy velice složitá. Druhým problémem, jenž značně ztěžuje identifikaci giberelinů, je jejich relativně značná strukturní rozmanitost. Tyto dva faktory jsou dozajista jedním z hlavních důvodů, proč po prvotním nadšeném zájmu o identifikaci a izolaci giberelinů (přibližně od 60. let 20. století) zájem o oblast charakterizace postupně upadal a zůstával na bedrech posledních „Mohykánů“ v oblasti giberelinového výzkumu, prof. L. Mandera († 2020, ANU, Austrálie) a prof. P. Hedenna (Rotsham Research, UK). Zejména laboratoře prof. Mandera v Canberře byly až do jeho smrti hlavním zdrojem nejenom izotopově značených giberelinů nezbytných pro studium biochemických procesů v rostlinách, ale v podstatě všech „nestandardních“ giberelinů užívaných světově pro jejich výzkum.⁵

V posledních době dochází vlivem globálních změn klimatu k nárůstu zájmu o výzkum v oblasti fytohormonů. Cílem tohoto výzkumu je ovlivnit růst rostlin natolik, aby byly více přizpůsobivé klimatickým změnám a zároveň si uchovávaly svoje vlastnosti kulturních plodin

(výnos, kvalita). S tímto jde ruku v ruce zájem o zvýšení citlivosti detekce jednotlivých giberelinů v rostlinných vzorcích (citlivost přístrojového vybavení), a je tedy pravděpodobně pouze otázkou času, než dojde k detekování nových, dosud nepopsaných endogenních giberelinů.

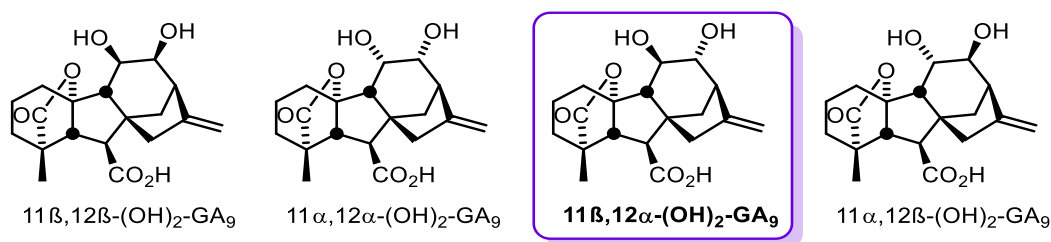
Z pohledu strukturních derivátů giberelinů došlo za posledních téměř 75 let ke značnému rozšíření portfolia jejich nepřirodních derivátů. Biologická aktivita mnohých z nich byla v kontextu jejich interakcí s rostlinami detailně zkoumána.⁶⁻⁹ U některých z nich se následně ukázalo, že mají velký vliv i na buňky živočišné. Veškeré prozatím známé poznatky z této oblasti nás v současné době vedou k jednoduchému závěru: gibereliny, jakožto fytohormony, neustále skrývají mnoho informací a překvapivých spojení, a to jak v oblasti spojené se studiem růstu a vývoje rostlin, tak zejména v kontextu jejich interakce s živočišnými organismy. V dnešní době se obecně vědecká komunita zaměřuje na přípravu nových derivátů giberelinů, které mohou potencionálně sloužit zejména jako tzv. „antigibereliny“ (inhibují růst rostlin) a zároveň se snaží objasnit vliv těchto látek na živočišných organismech.¹⁰⁻¹³ Další část výzkumu se dále orientuje na přípravu giberelinů, které by nám umožnily studovat mobilitu (transport) giberelinů v rostlinách.^{14,15,16}

2 Cíle práce

Výzkum v naší výzkumné skupině kombinuje oblast organické syntézy a fyzikálně-organické chemie se studiem vlivu námi připravených látek na rostliny a vybrané parazitické formy života. V rámci své bakalářské a nyní také diplomové práce jsem se zapojila do projektu, který je zaměřen na výzkum semipřírodních látek vycházejících biosynteticky z *ent*-kaurenů. Z této velké skupiny látek jsme se zaměřili zejména na gibereliny. V rámci našeho výzkumu se zajímáme o přípravu derivátů giberelinů s potenciální biologickou aktivitou, které následně testujeme na živočišných buňkách (toxická a protinádorová aktivita) a následně na hlísticích *Caenorhabditis elegans*. Dále se zabýváme přípravou izotopově a fluorescenčně značených biologicky aktivních giberelinů A₁, A₃, A₄ a A₇ a syntézou nových, prozatím neidentifikovaných, pravděpodobně endogenních giberelinů a jejich cukerných derivátů.

Předložená diplomová práce volně navazuje na práci bakalářkou, v rámci které jsem pracovala na přípravě předpokládané struktury nově detekovaného endogenního giberelinu (Obr. 1). Tento giberelin byl detekován skupinou prof. Heddena (Rotsham Research centrum, UK) a byl prozatím charakterizován pomocí LC-MS/MS. Dle získaného retenčního času a fragmentace bylo zjištěno, že tento giberelin neodpovídá žádnému již detekovanému a charakterizovanému derivátu giberelinu. Vzhledem k obecně velice nízkým koncentracím giberelinů v rostlinách (ng-pg/g čerstvé hmoty) je jediným způsobem, jak ověřit strukturu této nové molekuly, připravit tuto navrženou strukturu *de novo* a následně porovnat LC-MS/MS spektra s původní detekovanou látkou.

Na základě těchto originálních spekter a znalostí spektrálních a chromatografických vlastností již identifikovaných giberelinů, prof. Hedden a doc. Pospíšil navrhli struktury čtyř různých stereoizomerů, kde předpokládají, že nově detekovaný giberelin odpovídá jedné z nich (interně označen jako giberelin A₁₃₇ (GA₁₃₇)). Z těchto čtyř stereoizomerů byla vybrána struktura s absolutní konfigurací 11β,12α-(OH)₂-GA₉ jako nejpravděpodobnější kandidát detekovaného giberelinu.



Obr. 1– Navržené struktury potenciálního endogenního giberelinu A₁₃₇ dle získaných LC-MS/MS spekter. Předpokládá se, že se jedná o 11, 12 –dihydroxy derivát giberelinu A₉. Nejpravděpodobnější kandidát je zvýrazněn rámečkem.

V rámci předložené diplomové práce pracuji na totální syntéze výše zmíněného nového endogenního giberelinu předběžně značeného GA₁₃₇. Mým cílem je prozkoumat syntetickou cestu, která by měla vyvrcholit přípravou klíčového intermediátu **1**. Látky, ze které by měl být následně připraven cílový produkt GA₁₃₇. Při vlastní práci jsem zvolila jako výchozí látky gibereliny A₃ a A₇.

Paralelně jsem tedy pracovala na dvou syntetických cestách, které mě měly přivést co nejbližší kýženému intermediátu **1** (Schéma 1). Výsledky získané při „průzkumu“ této syntetické cesty jsou stěžejní částí mé diplomové práce. V další části jsem se věnovala ohodnocení biologické aktivity vybraných připravených derivátů giberelinů z pohledu jejich vlivu na buněčné linie a následně na hlístice *Caenorhabditis elegans*. Hlavním důvodem studia biologické aktivity těchto giberelinových intermediátů bylo odhalit případná rizika spojená s těmito látkami na živočichy a živočišné buňky.

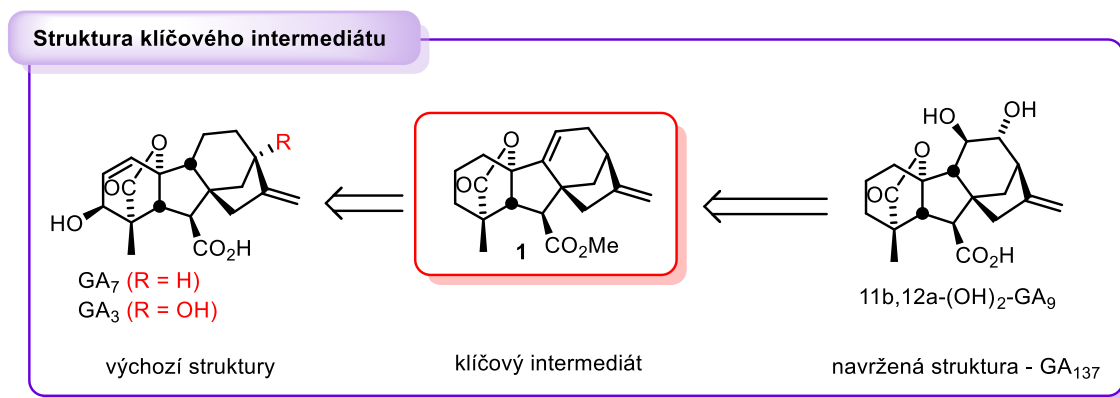


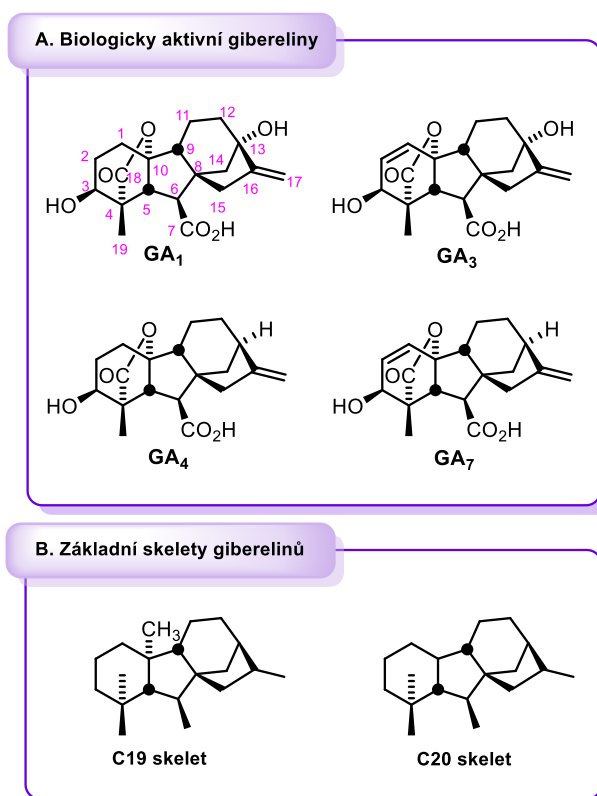
Schéma 1 – Struktura klíčového intermediátu **1** vycházejí z GA₃ a GA₇

Rešeršní část se zabývá především biologickými aspekty a poznatky z praktického využití těchto fytohormonů a jejich strukturních derivátů v zemědělství a medicíně.

3 Teoretická část

3.1 Gibereliny

Gibereliny (GA) tvoří velkou skupinu přirozeně se vyskytujících diterpenoidních karboxylových kyselin a předpokládá se, že jsou přítomny ve všech cévnatých rostlinách. U nižších rostlin, jako jsou lykofyty a kapradiny, se GA podílejí na reprodukčním vývoji,¹⁷ zatímco u vyšších rostlin se funkce GA rozšířila na podporu růstu orgánů prostřednictvím zvýšeného prodloužení buněk anebo dělení buněk, a u mnoha druhů také na aktivaci vývojových procesů, jako je klíčení semen, či indukce zrání a kvetení.¹⁸ Gibereliny jsou také produkovány některými druhy hub a bakterií, které interagují s rostlinami, kde tyto organizmy vystupují zejména jako parazité, ale i také jako symbionti. S velkou pravděpodobností však v těchto organismech (houby, bakterie) GA nemají žádnou vnitřní funkci a slouží pouze k potlačení obranného mechanismu rostlin.^{19–21}



Obr. 2– (A) Struktury biologicky aktivních giberelinů a (B) jejich základních skeletů

Ačkoliv je k dnešnímu dni izolováno 136 endogenních giberelinů, jen malý počet z nich je opravdu biologicky aktivní. Mezi tyto gibereliny se řadí A₁ a A₄, které jsou biosyntetizovány rostlinami, a GA₃ s GA₇, jež produkují houby a bakterie (Obr. 2A). Je třeba si však uvědomit, že žádná ze známých rostlin, hub či bakterií neprodukuje ani polovinu všech 136 známých giberelinů. Struktury známých giberelinů jsou velice podobné. Lze je rozdělit do dvou skupin (Obr. 2B) na gibereliny s 20 atomy uhlíku (C20 skelet) a 19 uhlíky (C19 skelet). Biosynteticky GA s 19 uhlíky vznikají z GA o 20 atomech uhlíků, ale z pohledu rostlin jsou důležité pouze GA s C19 atomovým skeletem (Obr. 2A). Strukturně gibereliny obecně obsahují tetracyklickou diterpenoidní kostru

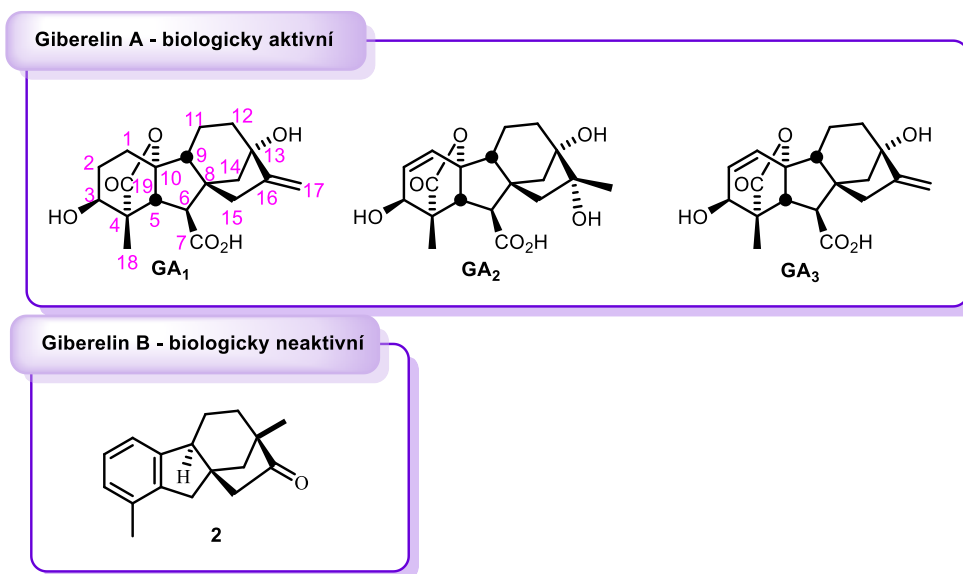
obsahující v poloze C-6 karboxylovou kyselinu. Biologicky aktivní GA pak dále obsahují i 10,19-y-laktonový můstek²² a 3 β -hydroxylovou skupinou, která je klíčová při interakci GA s giberelinovým receptorem GID1.²³ GA₃ a GA₇ navíc obsahují i dvojnou vazbu $\Delta^{1,2}$, která inhibuje deaktivaci těchto giberelinů pomocí hydroxylace atomu C2, což je hlavním mechanismem inaktivace GA ve vyšších rostlinách.

3.2 Úvod do výzkumu giberelinů

Historie výzkumu giberelinů sahá až do poloviny 19. století, kdy japonští rostlinní patologové zkoumali příčinu onemocnění rýže zvané *Bakanae* (česky pošetilá sazenice), která znatelně snižovala výnosy rýžových plodin v Japonsku, na Tchaj-wanu a vlastně i po celém asijském kontinentu.³ Tato choroba je charakterizována nedostatečnou tvorbou oporných pletiv, které vedou k poléhání lodyh rostlin, blednutí listů, mužské sterilitě a nakonec končí úhynem celých rostlin. První zprávy o původci nemoci *Bakanae* byly získány v roce 1848, kdy japonský vědec Šotaro Hori prokázal, že příznaky této choroby jsou vyvolány v okamžiku, kdy je rostlina rýže infikována houbou *Gibberella fujikuroi*.²⁴ Tato práce pak zapadla poněkud v zapomnění a až o mnoho později, v roce 1912, jiný japonský vědec, Kenkiči Sawada, navrhl, že tato patogenní houba stimuluje nadměrný dlouhivý růst výhonků rýže. Tato idea byla v následujících letech nezávisle potvrzena Eiičim Kurosawou (1926), který došel k závěru, že houba vylučuje chemickou látku stimulující prodloužení výhonků rýže, inhibující tvorbu chlorofylu a potlačující růst kořene.²⁴ Zlomovým okamžikem pak byl rok 1938, kdy japonský vědec Teidžiro Jabuta spolu se svým spolupracovníkem Jasuke Sumikem izolovali z extraktu houby *G. fujikuroi* dvě krystalické sloučeniny, které pojmenovali giberelin A a giberelin B.²⁴ Následné přezkoumání homogenity obou látek však ukázalo, že giberelin A je směsí tří velice strukturně podobných a biologicky aktivních látek, které byly posléze označeny jako gibereliny A₁, A₂ a A₃. Druhá látka, která se ukázala jako biologicky neaktivní, giberelin B, byl později identifikován jako kyselina allogiberová (2) (Obr. 3).²⁵

Na počátku 50. let 20. století se výzkum zaměřený na gibereliny rozšířil i mimo Japonsko. V té době Stodola (USA) izoloval z filtrátu houby *G. fujikuroi* frakci obsahující směs dvou blízce strukturních biologicky aktivních látek, které dostaly jméno giberelin A a giberelin X. Nezávisle na nich Curtis a Cross (UK) izolovali také jednu aktivní látku z kmene hub *G. fujikuroi*. Fyzikální vlastnosti této látky se však od těch reportovaných pro giberelin A značně lišily, a tak nazvali tuto látku jako kyselina giberelová. Následná korespondence spojená s výměnou vzorků mezi výzkumnými týmy vedla ke zjištění, že kyselina giberelová, giberelin A₃ a giberelin X jsou stejné látky. Následně se zjistilo, že giberelin A₁ a Stodolův giberelin A jsou také identické látky.²⁶ Již brzy se však ukázalo, že toto byl pouze začátek dlouhého výzkumu. K dnešnímu dni bylo plně charakterizováno více jak sto giberelinů endogenního původu. Naštěstí již v roce 1968 se vědci rozhodli zamezit chaosu se značením nových izolovaných giberelinů a zavedli uniformní systém pojmenovávání.²⁷ Nově se tedy všechny endogenní gibereliny značily jako giberelin A_n, kde *n* značí pořadí, v jakém byl tento giberelin izolován a identifikován (ve zkratce GA_n). Číslo tedy nedává

žádnou informaci o jejich strukturních vztazích anebo funkcí, kterou tento giberelin zastává v organismu, číslo pouze chronologicky označuje pořadí jejich charakterizace. Aby nedocházelo k dodatečným zmatkům, pouze dva vědci na světě měli vždy v daný okamžik právo přidělovat nové číslo novému giberelinu. V této chvíli je to pouze Japonec Juji Kamiya a Angličan Peter Hedden.⁵



Obr. 3 – První izolované látky z *Gibberella fujikuroi*; (A) biologicky aktivní giberelin A a (B) a biologicky neaktivní giberelin B

Postupem času se zájem o výzkum giberelinů rozšířil do celého světa. Nejprve byly provedeny izolace dalších endogenních GA z extraktů *G. fujikuroi* (ve výsledku izolováno 6 různých GA, a to GA₁, GA₂, GA₃, GA₄, GA₇ a GA₉). Následně pak započaly izolace z vyšších rostlin, ve kterých jsou tyto fytohormony nezbytné pro jejich růst a vývoj. Množství takto izolovaných giberelinů mnohonásobně předčily ty z *G. fujikuroi*. Jak jsem již zmínila, v současné době je plně charakterizováno 136 endogenních GA, které pocházejí z cévnatých rostlin, hub a některých druhů bakterií. Je velice pravděpodobné, že díky novým, citlivějším analytickým metodám, bude docházet k objevům dalších endogenních giberelinů i v budoucnu, avšak kvůli jejich velmi nízké koncentraci a strukturní složitosti bude jejich charakterizace i s využitím moderních analytických metod stále složitou procedurou.⁵

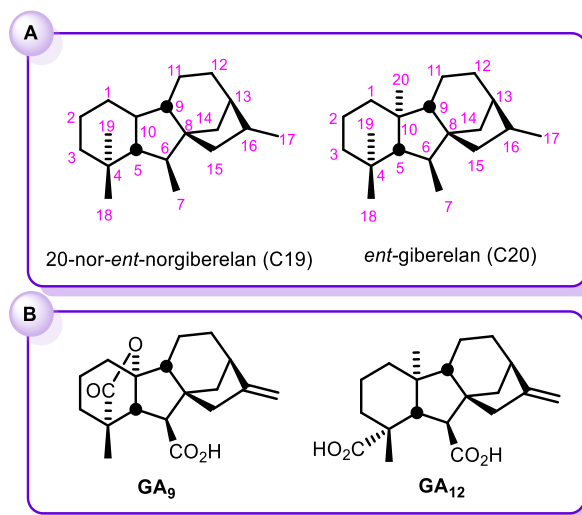
Vedle identifikace a charakterizace nových endogenních giberelinů byla pozornost vědců zaměřena zejména na pochopení jejich biosyntézy a následně na pochopení, jak fungují tyto endogenní GA v rostlinách. Biosyntetické dráhy GA byly nejprve zkoumány u *G. fujikuroi*, ve které jsou GA syntetizovány v relativně vysokých koncentracích (při komerčních procesech výroby GA₃ a GA₄ mohou finální výtěžky dosahovat až několik gramů na litr kultivačního média).²⁸ Jednotlivé kroky podílející se na biosyntéze GA byly studovány za použití bezbuněčných enzymatických systémů připravených například z nezralých semen dýně nebo hrachu.²⁹ S využitím radioaktivně značených substrátů byly tyto látky převedeny na odpovídající konjugáty s využitím vhodných kofaktorů a celá biosyntéza pak byla sledována pomocí standardních metod.³⁰ U vyšších rostlin je však množství GA v rostlině mnohem nižší. Výzkum biosyntézy GA a následných přeměn tak závisel

na vývoji nových citlivějších metod, především vývoji GC-MS a následně HPLC/MS. Tyto metody spolu s rozvojem využití izotopově značených standardů (značeno neradioaktivními izotopy), které mohly být detekovány s vysokou citlivostí pomocí MS detektorů,³¹ umožnily nejprve identifikovat jednotlivé intermediáty v biosyntéze giberelinů (70. léta 20. století) a následně veškeré enzymy, jež se na ní podílejí (konec 80. let 20. století).⁵ Avšak ani tyto objevy nikterak neposunuly kupředu porozumění toho, jak GA fungují a co regulují.

Zásadní průlom ve výzkumu vlivu GA na rostliny tak přišel až na počátku 21. století spolu s popisem signální dráhy giberelinů na základní molekulární úrovni.^{23,32,33} Vše začalo nenápadnou prací Penga a jeho kolektivu,³² kteří v roce 1997 navrhli, že gibereliny pravděpodobně stimulují degradaci proteinů DELLA. V těle rostlin se DELLA proteiny vážou na transkripční proteiny a brání jim tak v jejich funkci. Následné studie,³³ které vyústily v roce 2005 v identifikaci giberelinového receptoru *GID1*, pak konečně přinesly trochu porozumění do oblasti fungování GA při degradaci DELLA proteinu. A tedy přinesly více informací o tom, jak GA ovlivňují růst rostlin. Bylo demonstrováno, že k úspěšné degradaci DELLA proteinu musí nejdříve dojít k aktivaci *GID1* receptoru pomocí bioaktivních GA (*GA*₁, *GA*₃, *GA*₄ nebo *GA*₇), které obsahují C3 hydroxylovou skupinu. C3 hydroxylovaná skupina je tedy extrémně důležitá pro správnou interakci GA s aktivním místem v *GID1* (detailněji rozebráno v kapitole 3.4).^{23,34}

3.2.1 Struktura giberelinů a jejich aktivita

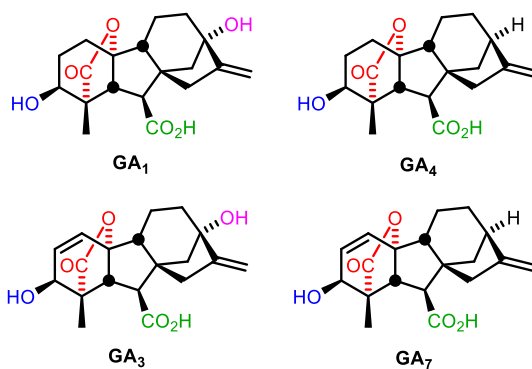
Přírodní gibereliny tvoří velkou a strukturně různorodou skupinu přírodních látek založených na čtyřech pětiuhlíkatých isoprenoidních podjednotkách.¹ Jejich základní struktura se skládá buď z tetracyklického skeletu 20-nor-*ent*-giberelanu (celkem 19 atomů uhlíku) nebo *ent*-giberelanového skeletu (20 atomů uhlíku). První zmíněná skupina GA s 19 atomy uhlíku tvoří více jak dvě třetiny ze všech známých endogenních giberelinů (Obr. 4). Obecně lze považovat *GA*₉ za základní skelet, z něhož jsou ostatní C19 gibereliny odvozeny. Tento typ giberelinů se pak liší především umístěním a počtem hydroxylových skupin a dalších vazeb v rámci skeletu. U giberelinů založených na *ent*-giberelanu (C20) lze za mateřskou sloučeninu označit *GA*₁₂. Stejně jako u C19 GA skupiny, C20 gibereliny se mezi sebou liší zejména počtem a umístěním hydroxylových skupin a násobných vazeb. Navíc ale ještě mají uhlík C20 v různých stupních oxidace (-CH₃, -CH₂, -OH, -CHO, -CO₂H).²² Předpona *ent*- u obou struktur odkazuje na skutečnost, že jejich struktura je odvozena od *ent*-kaurenu, tetracyklického uhlovodíku, který je jejich biochemickým předchůdcem.³⁵



Obr. 4 – (A) Struktury dvou základní skeletů a (B) jejich nejvýznamnějších zástupců: GA₉ s motivem 20-nor-*ent*-gibberelanu (C19) a GA₁₂ s motivem *ent*-gibberelanu (C20)

Oba tyto skelety v průběhu *in vivo* biosyntézy podléhají různým strukturním přeměnám a modifikacím, jež mají značný dopad na jejich biologickou aktivitu. Dané modifikace spočívají zejména v oxidaci a dehydrataci jednotlivých částí skeletu. Vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou gibberelinů je velice úzce spjatý, proto i pouhá malá změna v poloze či konfiguraci hydroxylové skupiny či dvojné vazby může mít fatální vliv na aktivitu gibberelinu.^{5,22,26} Jak již bylo dříve zmíněno, z dosud známých 136 endogenních gibberelinů pouze čtyři (A₁, A₃, A₄ a A₇) jsou považovány za biologicky aktivní. Zbývajících 132 gibberelinů hraje roli biosyntetických intermediátů (dočasně) deaktivovaných gibberelinů anebo produktů GA degradace.³⁶ Biologická aktivita čtyřech bioaktivních gibberelinů (Obr. 5) je nedílně spjata s několika společnými funkčními skupinami jako karboxylová kyselina na C6 (**COOH**), laktonový můstek mezi C4 a C10 a především 3- β -hydroxylová skupina (**OH**),³⁷ které je zodpovědná za interakci GA s polárními aminokyselinovými zbytky v GID1 receptoru.⁵ Absence anebo modifikace jedné nebo více těchto funkčních skupin vede obecně ke ztrátě bioaktivity. V této skupině ale nalezneme i jeden rozdíl. Gibbereliny A₃ a A₁ obsahují navíc hydroxylovou skupinu v pozici C13 (**OH**). Tato funkční skupina má na interakci GA a GID1 pouze minimální vliv (není nezbytná) a její přítomnost a vliv na bioaktivitu tak zůstává nejasný. Jednou z navržených možností je, že C13 hydroxyl zvyšuje rozpustnost GA₁ a GA₃ v prostředí, a tak zvyšuje mobilitu těchto gibberelinů v rámci buněk.³⁴

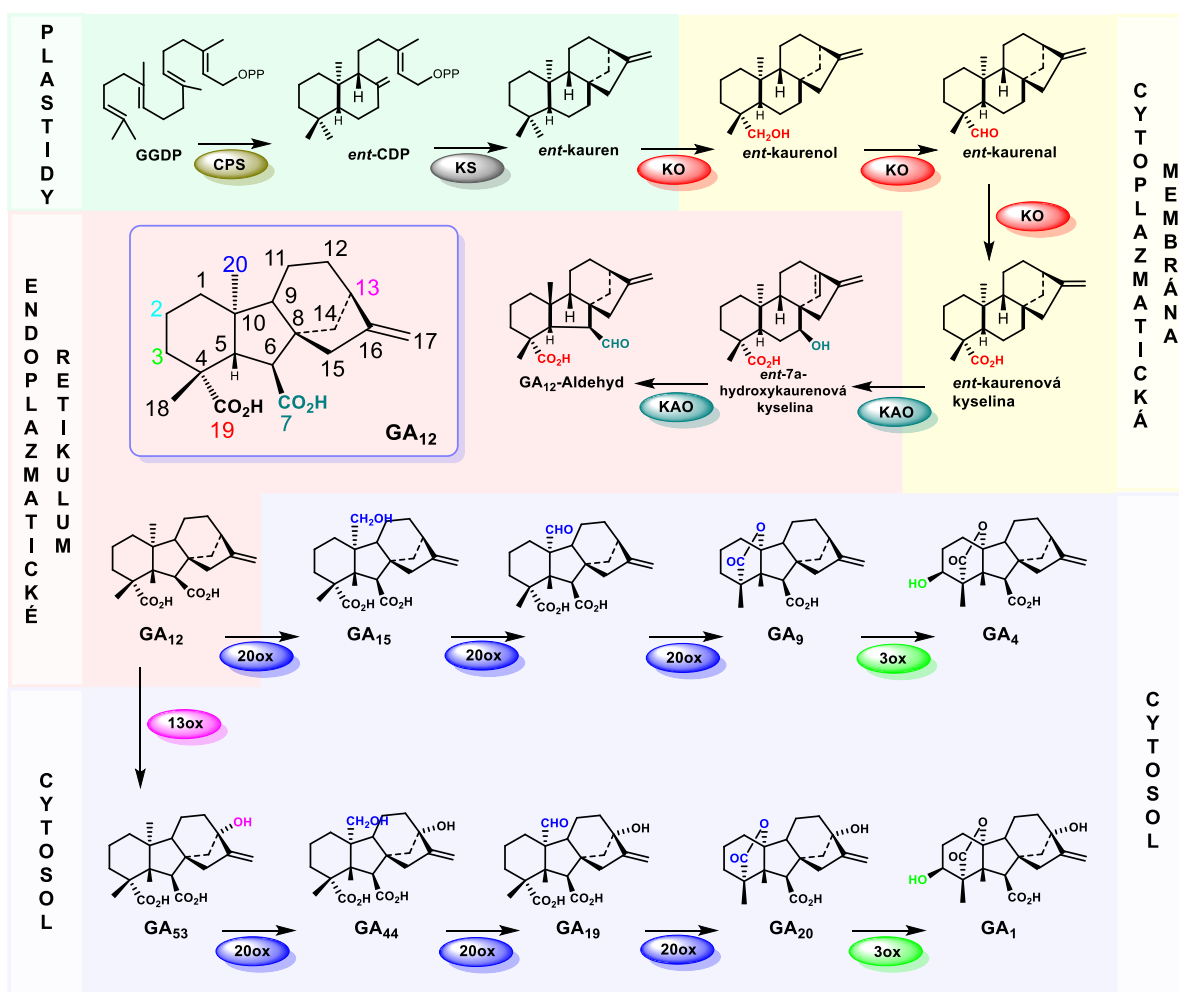
Bioaktivní gibereliny



Obr. 5 - Čtyři biologicky aktivní gibereliny (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇) s vyznačenými důležitými funkčními skupinami

3.3 Metabolická dráha giberelinů

Metabolická dráha giberelinů u vyšších rostlin byla dlouho studována prostřednictvím rozsáhlých biochemických, genetických a genomických studií, které postupně vedly k identifikaci a objasnění funkce většiny genů kódujících biosyntézu GA a taktéž jejich deaktivaci. Tyto enzymatické reakce jsou přísně a přesně kontrolovány v jejich načasování a subcelulární lokalizaci na tkáňové i orgánové úrovni. Na tomto základě lze biosyntézu GA rozdělit na tři stupně odehrávající se v různém čase ve třech různých subcelulárních kompartmentech: plastidech, endoplazmatickém retikulu a cytosolu (Obr. 6).^{38,39} Na základě nejnovějších poznatků bylo dokázáno, že biosyntetické i deaktivční dráhy GA jsou přísně regulovány vývojovými, hormonálními i environmentálními signály, což je v souladu s rolí GA jako klíčových regulátorů růstu.⁴⁰



Obr. 6 - Schéma biosyntézy giberelinů; (GGDP = geranylgerenyl difosfát, CPS = *ent*-kopalyldifosfát syntáza, CDP = *ent*-kopalyldifosfát, KS = *ent*-kauren syntáza, KO = *ent*-kauren oxidáza, KAO = oxidáza kyseliny *ent*-kaurenové, GA3ox = GA3-oxidáza, GA13ox = GA13-oxidáza, GA20ox = GA20-oxidáza)

3.3.1 Biosyntéza bioaktivních giberelinů v rostlinách

Biosyntézu GA v rostlinách lze rozdělit do tří fází podle povahy zúčastněných enzymů a odpovídající lokalizaci v buňce. První stupeň je katalyzován rozpustnými enzymy umístěnými v proplastidech a vede k produkci *ent*-kaurenu. Ve druhé fázi je *ent*-kauren postupně oxidován na GA₁₂, který tvoří obecný prekurzor všech endogenních giberelinů, a jeho přeměna je dále katalyzována pomocí

cytochromu P450 dependentní monooxidázou v endoplazmatickém retikulu. Třetí a poslední fáze dráhy je katalyzována 2-oxoglutarát dependentními dioxygenázami v cytosolu buňky.⁴¹

Gibereliny jsou vystavěny z *trans*-geranylgeranyl difosfátu (GGDP), pětiuhlíkatého stavebního kamene pro mnoho diterpenů a tetraterpenů, který se přes *ent*-kopalyl difosfát (CDP) cyklizuje ve dvou krocích na tetracyklický uhlovodíkový prekurzor *ent*-kauren.⁴² V zelené tkáni většiny rostlin je GGDP tvořen dvěma způsoby: cestou kyseliny mevalonové (MVA) v cytoplazmě a cestou methyl erythritol fosfátu (MEP) v plastidech.³⁸ Obecně je uváděno, že u většiny suchozemských rostlin je využita převážně právě MEP dráha.⁴¹ Dvoustupňová přeměna GGDP na *ent*-kauren probíhá cyklizační reakcí katalyzovanou *ent*-kopalyl difosfát syntázou (CPS) na intermediát *ent*-kopalyl difosfát (CDP). Druhý krok, při kterém se *ent*-kopalyl difosfát převádí na *ent*-kauren, je katalyzován cyklázou nazvanou *ent*-kauren syntáza (KS). V obou případech se jedná o diterpenové cyklázy (DTC) lokalizované v plastidech.

Vzniklý *ent*-kauren je v následující druhé fázi biosyntézy postupnou oxidací konvertován na GA₁₂, který je považován za obecný prekurzor všech endogenních giberelinů. Tyto oxidace jsou katalyzovány dvěma enzymy z třídy P450 monoxygenáz, *ent*-kauren oxidázou (KO) a oxidázou *ent*-kaurenové kyseliny (KAO). KO je vázaná na vnější membráně plazmidů a katalyzuje postupnou přeměnu *ent*-kaurenu za vzniku *ent*-kaurenalu a následně kyseliny *ent*-kaurenové.⁴³ KAO posléze *ent*-kaurenovou kyselinu převádí přes *ent*-7 α -hydroxy kaureonovou kyselinu na GA₁₂-aldehyd a následně na finální GA₁₂. Tento sled reakcí probíhá v endoplazmatickém retikulu, kde je KAO vázána. Zajímavým jevem je oxidativní kontrakce B kruhu, která nastává po první KAO mediované oxidaci (transformace *ent*-kaurenové kyseliny na *ent*-7 α -hydroxykaurenovou kyselinu) a která vede k tvorbě GA₁₂-aldehydu. Při této oxidativní kontrakci se kruh B *ent*-kaurenového typu zmenší z šestičlenného na pětičlenný *ent*-giberelanový skelet, který je typický pro všechny gibereliny.⁴⁴

Následující kroky biosyntézy, které dávají vzniknout giberelinové diverzitě, pak probíhají v cytosolu. Giberelin A₁₂ je zde postupně konvertován na cílené bioaktivní gibereliny GA₁ a GA₄. Tato biosyntetická dráha zahrnuje zejména katalýzu zprostředkovanou 2-oxoglutarát-dependentními dioxygenázami (2-OGD), konkrétně pak GA₂₀-oxidázou (GA₂₀ox) a GA₃-oxidázou (GA₃ox).⁴⁵ Toto probíhá po dvou paralelních dráhách, 13-hydroxylační a ne-13-hydroxylační. První z nich zahrnuje postupnou konverzi GA₁₂ s využitím GA₂₀ox na GA₉, která je posléze pomocí GA₃ox oxidována na GA₄. Druhá biosyntetická dráha pak konvertuje GA₁₂ na GA₅₃ oxidací uhlíku C13. GA₅₃ je pak s využitím GA₂₀ox přes různé intermediáty převedena na GA₁.⁴⁶ Většina vyšších rostlin produkuje GA₁ jako hlavní endogenní bioaktivní giberelin. Avšak nejhojněji využívaný modelový organismus *Arabidopsis thaliana* produkuje více GA₄ než GA₁. A navíc tyto rostliny jsou zároveň vůči tomuto giberelinu více citlivé.

3.3.2 *In planta* deaktivace giberelinů

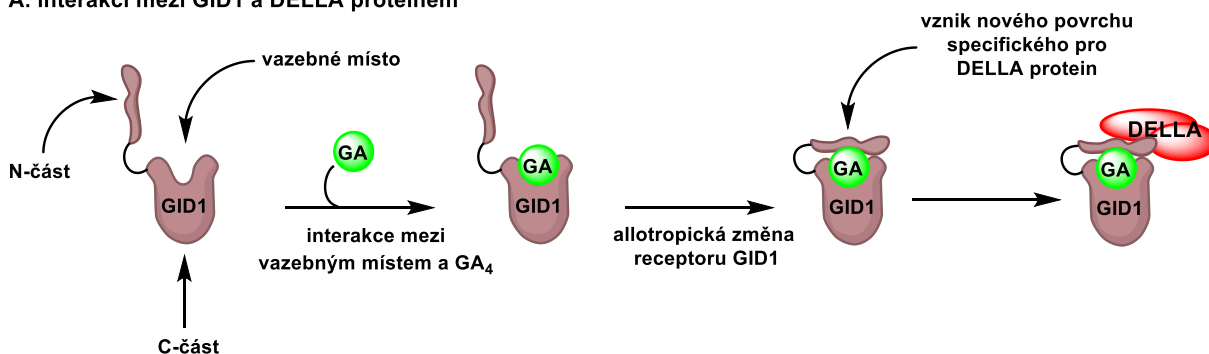
Regulace růstu a obecně všech dalších procesů, které jsou regulovány rostlinnými hormony, je otázkou udržení křehké rovnováhy mezi jednotlivými gibereliny a je závislá na jejich koncentraci. Logicky tedy, když se naučily rostliny využívané hormony připravit (biosyntéza), tak si samozřejmě vyvinuly i způsob, jak je deaktivovat. V případě giberelinů se uplatňuje při deaktivaci několik postupů, ale ten nejvíce využívaný je závislý na α -oxidaci bioaktivního giberelinu v pozici C2 pomocí GA2-oxidázy (GA2ox). Při této reakci je zavedena u cílového giberelinu nová hydroxy skupina do pozice C2. Tato deaktivace se neuplatňuje pouze v případě bioaktivních giberelinů A₁ a A₄, ale také u jednotlivých intermediátů. Enzymy GA2ox, které se podílejí na této oxidativní transformaci, tedy mohou být rozděleny do tří různých tříd.⁴⁷ Enzymy v prvních dvou třídách jsou specifické pro C19 gibereliny,⁴⁸ zatímco enzymy třetí třídy jako substráty akceptují pouze C20 gibereliny.⁴⁹ Tato třetí třída je extrémně důležitá, protože deaktivuje již samotné první intermediáty biosyntézy, gibereliny A₁₂ a A₅₃.³⁹ Nutno podotknout, že tento způsob inaktivace je možný pouze pro gibereliny, jež obsahují nenasycenou vazbu v pozici C1-C2. Mezi tyto $\Delta^{1,2}$ gibereliny patří zejména dva bioaktivní gibereliny GA₃ a GA₇.²³ Logicky tedy rostliny musely vyvinout deaktivací proces i pro $\Delta^{1,2}$ gibereliny. Druhým deaktivací mechanismus byl popsán v roce 2005 v rýži,⁵⁰ kde bylo prokázáno, že gen *ELONGATED UPPERMOST INTERNOD (EUI)* kóduje notifikaci cytochromu P450, která je schopna oxidace (epoxidace) olefinu $\Delta^{16,17}$ na odpovídající epoxid. Tento typ deaktivace je pak vhodný nejen pro $\Delta^{1,2}$ nenasycené gibereliny, ale i pro všechny C19 a C20 gibereliny, jež nemají na uhlíku C13 hydroxylovou skupinu. Třetím způsobem deaktivace giberelinů je pak jejich transformace na cukerné konjugáty. Vzniklé glukosyl ethery a estery jsou biologicky neaktivní. V případě glukosyl esterů je pak možné v přítomnosti glukosyl hydrolázy získat zpět volný giberelin.⁵¹

Rostliny obecně mají několik mechanismů, jak udržet gibereliny na určité koncentraci, tak aby zajistily tzv. GA homeostázu. V rostlinných tkáních tak může být homeostáza u GA udržována nejen potlačením biosyntézy GA, ale i jejich odbouráváním. Je známo, že potlačování biosyntézy (regulace zpětné vazby) je navozeno sníženou expresí biosyntetických genů GA, GA2ox a GA3ox. Při odbourávání giberelinů (regulace lineárního vývoje) je regulace navozena zvýšením exprese katabolických GA2ox. Třetím způsobem, jak dosáhnout homeostázy u giberelinů, je regulovat geny exprese DELLA proteinu a zpětná regulace receptorových a transportních genů. Regulace tvorby/degradace GA může být také ovlivněna podmínkami prostředí, ve kterém rostliny žijí. Bylo pozorováno, že zvýšení produkce GA závisí i na délce dní.⁵² Fotoperioda a teplota má také vliv na aktivitu enzymů, která se podílí na biosyntéze GA, což má samozřejmě vliv na produkci GA.⁵³

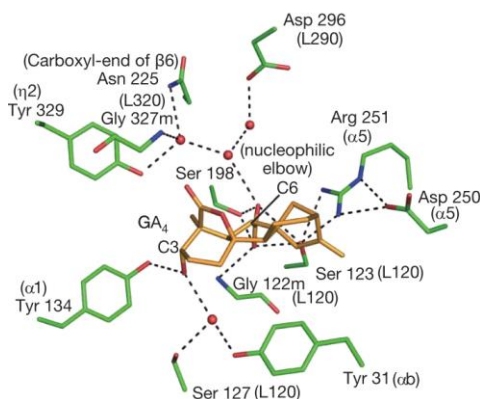
3.4 Jak gibereliny ovlivňují rostlinu – signalizace

Již od padesátých let minulého století bylo jasné, že gibereliny jsou biosyntetizovány rostlinami a patří tak mezi fytohormony. Ačkoliv biosyntéza giberelinů byla již postupem času dobře popsána a charakterizována (kapitola 3.3.1), pouze málo informací se získalo o tom, co gibereliny vlastně v rostlinách dělají a jak ovlivňují jejich růst. Až v roce 2005 Ueguči-Tanaka přišel s nálezem volného giberelinového receptoru *GID1*, který izoloval z rýže.²³ A i když se v poslední době ozývají hlasy zpochybňující jeho existenci,⁵⁴ *GID1* je k dnešnímu dni jediným identifikovaným giberelinovým receptorem. Tento receptor, *GID1* (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), je klíčovým cílem pro porozumění vlivu giberelinů na ovlivnění růstu rostlin. *GID1* se spolu s *GID2*⁵⁵ podílí na degradaci DELLA proteinu (inhibice růstu) v přítomnosti F-box proteinů *SLEEPY1* (*SLY1* - pro *GID1*) a *SNEEZY* (*SNZ* - pro *GID2*). Degradace je pak zapříčiněna SFC ubikvitinovými ligázami (Obr. 7).⁵⁶

A. interakci mezi *GID1* a DELLA proteinem



B. GA₄ v GA-vazebné místě receptoru *GID1*



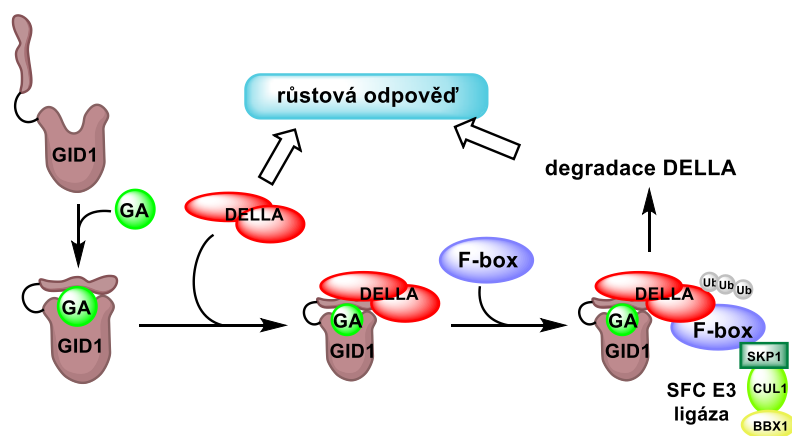
Obr. 7 - (A) Po navázání bioaktivního GA do C-části (kapsy) dojde k allosterní změně proteinu a N-část se přeloží přes C-část. Dojde zakrytí kapsy pomyslným víčkem a nově vzniklý povrch je schopný interakce s transkripčním regulátorem proteinem DELLA. (B) GA₄ v GA-vazebné místě receptoru *GID1*. Důležitá je interakce C3 hydroxylové skupiny giberelinů s tyrosinem Tyr 31 a Tyr 134.

V dnešní době obecně akceptovaný model pro růstové signální dráhy navrhuje, že DELLA proteiny hrají roli zhášecí při růstu a vývoji rostlin. DELLA protein se totiž váže na transkripční faktory, které iniciují klíčení semen, růst stonku a kvetení. Na druhou stranu gibereliny podporují růst a vývoj rostliny tak, že odstraní inhibici způsobenou DELLA proteinem.⁵⁷ Z mechanického pohledu aktivace DELLA proteinu začíná interakcí mezi *GID1* receptorem a biogenním giberelinem

(Obr. 7A). Tato interakce vede ke změně GID1 konformace a vytvoří nové aktivní místo pro navázání DELLA proteinu na GID1-GA komplex. Vznik GID1-GA-DELLA komplexu je provázen konformační změnou DELLA proteinu, která má za následek vytvoření nového volného místa specifického pro F-box proteiny, což následně umožní zavedení SCF E3 ligázy. Následně SCF E3 mediovaná ubikvitinace DELLA proteinu vede k jeho degradaci.³⁴

3.4.1 Gibereliny a jejich signální dráha

Regulace transkripce závislá na giberelinech je relativně jednoduchou signální dráhou, která podobně jako u jiných rostlinných hormonů spočívá v degradaci transkripčního regulátoru. Samotná degradace je pak spuštěna interakcí daného fytohormonu se specifickým receptorem, kde tato interakce, ať přímo nebo nepřímo, způsobí degradaci transkripčního regulátoru. Specifický receptor pro gibereliny GID1 je volný protein nacházející se v jádru a cytoplazmě. GID1 proteiny jsou obdobné lipázám štěpící lipidy u zvířat.²³ Oproti esterázám má GID1 změněné některé aminokyseliny v aktivním místě. Jinak s nimi ale sdílí značnou strukturní podobnost. Obecně se u obou proteinů jedná o globulární proteiny obsahující kapsu pro substrát. Jsou tvořeny dvěma rozdílnými částmi, C-terminální doménou, která má zmíněnou kapsu pro substrát (giberelin) a N-koncovou doménou, která je flexibilní a nezávislá na kapse. Když se bioaktivní GA naváže do C-koncové domény (kapsy), dojde k alosterické změně proteinu a N-doména se přeloží přes C-část.⁵⁸ Dojde k zakrytí kapsy pomyslným víčkem a nově vzniklý povrch je poté schopen interakce s transkripčním regulátorem proteinem DELLA.



Obr. 8 - Při nízkých koncentracích giberelinů (GA) se receptor GID1 vyskytuje v neaktivovaném stavu a proteiny DELLA inhibují expresi genů interakcí s transkripčními faktory. Při vyšších koncentracích GA má vazba GA na GID1 za následek konformační změnu proteinu DELLA. Díky tomu může dojít k interakci mezi GID1 a DELLA, což podporuje jejich asociaci s SCF E3 ubikvitin ligázou. Výsledná ubikvitinace (Ub) a destrukce proteinů DELLA proteazomem 26S vede k uvolnění transkripčních faktorů a obnově genové exprese.

DELLA proteiny jsou volné jaderné proteiny patřící do rodiny transkripčních regulátorů GRAS (pojmenováno podle prvních tří členů rodiny; GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR GAI (RGA) a SCARECROW (SCR)).^{32,59} V rámci rostlin je jejich role spojená s potlačením klíčení a růstu, a v podstatě téměř všech známých GA závislých procesů. Přítomnost GA pak reguluje jejich represivní aktivitu.⁶⁰ Proto také přebytek DELLA proteinů vede k úplnému

potlačení fenotypů rostlin, které jsou giberelin deficientní.⁶¹ DELLA proteiny jsou charakterizovány tím, že mají C-terminální doménu společnou s jinými proteiny GRAS, zatímco N-koncová doména obsahuje specifické motivy pro DELLA proteiny (aminokyselinová sekvence Asp-Glu-Leu-Leu-Ala, LEQLE a TVHYNP), jež jsou následně rozpoznány GID1-GA komplexem. Interakce mezi GA-GID1 a DELLA proteinem způsobí strukturální změnu u proteinu DELLA a umožní tak interakci DELLA proteinu s F-box proteinem SCF komplexu ubikvitin E3 ligázy (SLY1 u Arabidopsis, GID2 u rýže). Ta dále katalyzuje ubikvitinaci proteinu DELLA. Tvorba polyubikvitinového řetězce (se čtyřmi nebo více molekulami ubikvitinu) pak činí DELLA protein cílem pro cílenou degradaci pomocí 26S proteazomeu. GA tedy funguje jako alosterický aktivátor GID1, což způsobuje strukturální změny umožňující asociaci receptoru s proteiny DELLA.

Biologicky aktivní gibereliny ve své struktuře obsahují karboxylovou kyselinu na uhlíku C6 a hydroxylovou skupinu na C3. Tyto dvě skupiny jsou nezbytné pro biologickou aktivitu, protože interagují s polárními aminokyselinovými zbytky v GID1 receptoru (Tyr 31 a Tyr 134). GA₁ a GA₃ navíc obsahují C13 hydroxylovou skupinu, která přispívá k vazebné afinitě pouze sporadicky a její role je nejasná. Hlavním účelem C13 hydroxylové skupiny může být zvýšení rozpustnosti giberelinu ve vodném prostředí, což by zlepšilo mobilitu těchto giberelinů mezi buňkami.³⁴ Oproti tomu přítomnost hydroxylové skupiny na uhlíku C2 je nežádoucí, neboť ve vazebném místě způsobuje nepříznivé stereoelektronické interakce mezi GA a GID1 a snižuje tak vazebnou afinitu. Jak bylo zmíněno v předešlé kapitole (kapitola 3.3.2), hydroxylace na C2 je důležitým deaktivčním mechanismem giberelinů u vyšších rostlin.

Správně kontrolovaná hladina bioaktivních GA v rostlinách je naprosto nezbytná pro správný růst a vývoj rostlin. K porozumění této rovnováhy je tedy naprosto nutné podrobně prozkoumat tři základní faktory, jež ji ovlivňují. První dva, biosyntéza a deaktivace giberelinů, již byly důkladně popsány. Třetí faktor, transport GA v rámci rostlin a přesná lokalizace biosyntetických míst, jsou však velká neznámá. Přesné mapování biosyntetických míst GA spolu s porozuměním transportu je tedy dalším nezbytným předpokladem pro pochopení regulace GA signálních drah. Bohužel tomuto tématu byla zatím věnována pouze minimální pozornost a v literatuře nalezneme pouze 4 publikace zabývající se touto problematikou. Tři z těchto 4 publikací se zabývají popisem dálkového transportu giberelinů prostřednictvím floému^{14,15,16} a čtvrtá publikace se zaměřuje na blízký transport.⁶² Je tedy zcela jisté, že tato oblast skrývá mnohá překvapení a bude v budoucnu jistě v hledáčku mnohých výzkumných skupin.

3.5 Využití giberelinů v zemědělství

Z ekonomických důvodů se stalo ovlivňování některých aspektů růstu a vývoje rostlin vesměs nevyhnutelné. V polních podmínkách se těchto výsledků dosahovalo zpočátku použitím hnojiv, pesticidů a herbicidů. Tyto metody jsou postupně nahrazovány jinými alternativami z důvodu jejich nežádoucích účinků na životní prostředí. Jako vhodnou alternativou se začínají prosazovat přírodní produkty a jejich deriváty. Tyto látky obecně vykazují nízkou toxicitu, snadno se degradují v přírodě a jsou šetrnější k životnímu prostředí.²⁶ Vzhledem k tomu, že GA jsou brány jako klíčová skupina rostlinných bioregulátorů hrající ústřední roli při kontrole růstu rostlin, jsou vysoko na seznamu alternativ k jejich syntetickým protějškům. To je také spolu s následným dávkováním pravděpodobně jeden z hlavních důvodů, proč se bioaktivní gibereliny přenesly z laboratoří do oblasti zemědělství a zahradnictví, kde se tyto fytohormony využívají. Většího komerčního ohlasu se však dostalo využití antagonistů GA a inhibitorů jejich biosyntézy.²² V těchto případech se jedná o látky syntetického původu, které například snižují prodlužování stonků, čímž snižují riziko poléhání obilovin, rýže a řepky olejky a vedou tak k vyšším výnosům plodin.⁶³ V současné době se tedy prakticky využívají dva hlavní přístupy umožňující změnit hladinu biologicky aktivních GA v rostlinách: (a) zvýšení endogenních hladin GA se dosáhne použitím exogenních přídavek GA (viz 3.5.1), a (b) snížení endogenních koncentrací GA se dosahuje aplikací GA antagonistů a inhibitorů biosyntézy GA (viz kapitola 3.5.2).

Ohlédneme-li se zpět do minulosti, svůj význam v zemědělství gibereliny získaly již v druhé polovině 20. století během tzv. druhé zelené revoluce. V průběhu tohoto globálního procesu docházelo ke šlechtění nových trpasličích odrůd zemědělských rostlin, které přinesly výrazný nárůst výnosů plodin. Šlechtěný fenotyp daných plodin byl získán sníženou odpovědí na úroveň giberelinů v daných rostlinách. Z genetického hlediska toho bylo dosaženo zavedením mutantních alel na jednom ze dvou lokusů *Reduced height-1* (*Rht-B1* a *Rht-D1*). Tyto části kódují mutantní protein DELLA, kterému chybí doména zapojená do interakce DELLA-GID1. Kvůli tomu nemůže docházet k GA indukované degradaci proteinu DELLA, což vede k trpasličímu fenotypu rostlin.⁶⁴ Důležitá role této mutace byla následně potvrzena objevem podobných mutací na necitlivých trpasličích mutantech kukuřice, rýže a ječmene. Všechny tyto mutantní odrůdy vykazují nesmyslné mutace na N-konci DELLA proteinu nebo u TVHYNP oblasti v DELLA proteinech a generují DELLA protein odolný vůči giberelinem vyvolané degradaci.^{32,65}

3.5.1 Exogenní přídávky giberelinů

Přestože jsou gibereliny hojně přítomny v rostlinách, houbách i bakteriích, *G. fujikuroi* je pro svoji vynikající produktivitu giberelinů jediným organismem využívaným pro jejich průmyslovou výrobu. Vezmeme-li jako příklad kyselinu giberelovou (GA₃), reprezentativní molekulu GA, výtěžek v průmyslové ponorné fermentaci (SMF) u této houby dosáhl více než 2 g/L po 7 dnech fermentace. U fermentace na pevné fázi (SSF) by výtěžek ještě uspokojivější (zejména díky efektivnější izolaci GA₃), při čemž bylo získáno 7 g/kg po 9 dnech fermentace. Tyto hodnoty jsou mnohem vyšší než

reportované výtěžky jiných mikroorganismů.⁶⁶ Samozřejmě, příprava giberelinů chemickou syntézou je taktéž možná,²⁶ avšak příliš finančně náročná, a tedy pro komerční využití naprosto nevhodná.

Tabulka 1 - Aplikace GA v zemědělství

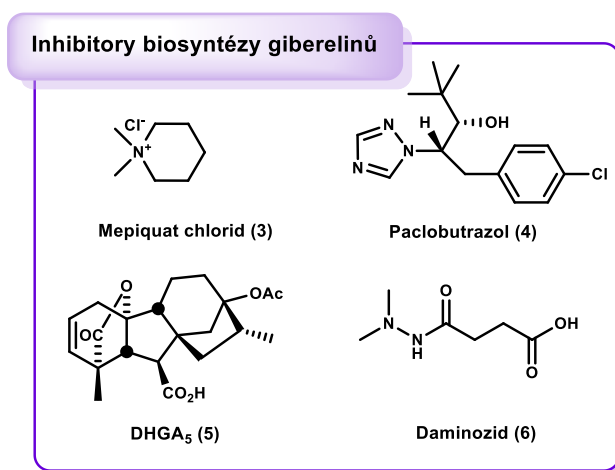
| Giberelin | Aplikace | Účinek |
|---|------------------|--|
| GA ₃ | okrasné rostliny | indukce kvetení ²² |
| | stolní hrozny | zvětšení plodů ⁶⁷ |
| | slad | časové zkrácení procesu výroby sladu ²² |
| | brambory | indukce klíčení ²² |
| | ovoce | indukce partenokarpického vývoje ²² |
| | citrusové plody | oddálení stárnutí kůry ²² |
| GA ₄ /GA ₇ | dvouleté jabloně | zabránění hnědnutí plodů ⁶³ |
| GA ₄ /GA ₇ + benzyladenin | jabloně | zvětšení velikosti plodů a jejich tvaru ⁶³ |
| GA ₇ | jabloně | inhibice vývoje květenství v druhém roce po aplikaci ^{8,68} |
| | stolní hrozny | inhibice tvorby semen ⁶⁷ |
| GA ₉ | jabloně | inhibice strupnatosti ²⁶ |

Nejvíce využívaným giberelinem v průmyslu se stala již zmíněná kyselina giberelová (GA₃).²² Tato sloučenina našla mnoho aplikací ve vinařství, zahradnictví i zemědělství. Většina stolních hroznů se pěstuje pomocí jejího exogenního přídatku, kdy po aplikaci v době kvetení dochází ke zvětšení bobulí. Přídatkem giberelinu A₇ je posléze inhibována tvorba semen.⁶⁷ Další využívaný giberelin, GA₄, je snáze degradovatelný v porovnání s GA₃, a je proto vhodnější pro aplikace, kde je nežádoucí dlouhodobý účinek giberelinů. Navíc GA₄ vzniká fermentací jako směs GA₄ a GA₇ a vzhledem k jejich velké chemické podobnosti (GA₇ oproti GA₄ obsahuje $\Delta^{1,2}$ olefin v A kruhu) je jejich separace ve fermentačních extraktech velmi obtížná. Výsledkem je přítomnost (většinou nežádoucí) GA₇ v různých komerčně dostupných přípravcích (obecně 40 %). Hlavní využití této směsi GA_{4/7} je pak v ovocnářském průmyslu, kde brání hnědnutí jablek.⁶³ Jestliže je však tato směs aplikována na celé stromy u domestikovaných jabloní v období indukce květů, přítomnost GA₇ zabraňuje vývoji květenství ve druhém roce po aplikaci. Tento pozorovaný, leč zatím nevysvětlený efekt (mechanismy spojené s touto regulací nejsou dosud prozkoumány) je velice vítaný, pakliže je aplikován na jabloně v dvouletém cyklu (kvetení první rok, plody 2. rok), protože vede ke zvýšení velikosti a kvality plodů (jabloň není vysilována tvorbou plodů v 1. období). Zmíněnou nevýhodou je však aplikace u jednoletých jabloní, protože ty pak ve druhém roce nemají žádné plody. Neznámý mechanismus účinku GA₇ na květenství jabloní je samozřejmě limitující a do určité míry iritující. Předpokládá se, že inhibice kvetení pomocí GA₇ je způsobena změnou v expresi

genů klíčových pro kvetení.^{8,68} Bohužel se tyto geny prozatím nepodařilo identifikovat. Pokud je směs GA_{4/7} aplikována spolu s cytokininem benzyladeninem, u jablek dochází ke zlepšení jejich velikosti a tvaru.⁶³ Giberelin A₉ se úspěšně využívá k zastavení strupatosti u některých odrůd jablek.²⁶ Další oblastí, kde se využívá aplikace GA₃, jsou citrusové plody, u kterých po aplikaci dochází k oddálení stárnutí kůry, která se takto udrží po delší dobu v lepším stavu, čímž prodlouží dobu skladování. Své využití našly gibereliny i při výrobě sladu k vaření piva. Jedná se o velmi nákladný a časově náročný proces, který jde o 2-3 dny (z původních 8-10) zkrátit přidáním 25-500 pg GA₃ na každý kilogram ječmene. Také u mnoha různých okrasných rostlin lze exogenním přídavkem GA₃ urychlit kvetení nebo spustit kvetení i mimo sezónu. Za zmínku stojí i méně běžné aplikace GA₃, jako je zvýšení vegetativního růstu (cukrová třtina, špenát, chmel), indukované klíčení brambor či partenokarpický vývoj ovoce, kde pozdní mrazy poškodily květ a zabránily tak oplodnění.²² Přehled aplikací a účinku jednotlivých giberelinů naleznete v Tabulka 1.

3.5.2 Využití inhibitorů biosyntézy giberelinů

Obecně se jako inhibitory růstu v zemědělství a zahradnictví využívají látky, jejichž cílem je zamezení nežádoucího růstu rostlin bez toho, aniž by došlo ke snížení produktivity u kulturních plodin. Pozorovaným efektem aplikace takových látek je snížené prodloužení buněk rostlin nebo rychlost jejich dělení. Často jsou tyto látky označovány jako „retardéry růstu“, protože nezasahují do změny vývojových vzorců a vůči rostlinám a jejich okolí nejsou příliš toxické, zejména pokud porovnáme jejich účinky v kontextu jiných chemických přísadků.⁷



Obr. 9 – Struktury vybraných inhibitorů biosyntézy giberelinů

Prvními využívanými inhibitory růstu se staly v roce 1949 vybrané deriváty nikotinu.⁶⁹ Následně bylo objeveno a aplikováno v zemědělství mnoho dalších sloučenin s podobnými účinky. V dnešní době tyto látky dělíme do tří skupin, kde každá skupina látek inhibuje biosyntézu giberelinů v jiném stádiu.⁷ První skupinu tvoří sloučeniny „oniového typu“, jako je chlormequat chlorid, mepiquat chlorid (3), chlorphonium a AMO-1618. Tyto látky obsahující ve své struktuře kvartérní amoniové ionty a jsou aktivní v počátečních krocích biosyntézy, kde inhibují přeměnu

geranylgeranylpyrofosfátu na *ent*-kauren. Z pohledu mechanismu tyto látky blokují následující cyklázy, kopolyldifosfát syntázu a *ent*-kauren syntázu. Druhou skupinu látek tvoří sloučeniny obsahující heterocyklus s atomem dusíku, jako jsou např. ancymidol, flurprimidol, paclobutrazol (**4**) či inabenfid. Tyto retardéry blokují monooxygenázy závislé na cytochromu P450, čímž inhibují oxidaci *ent*-kaurenu na kyselinu *ent*-kaurenovou. Třetí skupinu pak tvoří strukturní deriváty 2-oxoglutarové kyseliny, která je ko-substrátem dioxygenáz katalyzujících poslední kroky při biosyntéze GA. Do této třídy řadíme látky odvozené od acylcyklohexandionu, např. trinexapac-ethyl a daminozid (**6**). Tyto látky blokují zejména oxidační krok vedoucí k instalaci 3 β -hydroxylové skupiny u GA.⁷

Tyto tři typy růstových inhibitorů jsou velice účinné při kontrole růstu plodin. Bohužel také mají nezanedbatelný negativní vliv na životní prostředí a při jejich aplikaci se často projeví vedlejší účinky jako nežádoucí kvetení a zrání plodů.^{70,71} Toto chování syntetických látek je také důvodem, proč se k těmto látkám začala hledat přírodní alternativa s minimálními vedlejšími účinky. Dosud nejznámější zástupce takového typu regulátoru růstu jsou 16,17-dihydro gibereliny a jejich deriváty, pro které je charakteristická 16,17-dihydro skupinou (redukce $\Delta^{1,2}$ olefinu na D kruhu). Neaktivnějším členem této třídy látek je *exo*-16,17-dihydro giberelin A₅-13-acetát (**5**), označený také DHGA5. U této látky je právě 16,17-dihydro skupina klíčovým prvkem inhibujícím růst rostlin. Acetát na uhlíku C13 zde pak hraje roli „transportéru“, jež podporuje vstřebání **5** do rostlin, čímž zvyšuje její účinnost.⁷² Z pohledu mechanismu účinku se předpokládá, že strukturní podobnost látky **5** s GA₂₀ a GA₉ umožňuje kompetitivní substrátovou inhibici mezi těmito látkami při biosyntéze GA₄ a GA₁ přes GA3ox.⁷² Výsledná nižší koncentrace bioaktivních GA zpomaluje růst rostlin anebo ovlivňuje jejich strukturu.⁶ Látka **5** avšak musí být *de novo* připravena z komerčně dostupné GA₃. Tato syntéza je však v dnešní době komerčně nerentabilní, a látka je tedy mimo výzkumná pracoviště nevyužívána. V současné době neexistuje žádná syntetická metoda, jež by byla schopna připravit cílovou látku **5** v multigramovém množství za rozumnou cenu. Některá parciální zlepšení sice zvýšila konkurenceschopnost přípravy látky **5**, ale dosažené úspěchy pořád nejsou dostatečné.⁷³ Obdobně, některé strukturní deriváty látky **5** vykazovaly ještě větší inhibiční aktivitu než látka **5**, ale jejich příprava byla ještě nákladnější. Cílem dnešního výzkumu je tedy vývoj nových struktur (odvozených i od látek negiberelinového typu), které by vykazovaly stejné biologické účinky jako látka **5**, avšak bylo by je možné připravit v žádaném multigramovém množství a za přijatelnou cenu.

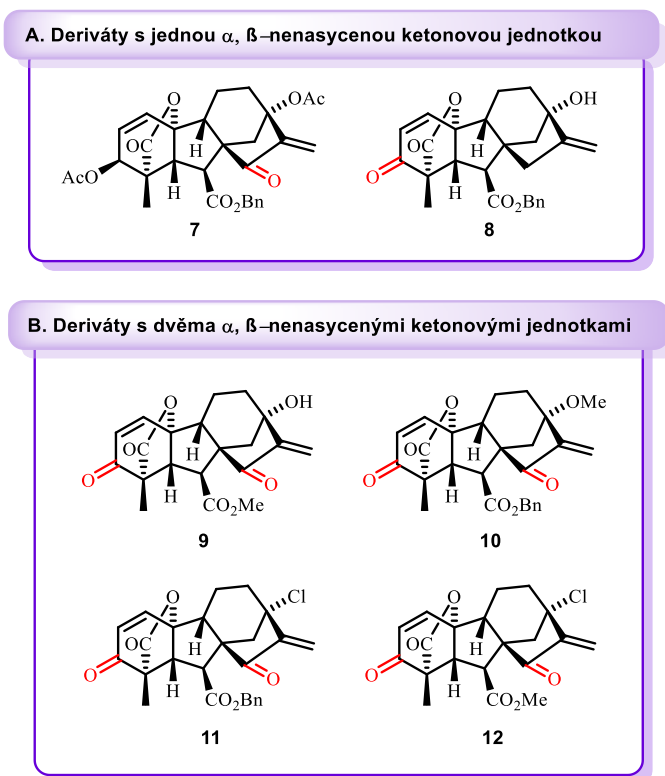
3.6 Gibereliny jako potenciální léčiva s protinádorovým účinkem

Většina výzkumu spojeného s gibereliny se velice úzce zaměřuje na oblast zemědělství a rostlin. Měli bychom si však uvědomit, že tyto fytohormony jsou přítomny ve všech rostlinách a plodinách, jež neustále konzumujeme. Zkoumat jejich vliv, pokud tedy existuje, na naše buňky a potažmo zdraví je proto více než relevantní oblastí výzkumu. Tato oblast je však velice málo probádána a z pohledu giberelinů se dotýká pouze výzkumu vlivu na nádorové buňky. Toto ovšem není překvapivé, neboť onkologický výzkum se v posledních letech stal jednou z největších oblastí farmaceutického průmyslu jak z hlediska počtu projektů, tak i klinického výzkumu.⁷⁴ Identifikace několika funkčních molekulárních a biologických prvků odlišujících nádorové buňky od normálních buněk vedly k novým a moderním terapeutickým přístupům vedoucím k prokázání těchto typů onemocnění. Vývoj léčebných postupů tak zahrnuje vše od podávání cytotoxických léčiv a nespecifické chemoterapie až po podávání léků záměrně vyvinutých proti specifickým molekulárním cílům.⁷⁵ Je známo, že přírodní látky mají díky své strukturní diverzitě v boji proti nádorovým onemocněním své nezastupitelné místo. Hlavní snahou vědců je tak získat konkrétní přírodní látku nebo skupinu látek definovaných struktur s přesně popsáním účinkem. Tyto izoláty jsou pak určeny přímo k terapii,⁷⁶ nebo dále k přípravě derivátů s lepší terapeutickou hodnotou. Nezřídka však také slouží jako základní strukturní vzor pro design a konstrukci nových čistě syntetických preparátů.⁷⁷

Jak již bylo řečeno, gibereliny se řadí mezi diterpenoidní přírodní látky. U některých z těchto substancí byly reportovány různé biologické aktivity⁷⁸ zahrnující taktéž silnou protinádorovou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím.⁷⁹ Vzhledem k tomu, že biologická aktivita giberelinů je primárně spjata s jejich rolí fytohormonů,²² jejich využití v oblasti protinádorových léčiv je více než sporadická.^{80,11} O to překvapivější je pak zjištění, že *ent*-kauren, biosyntetický prekurzor giberelinů, vykazuje jak protinádorovou, tak protizánětlivou aktivitu.⁸¹ V tomto případě se ukázalo, že deriváty *ent*-kaurenů s α,β -nenasycenými ketony v kruhu A a D jsou ty hlavní biologicky aktivní intermedie (Obr. 10).⁸² Žádný známý endogenní giberelin však neobsahuje obdobný strukturní motiv, což je možná důvod, proč protinádorová aktivita giberelinů nebyla systematicky zkoumána.¹¹ V okamžiku, kdy došlo k identifikaci α,β -nenasycených ketonů jako privilegovaného strukturního motivu u *ent*-kaurenů, mnoho výzkumných skupin se pustilo do přípravy giberelinových derivátů obsahující právě tento strukturní motiv s cílem změnit původně netoxickou molekulu na molekulu s potenciální protinádorovou aktivitou. V průběhu let byla navržena řada derivátů giberelinů, které mohly potenciálně protinádorovou aktivitu vykazovat. Většina z těchto derivátů byla odvozena od kyseliny giberelové, která byla využita již v minulosti jako výchozí látka při *de novo* syntézách i semisyntézách různých tříd giberelinů.²²

3.6.1 Vývoj molekuly GA-13315

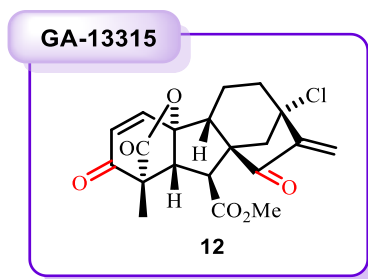
Chen a kolektiv v roce 2009¹² potvrdili základní domněnku,⁸² že za cytotoxickou aktivitou u této třídy přírodních látek je zodpovědný α,β -nenasycený ketonový motiv. Při syntéze nových gibberelinových derivátů vycházel z GA₃ a jejich derivátů GA₃ methyl esteru a GA₃ benzyl esteru. Následně jeho výzkumná skupina připravila knihovnu látek, do nichž byly inkorporovány α,β -nenasycené ketonové jednotky. Tato knihovna byla následně otestována na její cytotoxickou aktivitu. Testování proběhlo na buněčných liniích odvozených od lidské promyelocytické leukemie (HL-60) a karcinomu močového měchýře (BIU-87). Molekuly, jež obsahovaly pouze jednu α,β -nenasycenou strukturní jednotku (**7** a **8**), vykazovaly velmi nízkou cytotoxicitu ($IC_{50} >40$), zatímco deriváty neobsahující tento motiv vůbec, nevykazovaly cytotoxicitou žádnou. Molekula **12** (nazvaná GA-13315) se dvěma α,β -nenasycenými ketonovými jednotkami v kruhu A a D vykazovala nejsilnější cytotoxickou aktivitu ze všech připravených derivátů (HL-60 ($IC_{50} = 2,7$ nM), BIU-87 ($IC_{50} = 0,5$ nM)).¹² U této látky (**12**) byl také pozorován účinek vůči katalytické aktivitě topoizomerázy I (koncentrace 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ kompletně inhibovala aktivitu topoizomerázy I) a byla tedy vybrána jako nejslibnější molekula pro další vývoj (Obr. 10).



Obr. 10 – (A) Struktura gibberelinových derivátů s inkorporovanou jednou ketonovou jednotkou v kruhu A (**8**) nebo v kruhu D (**7**). (B) Struktura gibberelinových derivátů s inkorporovanými dvěma α,β -nenasycenou strukturními jednotkami vyskytující se na kruzích A a D. Molekula **12** (GA-13315) vykazovala nejvyšší cytotoxicitu ze všech připravených derivátů.

3.6.1.1 Molekulární cíle GA-13315

Účinky molekuly **12** (Obr. 11) byly dále testovány vůči vybraným molekulárním cílům specifickým pro jednotlivé typy rakoviny. Prvním potencionálním a slibným cílem bylo cévní zásobení nádoru. Je známo, že nádorové buňky jsou závislé na přítomnosti funkčních krevních kapilár, jelikož dostatečné krevní zásobení pozitivně přispívá k jejich růstu, přežití a šíření metastází.⁸³ Předpokladem bylo, že protinádorová aktivita látky **12** může být tedy spojena s inhibicí angiogeneze.¹² Tento cíl byl tedy logickým krokem při testování účinků této látky. Obecně růst a šíření některých nádorů krevními a lymfatickými cestami je podmíněno celou řadou faktorů, z nichž se jako nejdůležitější jeví vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF).⁸⁴ Účinek derivátu **12** byl proto *in vivo* otestován na VEGF-indukovanou angiogenezi a bylo prokázáno, že již 2,5 mg/kg látky **12** redukuje množství proteinu VEGF. Antiangiogenní aktivita tohoto giberelinového derivátu byla tedy potvrzena.



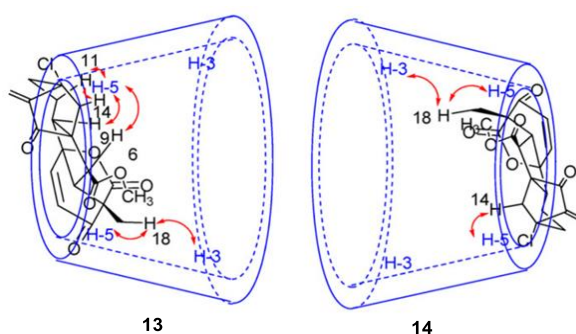
Obr. 11 - Struktura GA-13315 (**12**) s α , β -nenasycenými ketony vyskytujícími se na kruzích A a D

Látka **12** byla následně otestována na buněčných liniích, které jsou rezistentní vůči více lékům.⁸⁵ Takzvaná multiléková rezistence (MDR) zůstává jednou z primárních příčin selhání chemoterapie u nádorových onemocnění.⁸⁶ ABC transportéry (z anglického ATP-binding cassette) jsou transportní proteiny, které se na této lékové rezistenci podílejí díky ATP závislým transportním proteinům, které vypuzují cytostatika z buněk. Účinek látky **12** byl testován na buněčných liniích MCF-7 a od nich odvozených MCF-7/adr (disponují nadměrnou expresí ABC1). Bylo pozorováno, že testovaná látka **12** je selektivní vůči rakovinným buňkám rezistentním na standardní chemoterapii a je schopna zvýšit účinnost konvenčních chemoterapeutik. Bylo navrženo, že působí proti efluxní funkci ABCB1 a pozitivně se podílí na zvýšení exprese proapoptického Bax proteinu. Tento výsledek by mohl v budoucnu vést k zavedení látky **12** (v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky) k léčbě nádorů vykazujících nadměrnou expresi ABCB1.¹⁰

3.6.1.2 Konjugáty GA-13315 a dalších giberelinových derivátů

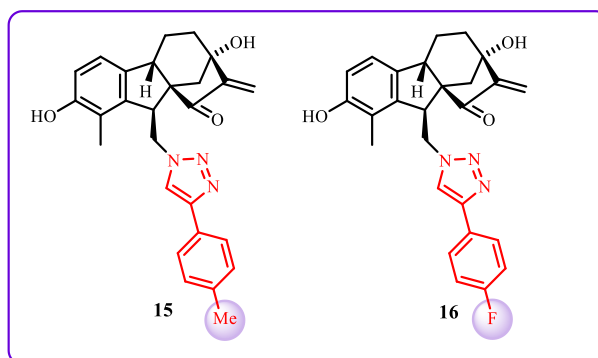
Navzdory výše popsaným vlastnostem a vysoké aktivitě látky **12** vůči testovaným nádorovým liniím vykazuje tato látka i vlastnosti, které jsou nevhodné pro další medicínální vývoj dané látky. Zejména jde o nízkou rozpustnost látky ve vodě a zároveň nízkou stabilitu za normálních podmínek. Bylo tedy zapotřebí vyhledat efektivní a netoxický nosič, který by zvýšil rozpustnost molekuly **12**, a pokud možno zvýšil její stabilitu, a navíc ji dopravil k terapeutickému cíli.⁸⁷ Již v minulosti ve

farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu se ke zlepšení fyzikálních účinků molekul využívaly cyklodextrinové jednotky (CD). Jedná se o ve vodě rozpustné oligomery skládající se z šesti až osmi D-glukózových jednotek propojených α -1,4-glukosidickou vazbou. Tato struktura vede ke vzniku centrální hydrofobní dutiny s hydrofilními postranními řetězci.⁸⁸ V závislosti na těchto účincích se Yang a kolektiv⁸⁷ rozhodli CD integrovat do komplexu s **12**. Byly syntetizovány komplexy s β -cyklodextrinem a jeho derivátem 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin (HP β CD), který disponuje vyšší rozpustností ve vodě a zároveň nižší cytotoxicitou (Obr. 12). Následné experimenty ukázaly, že vytvořené komplexy disponovaly kýženou vyšší rozpustností a stabilitou. Jejich další vývoj je nyní ve stádiu experimentů.



Obr. 12 – Pravděpodobný způsob začlenění GA-13315 do komplexu s β -cyklodextrinem **13** (β -CD) a 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem **14** (HP β CD)⁸⁷

Dalším strukturním motivem, který byl uvažován pro modifikaci látky **12**, a který by mohl vést ke zlepšení jejich vlastností, jsou triazolové heterocykly. Tyto sloučeniny byly již v minulosti zkoumány, neboť vykazují širokou škálu biologických a farmaceutických účinků včetně protinádorových, antimykotických, imunosupresivních, antialergických, antituberkulárních, antimikrobiálních a protizánětlivých. Tyto heterocykly byly tedy využity jako vhodné stavební jednotky pro vývoji tohoto typu léčiv.⁸⁹ Wu a spolupracovníci⁹⁰ tak připravili sérii heterocyklických hybridních derivátů vybraných triazolů a derivátů alogiberelenů s α,β -nenasycenými ketony na kruhu D. Z připravené knihovny molekul vykazovaly nejvyšší aktivitu látky **15** a **16** (Obr. 13), které nejenže disponovaly širokým spektrem protinádorové aktivity vůči panelu lidských nádorových linií (HL-60, A549, SMMC-7721, SW480, MCF-7), ale látka **16** navíc dokázala navodit apoptózu u těchto buněk a zastavit buněčný cyklus v jeho S fázi.



Obr. 13 - Konjugáty vytvořené spojením derivátu kyseliny alogiberelové a 1,2,3 – triazolu

3.7 Předchozí dosažené výsledky v rámci naší skupiny

Jak již bylo v úvodních kapitolách zmíněno, cílem projektu, na kterém jsem pracovala v rámci bakalářské i diplomové práce, je dosažení a potvrzení předpokládané struktury nově detekovaného endogenního giberelinu (Schéma 2). Na základě navržené struktury, doc. Pospíšil navrhl zahájit syntézu cílové molekuly z komerčně dostupného giberelinu A₃ a celkový syntetický plán⁹¹ rozdělil na dva klíčové kroky. Prvním stěžejním krokem je příprava intermediátu **17** obsahujícího dvě ortogonální chránící skupiny na karboxylových skupinách v pozici C19 a C7. Druhou klíčovou molekulou je intermediát **1**, který je vhodný k selektivní allylické oxidaci pozice C12 a provedení inter-intra molekulární hydroborace vedoucí k selektivní instalaci C11 hydroxy skupiny (Schéma 2).

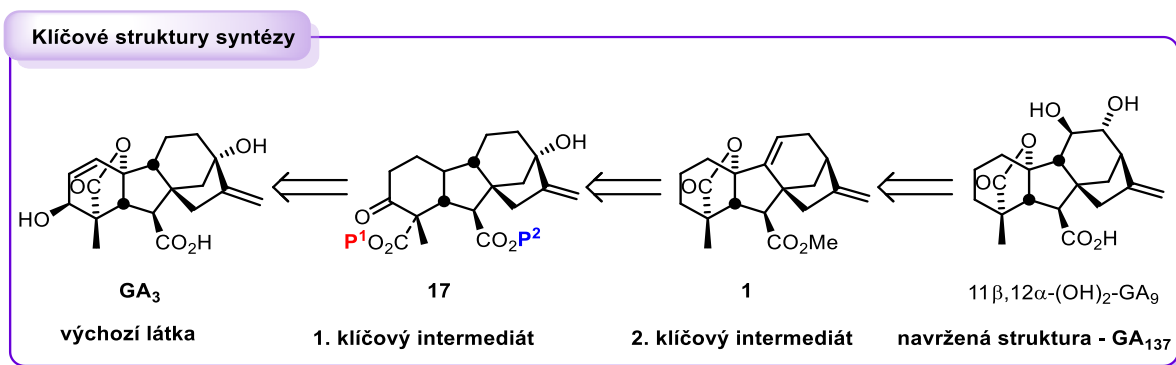


Schéma 2 - Struktury dvou klíčových intermediátů **1** a **17** vedoucí k navržené struktuře potencionálního endogenního giberelinu A₁₃₇

V rámci předchozí bakalářské práce se mi podařilo připravit látku **17**, která představuje první nezbytný klíčový intermediát pro naplánovanou cílenou syntézu. Jednalo se o 5 krokovou syntézu, kdy cílová molekula byla po optimalizaci všech dílčích syntetických kroků připravena v globálním výtěžku 14 % (Schéma 3). Navržený syntetický postup vycházel z předpokladu, že C7 methyl ester a C19 MOM ester budou ty nejvhodnější chránící skupiny. Avšak navzdory předpokladům MOM estery se vyznačovaly velmi nízkou stabilitou a nebylo je možné připravit v adekvátních výtěžcích. Bylo tudíž testováno několik dalších chránících skupin a nalezení vhodné C19 protektivní skupiny bylo stěžejním problémem celé syntézy. Ve výsledku jako nejvhodnější chránící skupina byl zvolena benzylová skupina a byla připravena molekula **18** (Schéma 3).

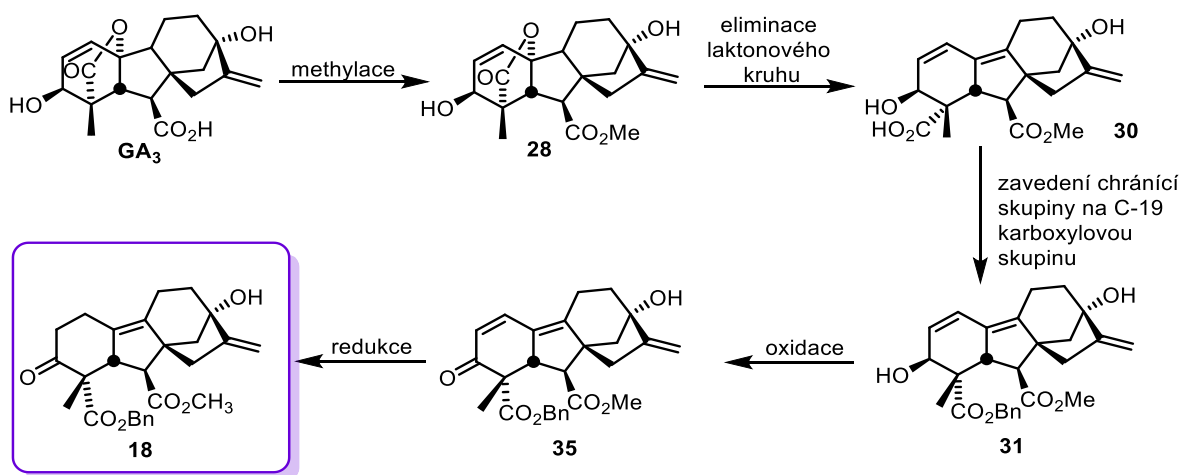
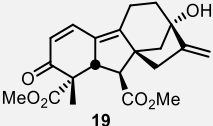
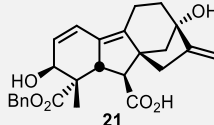
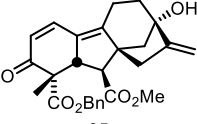
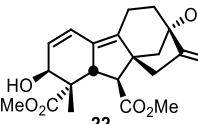
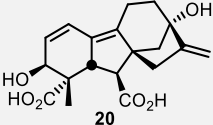
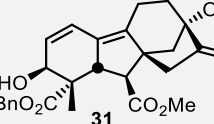


Schéma 3 - Syntéza prvního klíčového intermediátu **18** provedena v rámci bakalářské práce

V průběhu plánované syntézy i mimo ni bylo připraveno mnoho giberelinových derivátů, u kterých byla ohodnocena jejich biologická aktivita z pohledu jejich vlivu na buněčné linie, kdy důraz byl primárně kladen na jejich cytotoxickou aktivitou. Vybrané látky byly testovány na buněčných liniích prsního adenokarcinomu MCF-7. Ze všech testovaných látek pouze látky **35** a **19** vykazovaly cytotoxickou aktivitu. Inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro intermediát **35** činila $6,75 \pm 2,35 \mu\text{M}$, pro látku **19** činila $10,4 \pm 1,6 \mu\text{M}$. Překvapivě jsme u dalších 4 derivátů (látky **20**, **21**, **22** a **31**) pozorovali vliv na zvýšení proliferace buněk a to až o 153 %. Zdá se, že hlavním společným rysem u těchto látek je přítomnost C3 hydroxy skupiny a $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -nenasyceného systému.

Tabulka 2 - Výsledky biologických testů na buněčné linii MCF-7 (odvozeno od prsního adenokarcinomu). Látky byly testovány v různých koncentracích a vyhodnoceny po 72 h inkubaci.

| Testovaná látka | IC_{50} (μM) MCF7 | Zvýšení proliferace | Testovaná látka | IC_{50} (μM) MCF7 | Zvýšení proliferace |
|---|----------------------------------|---------------------|--|----------------------------------|---------------------|
|  | $10,4 \pm 1,6$ | - |  | >50 | 153 % |
|  | $6,75 \pm 2,35$ | - |  | >50 | 153 % |
|  | >50 | 150 % |  | >50 | 150 % |

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

V rámci syntézy byly využity následující chemikálie: aceton, acetyl chlorid (AcCl), anhydrid kyseliny octové, azobisisobutyronitril (AIBN), benzyl bromid (BnBr), bromid zinečnatý (ZnBr₂), deuterovaný chloroform (CDCl₃), Dess-Martinovo činidlo (DMP), dichlormethan (DCM), dimethylformamid (DMF), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), ethyl acetát (EtOAc), *N*-chlorsukcinimid (NCS), NH₂NH₂ v acetonitrilu (1M roztok), hydrazin acetát (NH₂NH₂•AcOH), hydrazin hydrát (NH₂NH₂•H₂O), hydrazin monohydrobromid (NH₂NH₂•HBr), hydrazin monohydrochlorid (NH₂NH₂•HCl), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃), hydroxid draselný (KOH), chlorid měďný (CuCl), chloroform (CHCl₃), kyselina citrónová, kyselina chlorovodíková (HCl), imidazol, kyselina octová, kyselina sírová (H₂SO₄), methanol (CH₃OH), methyloxalyl chlorid, methyl jodid (CH₃I), *N,N'*-diisopropylcarbodiimid (DIC), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), nasycené roztoky NaCl, NaHCO₃, Na₂CO₃ a NaH₂PO₄, *N*-methylnitrosourea, diethylether, oxalyl chlorid, petrolether (PE), síran hořečnatý (MgSO₄), síran sodný (Na₂SO₄), tetrabutylamonium chlorid (TBAC), tetrabutylamonium fluorid (TBAF), 2-*tert*-butyl-1,3-diisopropylisourea, *tert*-butyldimethylsilyl chlorid (TBSCl), tetrahydridoboritan sodný (NaBH₄), tetrahydrofuran (THF), thiokarbonyldiimidazol, trimethylamin, toluen, uhličitan draselný (K₂CO₃) od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner a Fluka.

4.2 Metody a materiál

4.2.1 Obecné metody organické syntézy

Veškeré použité výchozí látky a další chemikálie jsou komerčně dostupné a byly použity bez dodatečné purifikace v kvalitě deklarované a dodané výrobcem. Všechny reakce, pokud není v postupu specifikováno jinak, byly provedeny za laboratorní teploty (RT) pod inertní atmosférou (argon) a v plameni žíhané aparatuře s využitím standartních laboratorních technik. Průběh reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 SIL G/UV254 s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel nebo Sigma-Aldrich). K detekci jednotlivých sloučenin přítomných na TLC bylo využito UV záření ($\lambda = 250$ nm) a následně byla využita detekce pomocí vizualizačních roztoků, a to pomocí Hannesianova roztoku anebo bazického KMnO₄. Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie (CC) na silikagelu 34 od firmy Sigma Aldrich (velikost částic 230-400 mesh; velikost pórů 60 Å). Spektra hmotnostní spektrometrie syntetizovaných látek byla měřena s využitím HPLC-PDA-MS metody. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu (10 μ L 3x10⁻⁵M v 1% methanolu) a naneseny na reverzní kolonu (Symmetry C18, 5 μ m, 150 mm x 2,1 mm; Waters, Milford, MA, USA) při 40 °C. Rozpouštědlo A obsahovalo 15mM mravenčnan amoný (HCOONH₄) upravený na pH 4,0. Rozpouštědlo B obsahovalo methanol a průtok byl nastaven na 0,2 mL/min. Vzorky byly

analyzovány s využitím gradientu: 0 min, 10 %B; 25 min; 90% B; 35 min; 90% B; 45 min; 10% B v *Waters Alliance 2695 Separations Module* (Waters, Manchester, UK). Následně byl eluent zaveden do Waters 2996 PDA detektoru (Waters, Manchester, UK) (rozmezí skenování 210–400 nm) a *QDa Mass Spectrometry* (Waters MS Technologies, Manchester, UK) se systémem ESI. Napětí bylo nastaveno na 15 V, iontový zdroj byl zahřán na 120 °C a měření bylo prováděno v pozitivním (ESI⁺) a negativním módu (ESI⁻). ¹H NMR a ¹³C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL 500 JNM-ECA pracující při frekvenci 500 MHz (¹H) a 125 MHz (¹³C) v rozpouštědlech CDCl₃ nebo CD₃COCD₃ při laboratorní teplotě. Chemické posuny (δ, ppm) a štěpící konstanty (Hz) ¹H NMR spekter jsou uvedeny standardním způsobem vzhledem ke zbývajícimu CHCl₃ přítomnému v CDCl₃ (δH = 7,27 ppm) a prostřednímu signálu v CHD₂C(O) CD₃ přítomném v acetonu-*d*₆ (δH = 2,05 ppm). ¹³C NMR chemické posuny (δ, ppm) jsou uváděny vzhledem k CDCl₃ (δC = 77,23 ppm, prostřední signál) a CD₃C(O)CD₃ (δC = 29,84 ppm, prostřední signál). Protonové interakce jsou prezentovány jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletu (dd), triplet (t), triplet tripletu (tt), pentet (p) a multiplet (m). Teploty tání (b.t.) byly měřeny na přístroji B-540 Büchi (Švýcarsko). Veškeré látky byly váženy za pomoci analytických vah značky Radwag AS 220.R2. K zahušťování látek byly využity vakuové rotační odparky (RVO) I-300 (Büchi, Švýcarsko).

4.2.1.1 Vizualizační TLC roztoky – příprava

- **Zásaditý roztok KMnO₄** byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO₄ a 20 g K₂CO₃ ve 150 mL 10% NaOH.
- **Hannesianův vizualizační roztok** byl připraven rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové ve 250 mL ethanolu.

4.2.2 Biologický materiál

4.2.2.1 Buněčné linie

Toxicita vybraných látek byla testována na buněčných liniích MCF-7 odvozených od prsního adenokarcinomu a RPE1-hTERT linií epitelových buněk retiny immortalizovaných lidskou telomerázou. Buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂ v DMEM kultivačním médiu doplněném o 10% fetálního séra, glutaminu (2 mM/L), streptomycinu (100 µg/mL) a penicilinu (100 IU/mL) a v pravidelných intervalech byly pasážovány.

4.2.2.2 *Caenorhabditis elegans*

Během experimentů bylo pracováno s wild-type linií *Caenorhabditis elegans* N2, které byly kultivovány na Petriho miskách při teplotě 20 °C za použití standardních protokolů, pufrů a médií.⁹² Hlístice byli krmeny uracil-auxotrofními bakteriemi *Escherichia coli* OP50 (ZR). Použití tohoto kmene zajišťuje, že bakterie nerostou v médiích chudých na uracil určených pro kultivaci *C. elegans*. Pro kultivaci červů na pevném médiu byly bakterie naneseny na Petriho misky s NGM (nematode

grown medium), rozetřeny po jeho ploše a kultivovány přes noc při 37 °C. *C. elegans* i bakterie byly zakoupeny z *Caenorhabditis* Genetic Center (Minnesota, USA).

4.2.2.3 Kompetitivní inhibice giberelin 2-oxidázy (GA3ox2)

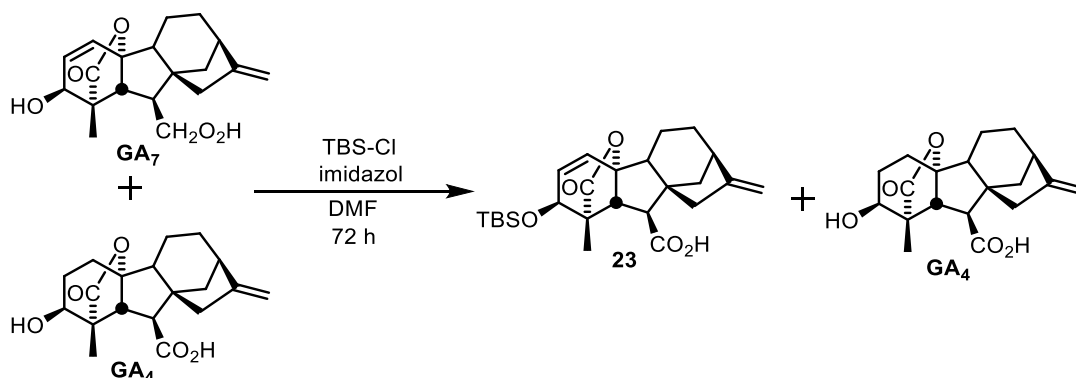
Pro experiment byla využita giberelin oxid GA3ox2 izolovaná z pšenice, jejíž gen byl klonován v bakteriálním expresním vektoru pET32 v *Escherichia coli*. Bakterie byly kultivovány při teplotě 37 °C v požadovaném objemu LB média na danou koncentraci buněk a exprese genu byla indikována pomocí isopropyl- β -D-1-thiogalaktosidu (500 μ M). Bakterie se dále kultivovaly přes noc při 20 °C, přičemž za těchto podmínek produkují rekombinantní enzym. Následně bakterie byly homogenizovány (french press), vzniklý lyzát byl ošetřen směsí DNAsy a RNAsy a pevné částice byly centrifugací odstraněny. Vzniklé alikvoty byly uchovány v tekutém dusíku. Tyto experimenty byly prováděny dr. Pavlem Jaworkem ve skupině prof. P. Heddena (Laboratoř Růstových regulátorů, PřF, UP).

4.3 Organická syntéza

4.3.1 Syntéza vycházející z giberelinu A₇

4.3.1.1 Selektivní silylace GA₇ ze směsi GA₄/GA₇

(1*S*,2*S*,4*aR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4*b*,5,6,7,8,9,10,10*a*-dekahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-10-karboxylová kyselina (**23**)



K roztoku směsi **GA₄/GA₇** (50 g; 151 mmol) v DMF (250 mL; 0,6M vůči směsi **GA₄/GA₇**) byl přidán imidazol (30 g; 452 mmol). Po jeho kompletním rozpuštění byl přidán *tert*-butyldimethylsilyl chlorid (36 g; 242 mmol) a reakční směs byla míchána po dobu 72 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo ke směsi přidáno 400 mL kyseliny octové a 500 mL destilované vody. Výsledný roztok byl ochlazen v ledové lázni, kde došlo v průběhu 30 minut k vysrážení bílé tuhé látky. Ta byla posléze zfiltrována a na vzduchu vysušena. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; Hexan/EtOAc = 5:1→4:1→2:1) a poskytl produkt **23** (16,10 g; 24 %) ve formě bílé krystalické látky. K filtrátu byl následně přidán nadbytek destilované vody (1000 mL) a výsledná směs byla chlazená v ledové lázni. Došlo k vysrážení bílé pevné látky, ke které bylo posléze přidáno 25 mL roztoku Et₂O/Hex (1:1, V/V), díky čemuž došlo k rozpuštění zbylé látky **23**. Následně byla sraženina zfiltrována a dala vznik čisté **GA₄** (30,49 g; 61 %), který byl skladován pro další použití bez dodatečné purifikace.

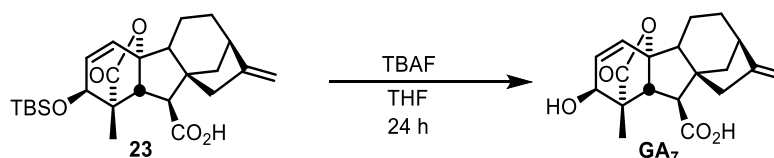
Látka **23**; B.t. 188,8-190,2 °C; $\alpha_D^{22} = -84,5^\circ$ (*c* 1,42; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.23 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 3.28 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.21 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.80 (d, 1H), 2.67–2.61 (m, 1H), 2.20 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 2.15 – 2.07 (m, 3H), 1.92 (dd, *J* = 12.4, 5.9 Hz, 1H), 1.75–1.66 (m, 4H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.39 (td, *J* = 12.2, 7.4 Hz, 1H), 1.21 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.09 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 179.26, 179.10, 156.86, 133.00, 131.91, 107.74, 91.50, 70.16, 54.24, 52.49, 52.39, 51.73, 50.78, 44.43, 38.78, 36.58, 31.56, 25.81, 25.77, 18.19, 18.11, 16.11, 15.28, -3.46, -3.95, -4.73. MS (ESI⁺), *m/z* (%): 445 [M+H]⁺, 467 [M+Na]⁺, 483 [M+K]⁺; R.t. = 28.37 min.

GA₄; B.t. 201-201,7 °C; $\alpha_D^{22} = -17^\circ$ (*c* 0,95; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, ACETONE-*D*₆) δ (ppm): 4.96 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 3.72 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 3.21 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.68 – 2.55 (m, 2H), 2.18 – 2.12 (m, 1H), 2.12 – 2.06 (m, 2H), 1.97 – 1.92 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 3H), 1.76 – 1.67 (m,

3H), 1.67 – 1.60 (m, 2H), 1.55 (dddd, $J = 13.9, 8.1, 6.2, 2.0$ Hz, 2H), 1.38 (dddt, $J = 13.3, 11.1, 7.6, 1.2$ Hz, 1H), 1.11 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, ACETONE- D_6) δ (ppm): 178.69, 173.87, 158.28, 107.43, 94.27, 70.27, 55.36, 54.31, 52.54, 51.77, 45.07, 39.80, 37.57, 32.25, 29.16, 28.14, 16.76, 15.24; MS (ESI $^+$), m/z (%): 315 [M-H $_2$ O + H] $^+$; R.t. = 20.83 min.

4.3.1.2 Desilylace GA $_7$ -silyl etheru **23**

(1*S*,2*S*,4*aR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4*b*,5,6,7,8,9,10,10*a*-dekahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-10-karboxylová kyselina (**GA** $_7$)

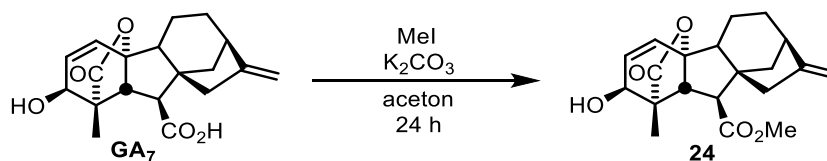


K roztoku látky **23** (16,05 g; 36,10 mmol) v THF (10 mL) bylo při teplotě 0 °C přidán TBAF (72 mL, 72 mmol, 1,0M roztok v THF). Při dané teplotě pod inertní atmosférou byla reakční směs míchána po dobu 15 minut, následně byla samovolně ohřáta na laboratorní teplotu a při této teplotě reakce probíhala 24 hodin. Po ukončení reakce byl ke směsi přidán 1,0M vodný roztok kyseliny citrónové (30 mL). Posléze bylo pomocí RVO ze směsi odpařeno THF a ke zbylé části byl přidán nadbytek 1,0M vodného roztoku kyseliny citrónové (50 mL). Došlo k vysrážení gumovité sraženiny představující výsledný surový produkt, který byl následně purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO $_2$; chloroform/EtOAc/AcOH = 30:10:0,1→10:10:0,1→10:30:0,1). Po odpaření spojených frakcí byla získána **GA** $_7$ (7,72 g; 65 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 190,2-192,2 °C; $\alpha_D^{23} = -12,7^\circ$ (c 1,28; CH $_3$ OH); ^1H NMR (500 MHz, ACETON- D_6) δ (ppm): 6.35 (dd, $J = 9.3, 0.8$ Hz, 1H), 5.86 (dd, $J = 9.3, 3.7$ Hz, 1H), 5.00 – 4.91 (m, 1H), 4.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.02 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.18 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.67 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.28 (s, 2H), 2.18 – 2.05 (m, 3H), 2.02 (p, $J = 2.2$ Hz, 2H), 1.69 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 1.64 – 1.55 (m, 2H), 1.41 – 1.31 (m, 1H), 1.18 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM- D) δ (ppm): 178.60, 176.94, 156.45, 133.44, 132.18, 128.74 (d, $J = 101.9$ Hz), 108.03, 94.14, 91.06, 53.48, 52.42, 52.21, 51.75, 51.46, 51.09, 50.68, 44.38, 38.85, 38.67, 36.80, 36.48, 31.46, 28.16, 27.49, 16.25, 16.03, 14.87, 14.65; MS (ESI $^+$), m/z (%): 353 [M+Na] $^+$, 369 [M+K] $^+$; R.t. = 20.35 min.

4.3.1.3 Příprava GA₇-methyl esteru **24**

Methyl (1S,2S,4aR,7R,9aR,10S,10aR)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulen-10-karboxylát (24)

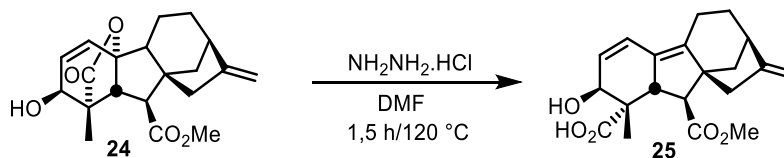


K roztoku **GA**₇ (7 g, 21,14 mmol) v acetonu (106 mL; 0,1M vůči **GA**₇) byl přidán bezvodný K₂CO₃ (4,38 g, 31,71 mmol). Po 5 minutách byl po kapkách přidán methyl jodid (1,58 mL; 25,38 mmol) a výsledná reakční směs byla míchána po dobu 72 hodin. Po zreagování veškeré výchozí látky byla směs zředěna destilovanou vodou (250 mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 250 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (200 mL), sušeny nad bezvodným Na₂SO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, P.E./EtOAc = 2:1→1:1→3:7) a poskytl produkt **24** (6,5 g, 89 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 148,3-148,7 °C; $\alpha_D^{22} = +17,6^\circ$ (*c* 1,63; CH₃OH); B.t. 148,3-148,7 °C; $\alpha_D^{22} = 17,6^\circ$ (*c* 1,63; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 6.27 (dd, *J* = 9.3, 0.8 Hz, 1H), 5.86 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 4.94 (ddt, *J* = 9.3, 2.6, 1.2 Hz, 1H), 4.82 (dd, *J* = 2.7, 1.4 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.17 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 2.74 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 2.68 – 2.53 (m, 1H), 2.16 – 2.02 (m, 3H), 1.90 – 1.83 (m, 1H), 1.81 – 1.73 (m, 1H), 1.74 – 1.66 (m, 1H), 1.67 – 1.59 (m, 2H), 1.58 – 1.49 (m, 1H), 1.39 – 1.31 (m, 1H), 1.23 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 178.98, 172.99, 156.72, 132.55, 107.73, 91.20, 53.51, 52.44, 52.23, 51.68, 50.95, 44.57, 38.71, 36.49, 31.46, 15.95, 14.50; MS (ES⁺), *m/z* (%): 367 [M+Na]⁺, 383 [M+K]⁺; R.t. = 22.53 min.

4.3.1.4 Příprava dienu **25** pomocí hydrazinolýzy

(1S,2S,7R,9aS,10S,10aS)-2-hydroxy-10-(methoxykarbonyl)-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1-karboxylová kyselina (25)



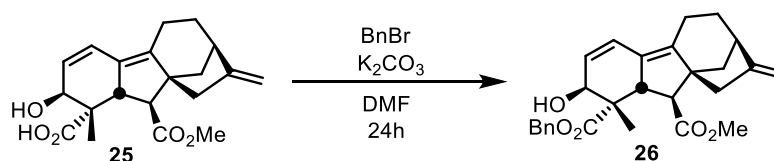
K roztoku **24** (500 mg; 1,51 mmol) rozpuštěném v DMF (5 mL; 0,5M vůči **24**) byl přidán hydrazin monohydrochlorid (2,48 g; 36,24 mmol). Suspenze byla zahřáta na 120 °C a při této teplotě míchána po dobu 1,5 hodiny (rozpuštění výchozí látky). Následovalo ochlazení na laboratorní teplotu s následným chlazením v ledové lázni, zředění destilovanou vodou (10 mL), okyselení na pH 3 pomocí koncentrované HCl a extrakce pomocí EtOAc (3 x 25 mL). Spojené organické fáze byly promyty 1M aq. HCl (2 x 20 mL) a zahuštěny na RVO. Produkt byl rozpuštěn v EtOAc (15 mL) a promyt roztokem nasyceného NaHCO₃ a Na₂CO₃ (1:1 (V/V), 2 x 10 mL). Získaná organická fáze

obsahuje výchozí látku **24** (2,5 g; 25 %). Spojené bazické vodní fáze byly posléze promyty EtOAc (3 x 20 mL). Bazické vodné fáze byly pomocí koncentrované HCl okyseleny na pH 3 a extrahovány EtOAc (3 x 30 mL). Takto vzniklé spojené organické fáze byly zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt **25** (98,5 mg; 20 %) byl získán ve formě bílé látky a pro další použití byl použit bez následné purifikace.

B.t. 136,5-137,4 °C; $\alpha_D^{22} = +7,9^\circ$ (*c* 1,79; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, ACETON-*D*₆) δ (ppm): ¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 6.32 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.89 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 4.92 – 4.82 (m, 1H), 4.33 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.55 (dd, *J* = 8.7, 4.6 Hz, 1H), 2.55 – 2.43 (m, 1H), 2.11 – 2.07 (m, 1H), 2.09 (s, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.74 – 1.51 (m, 3H), 1.22 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 179.34, 175.89, 153.29, 142.19, 127.85, 125.57, 124.55, 106.23, 69.66, 51.87, 50.24, 49.37, 49.20, 46.06, 42.20, 40.18, 36.93, 31.78, 22.60, 19.92.; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 345 [M+H]⁺, 367 [M+Na]⁺; R.t. = 18.3 min.

4.3.1.5 Chránění C19 karboxylu molekuly **25**

*1-benzyl 10-methyl (1S,2S,7R,9aS,10S,10aS)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[*a*]azulen-1,10-dikarboxylát (26)*

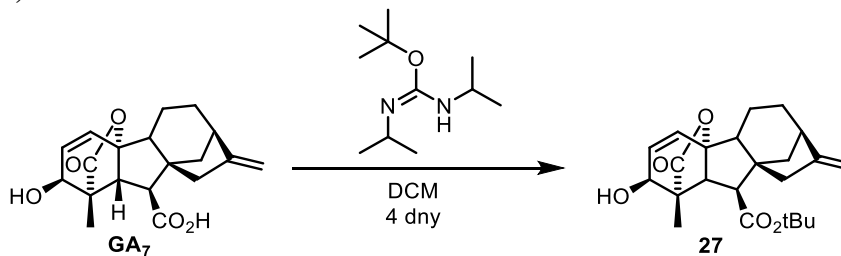


Krystalická látka **25** (513,50 mg; 1,55 mmol) byla rozpuštěna v DMF (16 mL; 0,1M vůči **25**) a míchána za laboratorní teploty. Po 5 minutách byl přidán K₂CO₃ (322 mg; 2,3 mmol), po dalších 5 minutách byl pomalu přikapáván BnBr (221 μ L; 1,86 mmol). Po zreagování veškeré výchozí látky (24 hod) byla reakční směs zředěna destilovanou vodou (20 mL). Následně byla směs extrahována pomocí EtOAc (3 x 50 mL), promyta solankou (1 x 50 mL), sušena nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, P.E./EtOAc = 10:1→6:1→4:1→2:1) a poskytl produkt **26** (48,3 mg, 7 %) ve formě žluté krystalické látky.

B.t. 129,2-130,4 °C; $\alpha_D^{22} = -30,9^\circ$ (*c* 1,09; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 7.37 – 7.27 (m, 3H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 6.36 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.92 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 8.7, 4.4 Hz, 1H), 2.68 (s, 1H), 2.39 (dd, *J* = 16.2, 6.1 Hz, 1H), 2.15 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.12 – 2.03 (m, 2H), 2.06 – 1.91 (m, 1H), 1.61 (dddd, *J* = 12.4, 6.4, 4.4, 2.0 Hz, 1H), 1.44 (tdd, *J* = 12.3, 6.3, 2.4 Hz, 1H), 1.32 (dd, *J* = 10.9, 2.5 Hz, 1H), 1.27 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 175.39, 174.40, 153.36, 142.45, 136.00, 128.54, 128.23, 128.10, 127.79, 125.60, 124.80, 106.26, 70.11, 66.11, 58.70, 51.83, 49.67, 49.45, 47.46, 45.71, 42.10, 40.24, 33.04, 20.15, 19.97; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 435 [M+H]⁺; R.t. = 20.8 min.

4.3.1.6 Chránění C7 karboxylu molekuly GA₇

Tert-butyl (1S,2S,4aR,7R,9aR,10S)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulen-10-karboxylát (27)



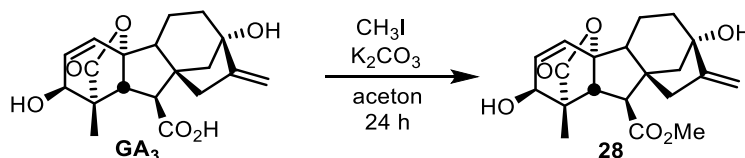
K roztoku GA₇ (85 mg; 0,25 mmol) v CH₂Cl₂ (5 mL) byl za laboratorní teploty po kapkách přidán *tert*-butyl *N,N'*-diisopropylkarbamimidát (200 mg, 1 mmol). Při dané teplotě reakce běžela 4 dny. Po uplynutí reakční doby byla směs rozředěna pomocí CH₂Cl₂ (25 mL), zfiltrována a filtrát byl promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (10 mL), solankou (10 mL), vysušen nad NaSO₄, a zahuštěn na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, P.E./EtOAc = 6:1→4:1→2:1→1:1) a poskytl produkt **27** (28,5 mg; 49 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 162,2-164,1 °C; $\alpha_D^{23} = +1,8^\circ$ (*c* 1,09; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.32 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.88 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 4.99 (d, 1H), 4.87 (d, 1H), 4.14 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 3.09 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 2.67 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 2.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.21 – 1.98 (m, 4H), 1.88 (dd, *J* = 12.5, 5.9 Hz, 1H), 1.71 (dd, *J* = 11.4, 2.8 Hz, 5H), 1.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 9H), 1.26 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 178.91, 171.56, 157.15, 133.64, 132.20, 107.76, 90.92, 81.42, 70.00, 53.53, 52.26, 51.81, 51.73, 44.25, 38.63, 36.50, 31.63, 29.80, 28.20, 16.03, 14.59; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 388 [M+H]⁺; R.t. = 21.47 min.

4.3.2 Syntéza vycházející z giberelinu A₃

4.3.2.1 Chránění C7 karboxylu u GA₃

Methyl (1S,2S,4aR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulen-10-karboxylát (28)

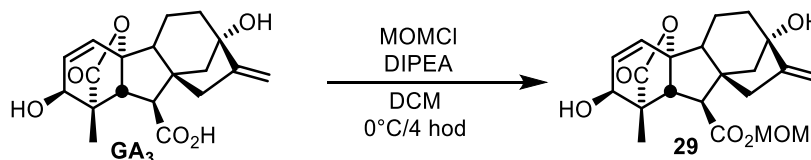


K roztoku GA₃ (5 g, 14,4 mmol) v acetonu (18 mL, 0,1M vůči GA₃) byl přidán bezvodný K₂CO₃ (3 g, 21,7 mmol). Po 5 minutách byl po kapkách přidán methyl jodid (1,01 mL, 17,6 mmol) a výsledná reakční směs byla míchána po dobu 24 hodin. Po zreagování veškeré výchozí látky byla směs zředěna destilovanou vodou (250 mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 250 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (200 mL), sušeny nad bezvodným Na₂SO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí

sloupcové chromatografie (SiO₂, P.E./EtOAc = 2:1→1:1→3:7) a poskytl produkt **28** (4 g; 86 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. = b.t. 195-196,5 °C; $\alpha_D^{24} = +53,2^\circ$ (*c* 1,62; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.32 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.90 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 5.27 (dd, *J* = 2.9, 1.9 Hz, 1H), 4.96 (dd, 1H), 4.15 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.20 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.79 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.27 – 2.17 (m, 2H), 2.14 – 2.00 (m, 3H), 1.96 – 1.88 (m, 2H), 1.84 – 1.78 (m, 1H), 1.74 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 1.69 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 1.24 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 178.42, 172.58, 157.02, 133.13, 132.44, 107.76, 90.49, 78.30, 69.92, 53.54, 52.88, 52.29, 51.16, 50.70, 50.58, 44.91, 43.17, 38.30, 17.10, 14.50; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 378 [M+NH₄]⁺, 399 [M+K]⁺; R.t. = 14.06 min.

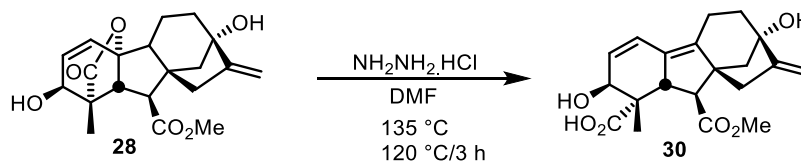
*Methoxymethyl (1S,2S,4aR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[*a*]azulen-10-karboxylát (29)*



K roztoku **GA₃** (5 g, 14,4 mmol) v CH₂Cl₂ (150 mL, 0,1M vůči **GA₃**) byla přidána DIPEA (0,5 mL; 2,8 mmol) a reakční směs byla ochlazena na teplotu 0 °C. Následně byl pomalu přikapáván čerstvě připravený MOMCl (5 mL, 17,5 mmol, 3,5M roztok v toluenu⁹³) a výsledná reakční směs byla míchána po dobu 4 hodin při dané teplotě. Po zreagování veškeré výchozí látky byla směs zředěna pomocí NH₄Cl (200 mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 500 mL), promyta nasyceným roztokem NaCl (500 mL), sušena nad bezvodým MgSO₄, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Výsledný surový produkt byl následně purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; EtOAc/Hexan = 1:4→1:2→1:1) a poskytl produkt **29** (2,43 g, 47 %) ve formě žluté krystalické látky. B.t. 159,6 – 160,6 °C; $\alpha_D^{21} = +48,2^\circ$ (*c* 1,29; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, ACETONE-*D*₆) δ (ppm): 6.39 (dd, *J* = 9.3, 0.9 Hz, 1H), 5.90 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.27 – 5.21 (m, 1H), 4.93 – 4.83 (m, 1H), 4.71 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.05 (ddd, *J* = 6.9, 3.6, 0.9 Hz, 1H), 3.28 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 2.74 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.30 – 2.20 (m, 2H), 2.03 – 1.67 (m, 6H), 1.19 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, ACETONE-*D*₆) δ (ppm): 178.97, 172.27, 158.84, 134.02, 132.84, 106.85, 91.28, 91.07, 78.07, 70.14, 57.86, 54.27, 53.38, 52.12, 51.97, 51.04, 45.51, 43.68, 39.80, 17.65, 15.06; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 429 [M+K]⁺; R.t. = 14.72 min.

4.3.2.2 Příprava dienu 30 pomocí hydrazinolýzy

(1*S*,2*S*,7*S*,9*aR*,10*S*,10*aS*)-2,7-dihydroxy-10-(methoxykarbonyl)-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10*a*-oktahydro-1*H*-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-1-karboxylová kyselina (**30**)

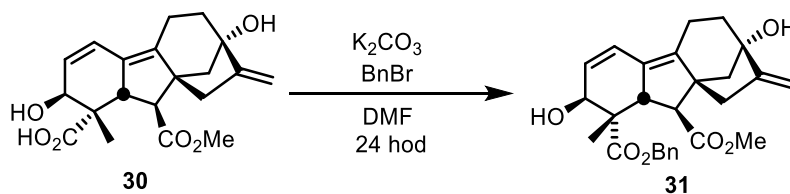


Bílá krystalická látka **28** (10 g; 27,70 mmol) byla rozpuštěna v DMF (90 mL; 0,3M vůči **28**) a míchána při teplotě 135 °C pod inertní atmosférou. Následně byl přidán hydrazin monohydrochlorid (23 g; 33 mmol) a vzniklá suspenze byla míchána při dané teplotě, dokud nedošlo k její homogenizaci. Následně byla teplota rychle snížena na 120 °C, při které byla reakční směs míchána po dobu 3 hodin. Po uplynutí této doby byla směs samovolně ochlazena na laboratorní teplotu a následně chlazená v ledové lázni. Následovalo zředění destilovanou vodou (100 mL), okyselení na pH 3 pomocí koncentrované aq. HCl a extrakce pomocí EtOAc (3 x 250 mL). Spojené organické fáze byly promyty 1M HCl (2 x 200 mL) a zahuštěny na RVO. Produkt byl rozpuštěn v EtOAc (150 mL) a promyt roztokem nasyceného NaHCO₃ a Na₂CO₃ (1:1 (V/V), 2 x 75 mL). Získaná organická fáze obsahuje výchozí látku (**28**; 2,5 g; 25 %). Spojené vodní fáze byly posléze promyty pomocí EtOAc (3 x 200 mL). Spojené bazické vodné fáze byly pomocí koncentrované HCl okyseleny na pH 3 a extrahovány pomocí EtOAc (3 x 300 mL). Spojené organické fáze byly následně zahuštěny na RVO a poskytly výsledný surový produkt **30** (3,94 g; 39 %) ve formě žluté látky. Produkt byl použit v další reakci bez následného dodatečného čištění.

B.t. 126,6-127,9 °C; $\alpha_D^{24} = -50,5^\circ$ (*c* 1,30; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.39 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.95 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.93 (broad s, 1H), 4.31 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.52 – 3.42 (m, 4H), 2.96 (s, 6H), 2.26 (q, *J* = 16.6 Hz, 2H), 1.82 – 1.67 (m, 3H), 1.25 (s, 3H).; ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 180.20, 175.32, 153.82, 140.33, 128.31, 126.84, 125.13, 106.50, 79.24, 69.91, 58.63, 56.54, 52.59, 52.08, 49.68, 49.35, 47.99, 39.63, 39.15, 20.96, 19.91, 18.55; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 361 [M+H]⁺, 383 [M+Na]⁺, 399 [M+K]⁺; R.t. = 13.26 min.

4.3.2.3 Chránění C19 karboxylu molekuly 30

1-benzyl 10-methyl (1*S*,2*S*,7*S*,9*aR*,10*S*,10*aS*)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10*a*-oktahydro-1*H*-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-1,10-dikarboxylát (**31**)

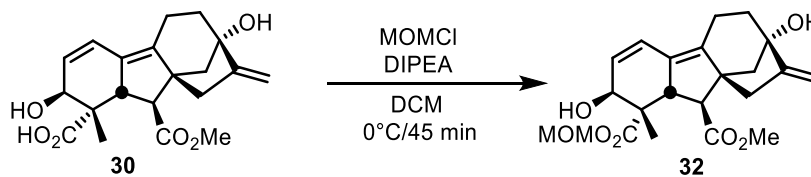


K roztoku monomethyl dikarboxylové kyseliny **30** (2,2 g; 6.1 mmol) v DMF (61 mL, 0.1M vůči **30**) byl přidán K₂CO₃ (1,67g; 12,2 mmol) a po 5 minutách pomalu po kapkách přikapáván BnBr

(6.54 mL, 9.1 mmol). Po zreagování veškeré výchozí látky (24 hod) byla reakční směs zředěna destilovanou vodou (60 mL) a vzniklé vrstvy byly separovány a vodná byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 150 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty destilovanou vodou (1 x 90 mL), solankou (25 mL), sušeny nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; hexan/EtOAc = 6:1→3:1→2:1) a poskytl produkt **31** (1,7 g; 62 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 124 – 124,5 °C; $\alpha_D^{22} = -24,8^\circ$ (*c* 1,9; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 7.37 – 7.22 (m, 5H), 6.33 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.96 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H), 5.13 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.36 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.73 – 3.67 (m, 1H), 3.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 8.6, 4.4 Hz, 1H), 2.52 (dt, *J* = 16.0, 4.0 Hz, 1H), 2.27 – 2.13 (m, 2H), 2.08 – 1.96 (m, 2H), 1.66 (dd, *J* = 10.8, 4.5 Hz, 2H), 1.50 (dd, *J* = 10.4, 2.1 Hz, 1H), 1.25 (d, *J* = 12.4 Hz, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ (ppm): 175.04, 174.29, 154.24, 139.86, 135.86, 128.53, 128.28, 128.11, 127.99, 127.01, 126.69, 124.53, 106.23, 79.01, 69.75, 66.14, 56.05, 51.89, 51.77, 49.58, 49.21, 47.74, 38.96, 20.63, 19.87; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 473 [M+Na]⁺, 489 [M+K]⁺; R.t. = 20.59 min.

*1-(methoxymethyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[*a*]azulen-1,10-dikarboxylát (32)*

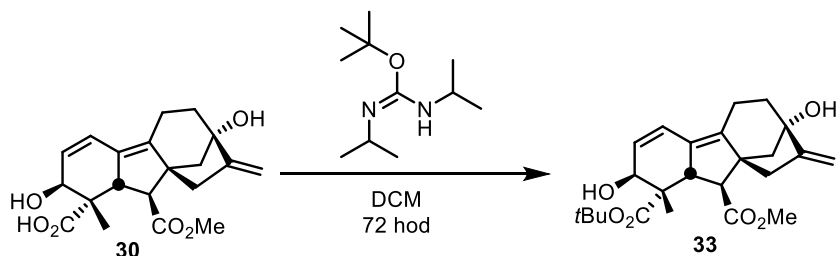


K roztoku **30** (500 mg; 1,40 mmol) v CH₂Cl₂ (15 mL; 0,1M vůči **30**) byl přidán DIPEA (0,5 mL; 2,8 mmol) a reakční směs byla ochlazena na teplotu 0 °C. Následně byl pomalu přikapáváno MOMCl (0,5 mL, 3,5M roztok v toluenu) a výsledná reakční směs byla míchána po dobu 45 minut. Po zreagování veškeré výchozí látky byla směs zředěna pomocí NH₄Cl (20 mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 50 mL), promyta nasyceným roztokem NaCl (200 mL), sušena nad bezvodým MgSO₄, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; hexan/EtOAc = 2:1→3:2→1:2) a poskytl produkt **32** (147,1 mg; 26 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 136-137,9 °C; $\alpha_D^{24} = -83,5^\circ$ (*c* 1,49; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.37 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.97 (dd, *J* = 9.6, 5.6 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.16 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 8.5, 4.4 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.60 (dd, *J* = 16.4, 6.3 Hz, 1H), 2.25 (tdt, *J* = 19.2, 17.2, 2.8 Hz, 3H), 2.07 (tdd, *J* = 14.9, 7.4, 3.9 Hz, 2H), 1.86 – 1.78 (m, 2H), 1.75 – 1.67 (m, 1H), 1.27 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 13C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 175.10, 173.96, 154.34, 140.32, 128.48, 126.72, 124.85, 106.41,

90.30, 79.22, 69.78, 57.70, 56.26, 52.15, 52.01, 49.80, 49.24, 47.80, 39.26, 39.18, 20.86, 19.88; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 427 [M+Na]⁺, 443 [M+K]⁺; R.t. = 15.76 min.

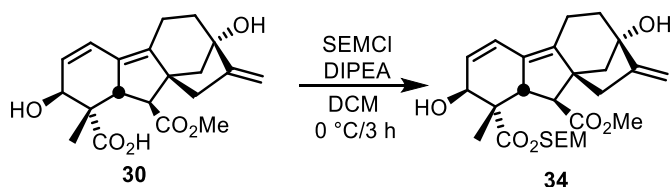
1-(tert-butyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-oktahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dikarboxylát (33)



K roztoku látky **30** (5 g; 13,9 mmol) v CH₂Cl₂ (100 mL) byl za laboratorní teploty po kapkách přidán *tert*-butyl *N,N'*-diisopropyl karbamimidát (5,56 g; 27,8 mmol). Po 72 h byla směs zfiltrována a filtrát byl promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (50 mL), solankou (50 mL), sušen nad NaSO₄, zfiltrován a zahuštěn na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; P.E./EtOAc = 8:1→6:1→4:1) a poskytl produkt **33** (613 mg; 11 %) ve formě žluté krystalické látky.

B.t. 190,2-190,5 °C; $\alpha_D^{24} = -2,2^\circ$ (*c* 1,29; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.36 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.01 (dd, *J* = 9.6, 5.5 Hz, 1H), 5.17 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.99 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 4.25 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 8.7, 4.5 Hz, 1H), 2.63 (dd, *J* = 16.4, 6.3 Hz, 1H), 2.34 – 2.21 (m, 2H), 2.19 (dd, *J* = 10.4, 2.8 Hz, 1H), 2.16 – 2.06 (m, 1H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.75 (ddd, *J* = 10.6, 4.9, 2.3 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.22 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 174.94, 173.38, 154.42, 139.54, 129.05, 126.97, 124.26, 106.32, 80.91, 79.26, 69.96, 56.03, 52.13, 51.86, 49.65, 49.07, 48.02, 39.19, 29.80, 28.14, 20.73, 19.82.; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 437 [M+Na]⁺, 455 [M+K]⁺; R.t. = 19.53 min.

10-methyl 1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl) (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-oktahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (34)



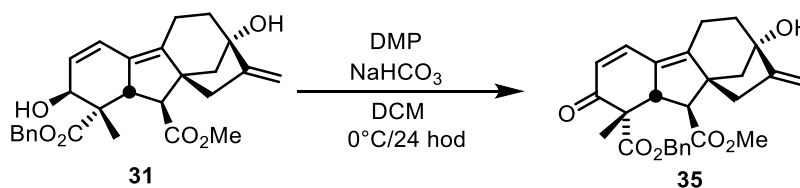
K roztoku **30** (50 mg, 0,14 mmol) v DCE (2 mL; 0,1M vůči **30**) byla přidána DIPEA (37,6 μ L; 0,23 mmol) a reakční směs byla ochlazena na teplotu 0 °C. Následně byl pomalu přikapáván SEMCl (37,6 μ L; 0,152 mmol) a výsledná reakční směs byla míchána po dobu 3 hodin. Po zreagování veškeré výchozí látky byla směs rozředěna pomocí nasyceného roztoku NaHCO₃ (2

mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 10 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL), sušeny nad bezvodým MgSO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; hexan/EtOAc = 10:1 → 6:2 → 4:1) a poskytl produkt **34** (13,3 mg; 9 %) ve formě průzračné olejovité látky.

$\alpha_D^{23} = -8,4^\circ$ (*c* 1,39; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.38 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.97 (dd, *J* = 9.6, 5.6 Hz, 1H), 5.17 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.98 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J* = 9.2, 7.6 Hz, 2H), 3.51 (dd, *J* = 8.5, 4.4 Hz, 1H), 2.65 – 2.54 (m, 1H), 2.28 (ddd, *J* = 14.7, 12.8, 2.5 Hz, 2H), 2.21 – 2.03 (m, 3H), 1.90 – 1.78 (m, 3H), 1.77 – 1.68 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 0.96 – 0.89 (m, 3H), 0.01 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 175.00, 173.84, 154.34, 140.38, 128.29, 126.62, 124.93, 106.35, 88.71, 79.22, 69.79, 67.82, 56.19, 52.19, 51.91, 49.59, 49.14, 47.76, 39.19, 39.10, 20.81, 19.82, 18.07; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 513 [M+Na]⁺, 529 [M+K]⁺; R.t. = 26.31 min.

4.3.2.4 Selektivní oxidace C3 alkoholu

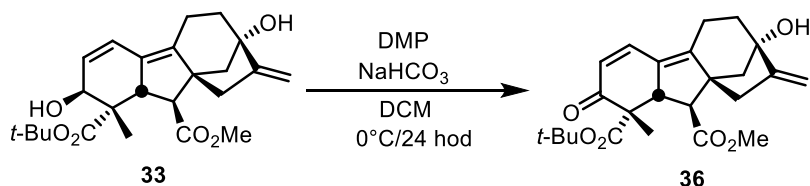
1-benzyl 10-methyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylen-2-oxo-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (35)



Krystalická látka **31** (1,7 g; 3,78 mmol) byla při 0 °C rozpuštěna v CH₂Cl₂ (19 mL; 0,2M vůči **31**) a Dess-Martin Periodiate (DMP) (1,9 g; 4,54 mmol) byl pomalu přidán v několika porcích. Po 5 minutách byl přidán NaHCO₃ (1,27 g; 15,12 mmol) a výsledná reakční směs byla monitorována pomocí TLC. Po zreagování veškeré výchozí látky (0 °C/4,5 hod) byla směs zfiltrována přes Celit[®]. Filtrační koláč byl promyt pomocí Et₂O (3 x 30 mL) a spojené organické vrstvy byly zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; Et₂O/hexan = 1:2 → 1:1 → 2:1) a poskytl produkt **35** (1,4 g, 83 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 125-125,9 °C; $\alpha_D^{22} = -92,9^\circ$ (*c* 1,69, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 7.30 – 7.23 (m, 3H), 7.18 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.98 (dd, *J* = 9.8, 0.9 Hz, 1H), 5.12 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.64 – 3.60 (m, 1H), 3.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.52 (dd, *J* = 16.5, 6.0 Hz, 1H), 2.19 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 2.07 (ddd, *J* = 10.5, 6.3, 3.5 Hz, 2H), 1.70 – 1.57 (m, 2H), 1.36 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.20 – 1.14 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 196.26, 173.84, 170.68, 153.58, 147.25, 137.89, 135.67, 128.71, 128.56, 128.24, 127.16, 126.06, 106.91, 78.88, 67.01, 57.12, 53.98, 52.24, 52.00, 49.53, 39.18, 38.93, 21.24, 18.64; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 471 [M+Na]⁺, 487 [M+K]⁺; R.t. = 22.79 min.

1-benzyl 10-methyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylen-2-oxo-2,5,6,7,8,9,10,10a-oktahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (36)

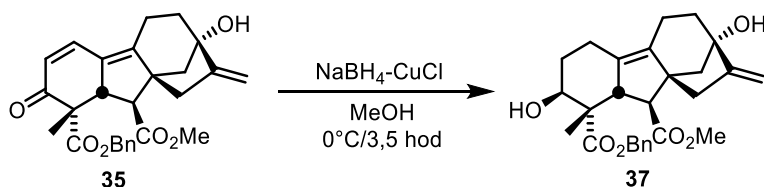


Diester **33** (100 mg; 0,25 mmol) byla při 0 °C rozpuštěna v CH₂Cl₂ (2 mL; 0,2M vůči **33**) a DMP (127 mg; 0,3 mmol) bylo pomalu přidáno v několika porcích. Po 2 hodinách bylo přidáno dalších 127 mg DMP (0,3 mmol). Výsledná reakční směs byla monitorována pomocí TLC a po zreagování veškeré výchozí látky (0 °C/3 hod) byla rozředěna pomocí CH₂Cl₂ (20 mL) a zfiltrována přes Celit[®]. Filtrační koláč byl promyt pomocí Et₂O (3 x 30 mL) a filtrát byl zahuštěn na RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; Et₂O/hexan = 4:1) a poskytl produkt **36** (50 mg, 50 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 144,6-145,0 °C; $\alpha_D^{21} = +47,9^\circ$ (*c* 1,1; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 7.20 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 6.02 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.20 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.64 (dd, *J* = 8.6, 4.1 Hz, 1H), 3.42 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 16.5, 5.8 Hz, 1H), 2.29 (p, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.26 (s, 1H), 2.23 – 2.14 (m, 1H), 1.90 – 1.79 (m, 2H), 1.76 (dd, *J* = 10.6, 2.0 Hz, 1H), 1.58 – 1.47 (m, 1H), 1.35 (s, 9H), 1.26 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 197.20, 173.90, 169.96, 153.55, 146.45, 137.35, 127.48, 126.43, 106.98, 82.42, 78.97, 57.57, 57.07, 54.03, 53.62, 52.21, 52.10, 49.41, 39.34, 39.19, 28.07, 21.27, 18.48.; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 419 [M+H]⁺, 441 [M+Na]⁺; R.t. = 20.42 min.

4.3.2.5 Redukce C3 ketonové skupiny a nasycené vazby A kruhu

1-benzyl 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,3,4,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (37)

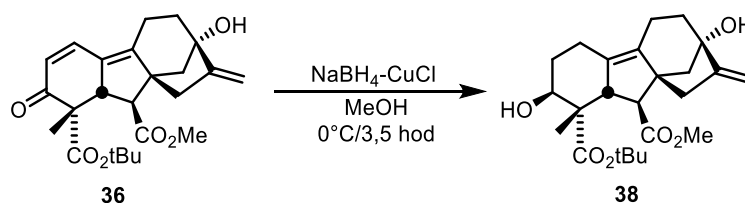


Do roztoku látky **35** (339 mg; 0,75 mmol) v methanolu (20 mL) byl přidán CuCl (385 mg; 3,8 mmol) a reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby byl přidán NaBH₄ (285,6 mg; 7,55 mmol) a výsledná reakční směs byla míchána 15 minut při 0° a posléze ohřata na laboratorní teplotu, při které reakce probíhala dalších 30 minut. Posléze byla směs zfiltrována (Celite[®]) a k filtrátu byl přidán 20% vodný roztok NaH₂PO₄ (40 mL). Celá směs byla následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 50 mL), a spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2 x 50 mL), sušeny nad bezvodým MgSO₄, zfiltrovány a zahuštěny na

RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; Et₂O/hexan = 1:2→1:1→2:1) a poskytl produkt **37** (202 mg; 59 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 121-121,9 °C; $\alpha_D^{22} = -81,9^\circ$ (*c* 1,91; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 7.40 – 7.32 (m, 5H), 5.23 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.14 – 5.06 (m, 1H), 4.93 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.57 – 3.51 (m, 1H), 3.03 (s, 2H), 2.49 – 2.41 (m, 1H), 2.37 (dd, *J* = 16.0, 5.7 Hz, 1H), 2.26 – 2.10 (m, 4H), 2.03 – 1.85 (m, 4H), 1.69 – 1.52 (m, 4H), 1.47 (dd, *J* = 10.2, 2.5 Hz, 1H), 1.31 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 175.09, 173.74, 154.48, 135.71, 134.71, 128.68, 128.37, 128.15, 127.93, 105.60, 79.18, 66.52, 58.23, 56.57, 55.62, 53.29, 52.24, 51.85, 50.68, 39.44, 39.04, 30.29, 22.72, 20.54, 18.38; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 453 [M+H]⁺, 475 [M+Na]⁺, 491 [M+K]⁺; R.t. = 20.09 min

*1-(tert-butyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,3,4,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-1H-7,9a-methanobenzo[*a*]azulen-1,10-dikarboxylát (38)*

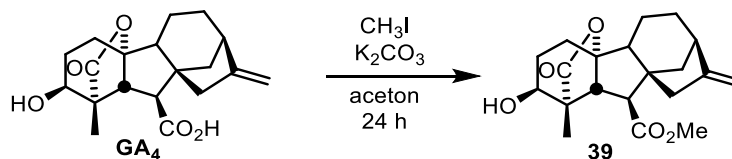


Do roztoku látky **36** (50 mg; 0,12 mmol) v MeOH (5 mL) byl přidán CuCl (61 mg; 0,62 mmol) a reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 3 hodin. Po uplynutí této doby byl přidán NaBH₄ (47 mg; 1,2 mmol) a výsledná reakční směs byla míchána 15 minut při 0 °C a posléze samovolně ponechána ohřát na laboratorní teplotu, při které reakce probíhala dalších 30 minut. Posléze byla směs zfiltrována, filtrační koláč promyt pomocí MeOH (2 x 20 mL), a k filtrátu byl přidán 20% roztok NaH₂PO₄ (40 mL). Celá směs byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 50 mL), a vzniklé organické vrstvy byly spojeny, promyty nasyceným roztokem NaCl (2 x 50 mL), sušeny nad bezvodým MgSO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; Et₂O/hexan = 1:2 →1:1) a poskytl produkt **38** (25 mg; 50 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 187,7–189,1 °C; $\alpha_D^{24} = -4,1^\circ$ (*c* 1,32; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 5.12 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.94 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.61 – 3.41 (m, 1H), 3.12 (dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H), 2.99 (dd, *J* = 7.4, 4.3 Hz, 1H), 2.55 – 2.34 (m, 2H), 2.28 – 2.12 (m, 3H), 2.05 (dd, *J* = 10.1, 2.8 Hz, 1H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.76 (ddd, *J* = 17.5, 11.9, 5.9 Hz, 1H), 1.72 – 1.65 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.22 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 175.17, 172.61, 154.76, 134.13, 130.04, 128.29, 105.66, 81.82, 79.52, 56.55, 55.70, 52.89, 52.37, 51.85, 50.45, 39.65, 39.22, 30.38, 29.33, 28.43, 22.79, 22.10, 20.58; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 441 [M+H]⁺, 457 [M+Na]⁺, 491 [M+K]⁺; R.t. = 21.22 min.

4.3.2.6 Syntéza vycházející z GA₄

Methyl (1*S*,2*S*,4*aR*,7*S*,9*aS*,10*S*,10*aR*)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxododekahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-10-karboxylát (**39**)



K roztoku **GA**₃ (10 g; 30,2 mmol) v acetonu (150 mL; 0,2M vůči **GA**₄) byl přidán bezvodný K₂CO₃ (6,24 g; 45,18 mmol). Po 5 minutách byl po kapkách přidán methyl jodid (2,24 mL; 36,14 mmol) a výsledná reakční směs byla míchána po dobu 24 hodin. Po zreagování veškeré výchozí látky byla směs zředěna destilovanou vodou (250 mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3 x 250 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (250 mL), sušeny nad bezvodným Na₂SO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, P.E.: EtOAc = 2 : 1 → 1 : 1) a poskytl produkt **50** (5,96 g; 57 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t.=170,5 °C – 172,1 °C; ; $\alpha_D^{24} = -14,1^\circ$ (*c* 1,01; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 4.97 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.18 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.69 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.65 – 2.60 (m, 1H), 2.12 – 2.03 (m, 2H), 2.02 – 1.96 (m, 1H), 1.91 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.88 – 1.69 (m, 6H), 1.69 – 1.62 (m, 2H), 1.52 (dddd, *J* = 13.9, 7.7, 6.2, 1.5 Hz, 1H), 1.37 (dddd, *J* = 13.5, 10.9, 7.6, 1.3 Hz, 1H), 1.13 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 178.39, 173.31, 156.99, 107.54, 94.22, 70.32, 54.54, 53.72, 52.07, 51.57, 51.49, 51.14, 44.63, 38.91, 36.83, 31.52, 28.14, 27.46, 16.19, 14.75.; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 347 [M+H]⁺, 385 [M+K]⁺; R.t. = 22.94 min.

4.4 Biologické testování připravených látek

4.4.1 *In vitro* testování na buněčných liniích

Z Petriho misek, v nichž byly buňky kultivovány, bylo odsáto kultivační médium, a buňky byly promyty pomocí 3 mL PBS a posléze byl přidán 1 mL roztoku trypsinu (0,5 g/L) a EDTA. Po uvolnění buněk ze dna misky byly přidány 4 mL DMEM média. Buňky byly následně přeneseny do zkumavky a při pokojové teplotě zcentrifugovány při 1200 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl odsát a pelet obsahující buňky byl rozsuspendován v 5 mL čistého DMEM média. Následně byly buňky s médiem přeneseny do jamek mikrotitrační destičky v objemu 80 μ L a koncentraci ~5000 buněk na jednu jamku. Buňky byly v destičkách zkontrolovány pod světelným mikroskopem a destičky byly do druhého dne ponechány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂ atmosféře.

Následujícího dne byla připravena sestupná koncentrační řada šesti koncentrací, přičemž nejvyšší koncentrace činila 50 mM. Buňky v mikrotitrační destičce byly ošetřeny vytvořenou koncentrační řadou testovaných látek o objemu 20 μ L. Látky byly testovány vždy v triplicátu po dobu 72 hodin. Pro zjištění cytotoxicity byl použit MTT test. Po uplynutí doby bylo do jamek přidáno 10 μ L roztok resazurinu (4 mg v 16 mL 10% DMEM). Desky byly umístěny do inkubátoru a po 3 hodinách inkubace byla změřena fluorescence při excitaci 544 nm a emisi 590 nm na přístroji Tecan a hodnoty IC₅₀ byly vyhodnoceny v programu Prism 8 (GraphPad Software, Kalifornie, USA). Při testu dochází v živých buňkách k redukci modrého resazurinu na růžový fluorescenční produkt resorufin, který po ozáření světlem určité vlnové délky emituje záření.

4.4.2 Anthelmintická aktivita

4.4.2.1 Věková synchronizace červů

Populace obsahující velké množství s těhotných dospělých jedinců byla pomocí M9 média (2 mL) smyta z misek a přenesena do mikrozkuavek, které byly stočeny po dobu 10 sekund. Následně byl ze zkumavky odebrán veškerý supernatant a pelet obsahující červy byl dodatečně analogicky dvakrát promyt pomocí M9 média a k peletu byl přidán 1 mL čerstvě připraveného roztoku určen pro věkovou synchronizaci *C. elegans* (na 10 ml: 8 mL H₂O; 1,5 mL 14% vodného roztoku NaClO; 0,5 mL 10M NaOH) a zkumavky byly umístěny do thermoshakeru (*Bioer Mixing Block MB-102*) nastaveného na pokojovou teplotu a otáčky 1500 rpm. Během třepání dochází k rozpuštění všech vývojových stádií *C. elegans* vyjma vajíček, která obsahují chitin a jsou proto schopna po určitou dobu přežít v přítomnosti roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans*. K viditelnému rozpuštění červů došlo asi po 10 minutách (vizuální kontrola), zkumavky byly vyjmuty z termoshakeru a krátce zcentrifugovány na mikrocentrifuze. Následně byl odebrán roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans* a pelet obsahující vajíček byl třikrát promyty M9 médiem a jednou S-complete médiem. Následovalo opětovné stočení na mikrocentrifuze a pelet s vajíčkama byl odebrán a přenesen do 5

mL S-complete média v 15ml centrifugační zkumavce a umístěny přes noc na třepačku (150 rpm) v inkubátoru při 20 °C.

4.4.2.2 Hodnocení anthelmintické aktivity

Krátkodobá toxicita vybraných připravených látek a jejich účinek na diverzitu červů byly testovány pomocí chitinázového testu i vizuálního hodnocením červů pod mikroskopem. Čerstvě vylíhnuté L1 larvy *C. elegans* byly spočítány a byly zředěny na požadovanou koncentraci 200-300 červů na 1 mL média. Pro screening (testování ve dvou koncentracích) bylo zapotřebí 10 mL suspenze na 1 testovací misku s 3 mg/mL bakterií. Roztok s larvami (9,5 mL) v S-complete médiu společně se ZR bakteriemi v S-complete médiu (0,5 mL) byl přenesen do jamek mikrotitrační destičky o koncentraci 15-30 červů na jamku. Látky byly testovány v triplicátu ve dvou koncentracích: 50 $\mu\text{mol/L}$ a 5 $\mu\text{mol/L}$. Jako pozitivní kontrola byl použit ivermectin (látko používaná jako vysoce účinné anthelmintikum) o koncentracích 1 $\mu\text{mol/L}$ a 0,1 $\mu\text{mol/L}$. Jako negativní kontrola bylo využito 0,1% a 0,01% DMSO. Deska byla přelepena folií a ponechána inkubovat na třepačce (150 rpm) při 20 °C po dobu 4 dní, v průběhu kterých červi dosáhnou dospělosti a začnou se množit. Po uplynutí doby inkubace byli červi v jednotlivých jamkách vizuálně evaluováni pod světelným mikroskopem (Leica DM IL LED) (mrtví, zastavení vývoje, zpomalení vývoje, méně potomstva, zdravá populace) a následně byl proveden samotný chitinázový test pro stanovení aktivity chitinázy. Podstatou chitinázového testu je fakt, že pouze vajíčka obsahují chitin, a proto embrya produkují chitinázu. Ta se uvolňuje do média a přidáním substrátu je možné kvantifikovat reprodukční kapacitu červů, která napoví o toxicitě testované látky. Dospělý červ chitin neobsahuje. Do jednotlivých jamek bylo přidáno 1,5 μL 0,8 $\mu\text{mol/L}$ roztoku 4-methylumbelliferyl β -D-N, N', N''- triacetylchitotriosid, který představoval substrát pro chitinázu a desky byly 1 hodinu inkubovány při 38 °C. Reakce byla poté zastavena přidáním 30 μL pufru na chitinázový test (na 1000 mL: 1000 mL H₂O; 40g NaOH; 75g glycin; pH 10,6) a následně byla změřena fluorescence při excitaci 360 nm a emisi 460 nm na přístroji Tecan (Tecan Infinite 200 PRO, Švýcarsko).

4.4.3 Kompetitivní inhibice GA3ox2

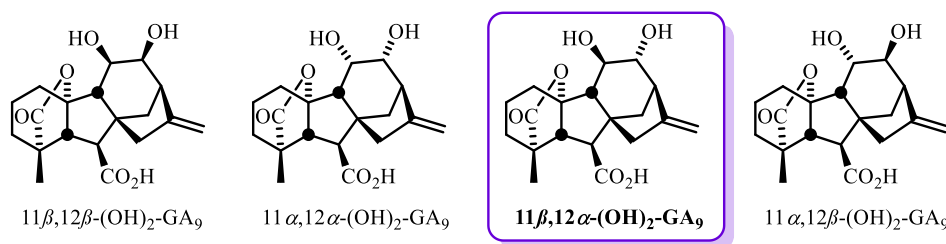
Enzymatická esej byla provedena Mgr. Pavlem Jaworkem, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR), LC/MS analýza byla provedena Mgr. Danuší Tarkowskou, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR).

Při 0° C byl enzym GA3ox2 (2,5 μL) zředěn pomocí 45 μL 100 mM Tris-HCl pufru obsahující 4 mM DTT (pH 7,2 při 30 ° C) a přidán k 2,5 μL substrátu v MeOH (GA₉; finální koncentrace ~1.3 μM) a směsi kofaktorů (88 mM 2-oxoglutarát; 88 mM kyselina askorbová, 110 mM FeSO₄, 2 mg/mL BSA, 0.1 mg/ml kataláza). Následně bylo přidáno 2,5 μL testované látky rozpuštěné v DMSO (100 μM) a vzniklá směs se inkubovala 30 min při 30 °C za slabého třepání/míchání. Po uplynutí doby byla reakce zastavena směsí 5 μL ledové kyseliny octové, 50 μL MeOH a 40 μL vody. Následovala centrifugace při 3 000 ot./min po dobu 5 minut, při které došlo k odstranění vysrážených proteinů a mikroskopických částic zoxidovaného železa. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek s 10 μM

endo-dihydro-GA₅, negativní kontrolu představovalo čisté DMSO. 25 µL reakční směsi a 75 µL 10 mM kyseliny mravenčí bylo přeneseno do HPLC vialek a byla provedena LC-MS analýza. Aktivní enzym GA3ox katalyzuje přeměnu GA₉ na bioaktivní GA₄, při jeho inhibici tato přeměna neprobíhá. Vyhodnocení experimentu probíhá na základě porovnání ploch substrátu (GA₉) a produktu (GA₄) a porovnání s kontrolami.

5 Výsledky a diskuse

Dlouhodobým cílem projektu, v rámci kterého jsem pracovala na své diplomové práci, je dosažení struktury potencionálně nového endogenního giberelinu. Předpokládáme, že jeho struktura je založena na giberelinu A₉ a současným cílem jsou níže zobrazené deriváty 11,12-dihydroxy-GA₉ (Obr. 14), jež nebyly dosud nikým připraveny. Z hlediska stability molekuly a dostupných znalostí o biotransformacích těchto fytohormonů v rostlinách se jeví jako nejpravděpodobnějším kandidátem izomer zvýrazněn **rámečkem**.



Obr. 14 - Navržené struktury potencionálního endogenního giberelinu A₁₃₇ na základě získaných LC-MS/MS spekter. Nejpravděpodobnější kandidát, 11β,12α-(OH)₂-GA₉, je zvýrazněn rámečkem.

Domníváme se, že nejrelevantnější přístup k cílové struktuře je založen na komerčně dostupné kyselině giberelové (GA₃), která je velmi často využívána jako výchozí látka pro totální syntézu či semisyntézu méně dostupných giberelinů mnoha výzkumnými skupinami.⁹⁴

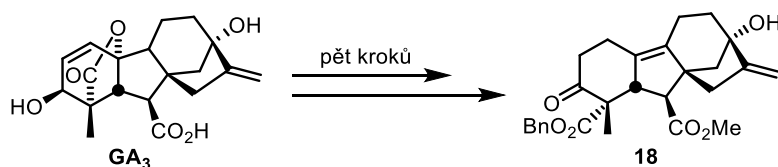


Schéma 4 – Struktura klíčového intermediátu **18** připraveného v rámci bakalářské práce

Syntéza vycházející z tohoto giberelinu byla započata již v rámci mé bakalářské práce,⁹¹ během které byl přes pět kroků připraven intermediát **18**. V předložené práci jsem tedy na tuto syntézu navázala a zároveň jsem využila jako výchozí molekuly i giberelin A₄ a A₇. Jedná se taktéž o komerčně dostupné látky, avšak na rozdíl od výše zmíněné kyselině giberelové se jejich struktura liší především absencí hydroxy skupiny na pozici C13. Právě tato chybějící funkční skupina byla motivací pro započítí *de novo* syntézy z giberelinů A₄ a A₇. Využitím tohoto substrátu by se nám totiž následná totální syntéza zkrátila o dva kroky, které jsou nezbytné k odstranění C13 hydroxylové skupiny. Předpokládali jsem rovněž, že intermediáty vycházející z GA₄ a GA₇ budou mít velmi podobnou reaktivitu, jako deriváty GA₃, a tak by mohl být pro první kroky syntézy využit již optimalizovaný protokol.

V následujících dvou kapitolách je shrnuta veškerá provedená laboratorní práce. Kapitola 5.1 obsahuje výsledky a diskusi jak úspěšných experimentů organické syntézy, tak i těch, které ke zdárnému konci nevedly. Kapitola 5.2 se zabývá výsledky a diskusí biologického testování

vybraných syntetizovaných intermediátů. V obou kapitolách jsou sloučeniny číslovány vzestupně dle pořadí jejich přípravy v návaznosti na teoretickou část.

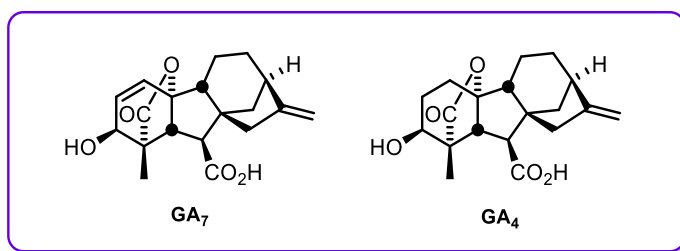
5.1 Organická syntéza

Kapitola organické syntézy je rozdělena do tří podkapitol, jež každá popisuje syntetickou dráhu založenou na odlišné výchozí struktuře – giberelinu A₇ (podkapitola 5.1.1), A₃ (podkapitola 5.1.2) a A₄ (podkapitola 5.1.3). Úspěšné syntetické postupy jsou uvedeny v kapitole 4.3, kde jsou již zaznamenány pouze jednotlivé optimalizované kroky z pohledu výtěžků a čistoty produktů.

5.1.1 Syntéza vycházející z giberelinu A₇

5.1.1.1 Izolace GA₇ ze směsi GA₄/GA₇

Syntéza cílové struktury byla započata izolací čistého giberelinu A₇. Tato látka je produkována houbou *Gibberella fujikuroi* ve formě směsi,⁹⁴ ve které se vyskytuje společně s giberelinem A₄. Než tedy byla zahájena syntéza vycházející z tohoto giberelinu, bylo třeba jednotlivé složky směsi od sebe oddělit. Obě látky jsou si chemicky velice podobné, GA₇ obsahuje oproti GA₄ pouze $\Delta^{1,2}$ olefin v A kruhu (Obr. 15). Dle předpokladů, kvůli jejich velmi podobné polaritě a hodnotě retenčního faktoru (rozdíl R_f = 0,05) nebylo možné směs rozdělit využitím pouhé kolonové sloupcové chromatografie.



Obr. 15 - Struktury giberelinu A₇ a A₄

Námi navržený postup pro dělení směsi GA₄/GA₇ byl založen na skutečnosti, že pouze u GA₇, jež disponuje $\Delta^{1,2}$ olefinem v A kruhu, lze otevřít laktonový kruh pomocí hydrazinu. Uvolněná karboxylová kyselina by přispěla ke značné změně polaritě dané molekuly oproti GA₄, díky čemuž by bylo možné jednotlivé molekuly od sebe chromatograficky oddělit.

Před samotnou eliminací laktonu bylo však třeba nejdříve ochránit C7 karboxylovou skupinu v GA₇ ve formě esteru, jelikož pro další syntézu je vznik dikarboxylové kyseliny nežádoucí – je vyžadováno selektivní orthogonální ochránění jednotlivých karboxylových funkcí a toho by následně bylo obtížné dosáhnout. Jako chránicí skupina byl využit methyl ester, kdy navázání methylové skupiny na C7 karboxylu u GA₇ i GA₄ ve směsi GA₄/GA₇ proběhlo mechanismem nukleofilní substituční reakce mezi karboxylovou skupinou obou giberelinů a methyl jodidem v přítomnosti K₂CO₃ jako báze. Reakce probíhala 72 hodin za laboratorní teploty a byl získán produkt v 80% výtěžku, který představoval směs methylesteru giberelinu A₄ (**50**, MeGA₄) a methylesteru giberelinu

A₇ (**24**, MeGA₇). V následujícím kroku (Schéma 5) byla získaná směs podrobena hydrazinolýze. Zde měla proběhnout selektivní eliminace/odstoupení karboxylátu (laktonový kruh) v případě derivátu **24**. Látka **50** měla být za daných podmínek inaktivní a reakce se nezúčastnit (nízká fugacita z důvodu absence přilehlé dvojné vazby). Bylo vyzkoušeno mnoho rozdílných reakčních podmínek a i zdrojů hydrazinu, bohužel však jedinou pozorovanou reakcí byla demethylace C7 karboxylu v GA₇. V žádném případě se nám nepovedlo alespoň detekovat molekulu **25** v reakční směsi.

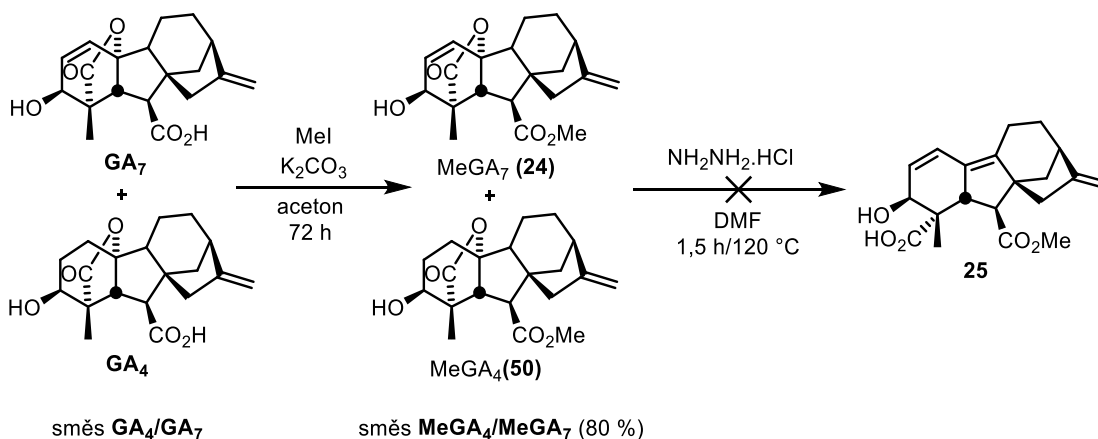


Schéma 5 – Plánování postupu izolace **GA₇** ze směsi **GA₄/GA₇**

Museli jsme tedy směs **GA_{4/7}** rozdělit jiným způsobem. Využili jsme publikovaný protokol,⁹⁵ jenž je založen na selektivní silylaci C3 hydroxy skupiny v **GA₇** (allylický alkohol je silylován přednostně vůči sekundárnímu neallylickému v **GA₄**). Za daných reakčních podmínek tak je transformována pouze **GA₇** (vznik silyletheru **23**), kdežto **GA₄** za těchto podmínek nereaguje (Schéma 6).

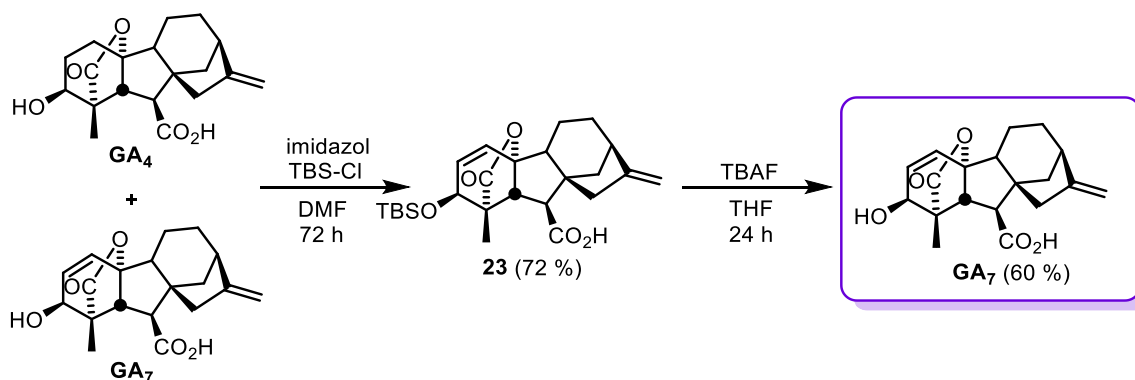


Schéma 6 – Selektivní silylace **GA₇** ze směsi **GA₄/GA₇** s následnou desilylací **GA₇**-silyl etheru (**23**)

Na základě těchto předpokladů byla směs **GA₄/GA₇** za laboratorní teploty po dobu 72 hodin podrobena výše zmíněným podmínkám. V průběhu reakce se z reakční směsi začala vylučovat bílá gumovitá sraženina později identifikována jako bis-silylovaný **GA₇**-silyl ether (**23**) (v reakční směsi je látka **23** přítomna ve formě TBS esteru. Ten pak musí být při zpracování hydrolyzován). Po zpracování se mi podařilo získat 3-TBS-**GA₇** **23** v 72% výtěžku (přepočítáno na teoretický 100% výtěžek **GA₇** ze směsi **GA_{4/7}**). Oproti reakčnímu protokolu jsem pozorovala, že bylo potřeba použít

značný nadbytek směsi AcOH/H₂O (až desetinásobek objemu reakční směsi), aby došlo k úplnému vysrážení látky **23** z reakční směsi. Reakční směs musí také být dobře vychlazena (minimálně 30 minut v ledové lázni při teplotě 0 °C před počátkem přidavku). Vedlejší produkt reakce představoval výchozí látku GA₄ (61% výtěžek z teoretického 100% výtěžku GA₄). Připravenou čistou GA₄ jsem pak následně využila v syntéze popsané v podkapitole 5.2.3. Molekula **23** byla v následujícím kroku podroben desilylaci v přítomnosti TBAF v THF po dobu 24 hodin. Výsledkem byl kýžený giberelin A₇ (GA₇), který jsem izolovala v 60% výtěžku. Tato látka pak byla použita jako výchozí látka při následné plánované syntéze.

5.1.1.2 Modifikace giberelinu A₇

Poté, co jsme získali přístup ke giberelinu A₇, následovalo jeho ochránění na C7 karboxyly. Na základě předchozích poznatků⁹¹ byla jako nejvhodnější chránicí skupina vybrána methylová skupina (karboxylová skupina chráněna ve formě methyl esteru). Reakce probíhala dle publikovaného protokolu,¹⁰¹ kdy navázání methylové skupiny na C7 karboxyly GA₇ proběhlo za laboratorní teploty mechanismem nukleofilní substituční reakce s methyl jodidem v přítomnosti K₂CO₃. Bylo zpozorováno, že prodloužení reakční doby (testováno 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 91 h) přímo úměrně vede ke zvýšení konverze výchozí látky. Po 72 hodinách bylo dosaženo úplné konverze GA₇ a zároveň nejlepšího izolovaného výtěžku methyl esteru giberelinu A₇ (**24**), jež činil 65% (bílá krystalická látka) (Schéma 7). Delší reakční čas nevedl k navýšení izolovaného výtěžku.

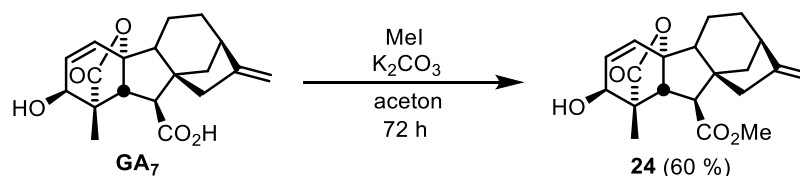
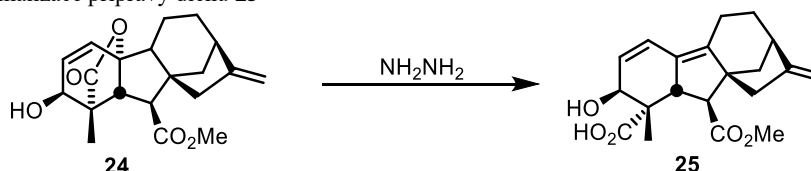


Schéma 7 – Příprava methyl esteru giberelinu A₇ (**24**)

V následujícím kroku bylo přistoupeno k přípravě molekuly **25**. Z literatury je známo,⁹⁷ že u MeGA₃ (methyl ester GA₃) probíhá otevření laktonového kruhu spojené s tvorbou nenasyčené vazby v B-kruhu v přítomnosti hydrazinu v roztoku DMF (Tabulka 3, podmínky shodné s těmi v řádku 1). Obdobně jsem tedy využila podobných reakčních podmínek a reagentů pro testovanou reakci na látce **24**. K reakci byly využity dva typy hydrazinových reagentů (NH₂NH₂•HCl a NH₂NH₂•H₂O) a reakce byla optimalizována především s ohledem délku reakční doby a teplotu. Ze zkušeností s otevřením MeGA₃ víme, že dlouhé reakční časy a vysoké teploty vedou k degradaci jak výchozí látky, tak zejména produktu. Obdobně, jiná rozpouštědla nebyla testována kvůli jejich nekompatibilitě s výchozí látkou (např. DMSO – degradace) resp. nemožnosti rozpustit v nich látku **24**. Z mnou provedených experimentů vyplynulo, že u testovaných reakcí nemá prodloužení reakční doby vliv na výtěžek reakce (nedochází k degradaci produktu, pouze výchozí látka ubývá, takže předpokládáme, že degraduje) (řádky 1 a 4–6). Stejný nežádoucí dopad mělo taktéž i zvýšení reakční teploty (řádky 1 a 3). Reakce ve vodném roztoku (řádek 7) a v přítomnosti NH₂NH₂•H₂O (řádky 8

a 9) daly produkt ve velmi nízké výtěžku $\leq 10\%$. Předpokládáme, že za daných podmínek produkt pravděpodobně nevzniká, resp. vzniká pouze ve velice malém množství. S velkou pravděpodobností je degradace výchozí látky **24** mnohem rychlejší než jeho konverze na cílený produkt. Jako nejideálnější tedy byly vyhodnoceny podmínky, při nichž reakce probíhala po dobu 1 hodiny při $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ v přítomnosti 12 ekvivalentů $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ v roztoku DMF (řádek 2). Produkt **25** byl získán v 19% výtěžku a výchozí látka **24** byla reizolována v 82 % výtěžku.

Tabulka 3 - Optimalizace přípravy dienu **25**

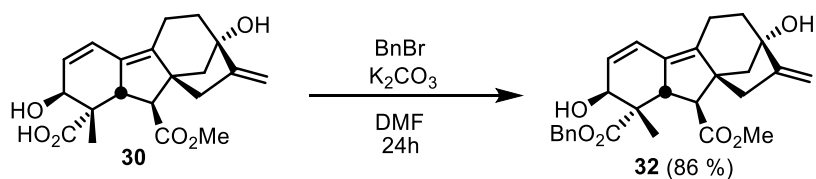


| | Reakční podmínky | Produkt 25 (%) ^a | Re-izolovaná výchozí látka 24 (%) ^a |
|----------|--|------------------------------------|---|
| 1 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); DMF; $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 hod), přidáno $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (80 min) | 9 | 34 |
| 2 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); DMF; $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 hod) | 19 | 82 |
| 3 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); DMF; $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 hod) | 5 | 20 |
| 4 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); DMF $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 hod) | 16 | 56 |
| 5 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); DMF; $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3,5 hod) | 15 | 43 |
| 6 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (24 ekviv.), DMF, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 hod) | 17 | 64 |
| 7 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (12 ekviv.); H_2O ; $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 hod) | 8 | 55 |
| 8 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (12 ekviv.); $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 hod) | 10 | 18 |
| 9 | $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (12 ekviv.); $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 hod) | 9 | 12 |

^a Odpovídá čisté (>95%) izolované látce.

Po získání intermediátu **25** bylo přistoupeno k selektivní protekci karboxylové kyseliny na uhlíku C19. Již v rámci předchozí práce⁹¹ byla testována řada chránících skupin pro chránění C19 karboxylu u látky **30**, které by bylo možné selektivně ochránit v přítomnosti methyl esteru na uhlíku C7. Z hlediska výtěžnosti reakce a stability výsledného produktu byla jako nejvýhodnější chránící skupina identifikována benzylová skupina. Ochránění karboxylu C19 tak v daném případě probíhalo za standartních podmínek pomocí benzyl bromidu a poskytlo intermediát **32** v 86% výtěžku⁹¹ (Schéma 8A).

A. Syntéza vycházející z GA₃



B. Syntéza vycházející z GA₇

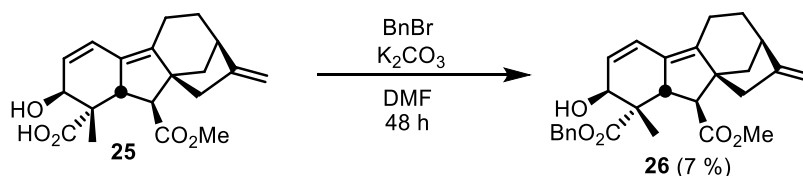


Schéma 8 - Chránění karboxylu C19 molekul **25** a **30**

Domnívali jsme se, že díky absenci hydroxylové skupiny na pozici C13 bude látka **25** oproti **30** disponovat vyšší stabilitou, jež se pozitivně odrazí v úspěšnosti dané reakce. Očekávala jsem tedy vyšší reakční výtěžek. Avšak navzdory předpokladům reakce sice poskytla kýžený produkt **26**, ale pouze v 7% výtěžku. Pozorovala jsem, že reakce po 48 hodinách proběhla s úplnou konverzí výchozí látky **25**, ale výtěžek v žádném případě nerefletoval tuto skutečnost. Tento fakt připisujeme nestabilitě látky **26**. S daným intermediátem tedy nebylo možné přistoupit k dalšímu kroku naplánované syntézy směřující k cílové molekule, a naše pozornost se tak zaměřila na syntézu klíčového intermediátu z jiného typu giberelinu (kapitola 5.1.2 a 5.1.3). V průběhu syntézy vycházející z GA₇ však byla připravena řada giberelinových derivátů, jež byly podrobeny biologickému testování (kapitola 5.2).

5.1.2 Syntéza vycházející z giberelinu A₃

Syntéza vycházející z giberelinu A₃ započala chráněním volné karboxylové kyseliny na pozici C7. Na základě předchozích zkušeností byla jako první chránící skupina zvolena methyl esterová skupina (vysoká stabilita, ortogonální odchránění). Stejně jako v případě syntézy popsané v předešlé kapitole 5.1.1 byla methylace provedena pomocí methyl jodidu v acetonu v přítomnosti K₂CO₃ při laboratorní teplotě po dobu 72 hodin (Schéma 9). Produktem byl methyl ester giberelinu A₃ **28** ve finálním 86% výtěžku. Taktéž bylo provedeno chránění ve formě MOM-esteru, které probíhalo pomocí MOMCl v přítomnosti DIPEA při 0 °C po dobu dvou hodin (Schéma 9). Chlormethyl methyl ether (MOMCl) byl připraven dle standardního protokolu, kdy methoxymethyl ether byl nechán reagovat s acetylchloridem v toluenu v přítomnosti ZnBr₂. Odpovídající látka **29** byla připravena v 47% výtěžku.

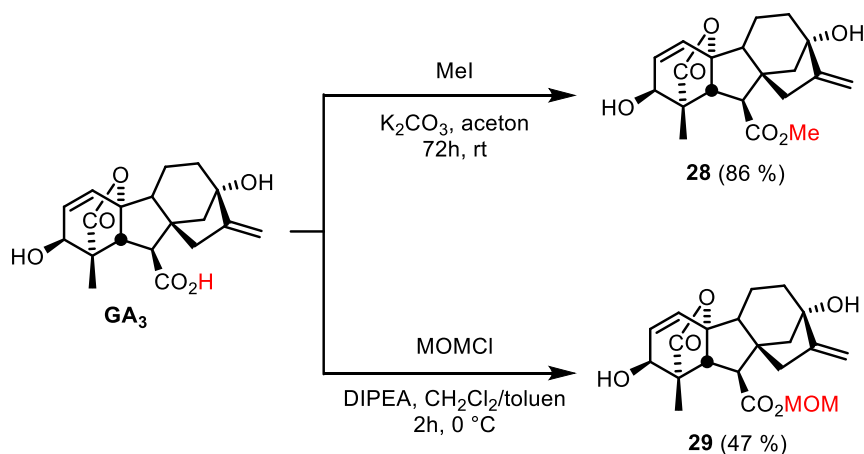


Schéma 9– chránění C7 karboxylu giberelinu A₃

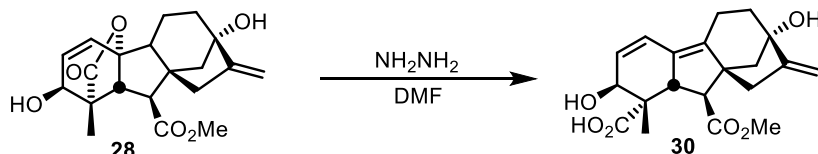
V následujícím kroku byly získané estery **28** a **29** podrobeny otevření laktonového spojení s tvorbou nenasyčené vazby v B-kruhu. Stejně jako případě molekuly **25**, eliminace byla provedena v přítomnosti hydrazinu v DMF.⁹⁷ Bohužel, v případě látky **29** došlo ve všech pokusech k de-MOMaci, která byla doprovázena následnou dekarboxylací na C7 a rozpadem celé molekuly (prostě degradace). Tento fakt připisujeme nestabilitě MOM chránicí skupiny při vysokých teplotách ($\geq 120^\circ\text{C}$). Reakce byla provedena i při nižších teplotách (vyzkoušeno 100°C , 90°C a 80°C), avšak došli jsme k závěru, že teplota rovna minimálně 120°C je pro průběh reakce nezbytná. Pozornost byla tedy věnována optimalizaci otevření laktonu molekuly **28**.

5.1.2.1 Otevření laktonu v **28** za vzniku dienu **30**

Cílem této části bylo optimalizovat přípravu produktu **30**. Na základě předchozích výsledků⁹¹ podložených literaturou⁹⁷ jsme dokázali, že laktonový kruh dané molekuly lze otevřít v přítomnosti $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$. Zpozorovaným kritickým bodem dané reakce je rychlé snížení teploty ze 135°C na 120°C ihned po homogenizaci reakční směsi (Tabulka 4, řádky 1-5). Taktéž se ukázalo, že prodloužení reakční doby nevede ke zvýšení konverze, nýbrž k rozkladu výchozí látky **28**.⁹¹ Abychom tento krok však optimalizovali, rozhodli jsme se prozkoumat vliv jiných typů hydrazinů na reakci. Pro danou reakci bylo testováno 6 typů hydrazinů; $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HBr}$, $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$, $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot 2\text{HCl}$, $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{AcOH}$, NH_2NH_2 v acetonitrilu (1M roztok), a $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Tabulka 4). Bylo pozorováno, že nejlépe probíhá reakce s využitím $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (Tabulka 4, řádek 2). V tomto případě došlo k izolování produktu **30** v 39% výtěžku, který se ještě zvýšil na 64 % pakliže byl přepočítán na re-izolovanou výchozí látku **28**. Dále se ukázalo, že pakliže jiná než hydrochloridová sůl hydrazinu je použita, reakce probíhá (a) s nižším výtěžkem (Tabulka 4, řádky 1 a 3 až 6), anebo (b) dochází k degradaci výchozí látky resp. produktu (nižší výtěžek a zároveň méně re-izolované výchozí látky **28** (Tabulka 4, řádky 1, 3, 5 a 6). Na základě těchto poznatků předpokládáme, že pro úspěšné otevření laktonového kruhu v **28** spojené s tvorbou nenasyčené vazby v B-kruhu je pravděpodobně zapotřebí Bronstedtova kyselina s velice specifickým pKa (předpokládáme, že za daných podmínek dochází k rychlé disociaci $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HX}$ solí na NH_2NH_2 a HX). Tato kyselina musí být velice silná, takže reakce probíhá v přítomnosti silných kyselin jako je HCl a HBr .

Uvolněný solvatovaný kationt H^+ následně aktivuje laktonový kruh k otevření (interakce s kyslíkem na CO v laktonu), a volný hydrazin je pak dostatečně bazický k tomu, aby umožnil deprotonaci H^+ atomu v pozici C9 na giberelinu **28**. Zároveň hydrazin není dostatečně bazický ani nukleofilní, takže nebyl pozorován žádný další produkt vedlejších reakcí. Navržený mechanismus této transformace je zachycen na Schéma 10.

Tabulka 4 - Příprava dienu **30**



| Vstup | Hydrazin | Reakční podmínky | Produkt 30 (%) ^b | Re-izolovaná výchozí látka 28 (%) ^b |
|----------|--|---|------------------------------------|---|
| 1 | $NH_2NH_2 \cdot HBr$ (12 ekviv) | DMF, 135 °C (hom.) ^a , 120 °C (4 hod) | 20 | 16 |
| 2 | $NH_2NH_2 \cdot HCl$ (12 ekviv) | DMF, 135 °C (hom.)^a, 120 °C (4 hod) | 39 | 25 |
| 3 | $NH_2NH_2 \cdot 2HCl$ (12 ekviv) | DMF, 135 °C (hom.) ^a , 120 °C (4 hod) | 18 | 23 |
| 4 | $NH_2NH_2 \cdot AcOH$ (12 ekviv) | DMF, 135 °C (hom.) ^a , 120 °C (2 hod) | 14 | 55 |
| 5 | NH_2NH_2 v acetonitrilu (12 ekviv) | DMF, 135 °C (hom.) ^a , 120 °C (2 hod) | ≤5 | 14 |
| 6 | $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ (12 ekviv) | DMF, 110 °C (2 hod) | ≤5 | - |

^a hom = reakční čas při dané teplotě odpovídá době homogenizace (plné rozpuštění reaktantů ve směsi) reakční směsi

^b odpovídá izolovanému výtěžku.

Pozorovaný rozdíl ve výtěžcích cíleného otevřeného giberelinu **28** u reakcí katalyzovaných pomocí $NH_2NH_2 \cdot HBr$ (Tabulka 4, řádek 1), $NH_2NH_2 \cdot HCl$ (Tabulka 4, řádek 2) a $NH_2NH_2 \cdot 2HCl$ (Tabulka 4, řádek 3) je připisován síle použité kyseliny. V případě HBr (silnější kyselina, lepší disociovatelnost) je s vysokou pravděpodobností v reakční směsi vyšší koncentrace H^+ iontů, a ta má pravděpodobně za následek zrychlenou degradaci výchozí látky **28** na neidentifikovatelné vedlejší produkty. Tentýž efekt má pravděpodobně na svědomí použití hydrazin dihydrochloridu (dvojnásobné množství H^+ iontů). Na základě tohoto pozorování odvozujeme, že reakce je příkladem specifické kyselé katalýzy⁹⁸ reakční kinetika závisí na koncentraci H^+ iontů, rychlostní konstanta závisí na koncentraci HA^+ (látka **40** ve Schéma 10). V případě HCl je koncentrace H^+ iontů v roztoku nižší, a tedy dochází k pomalejšímu rozkladu intermediátu **41** na nežádoucí vedlejší produkty (Tabulka 4, řádek 2). Jakmile se ale použijí méně silné Bronstedtovy kyseliny respektive jejich konjugované báze jako $NH_2NH_2 \cdot AcOH$ a $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ (Tabulka 4, řádky 4 a 6; mnohem nižší koncentrace H^+ iontů v roztoku), otevření laktonu pak probíhá mnohem pomaleji ($NH_2NH_2 \cdot AcOH$), respektive vůbec ($NH_2NH_2 \cdot H_2O$). V případě čistého hydrazinu (Tabulka 4, řádek 5), v roztoku není

přítomna žádná Bronstedtova kyselina pro aktivaci karbonylu v laktonovém kruhu). Reakce tedy neprobíhá.

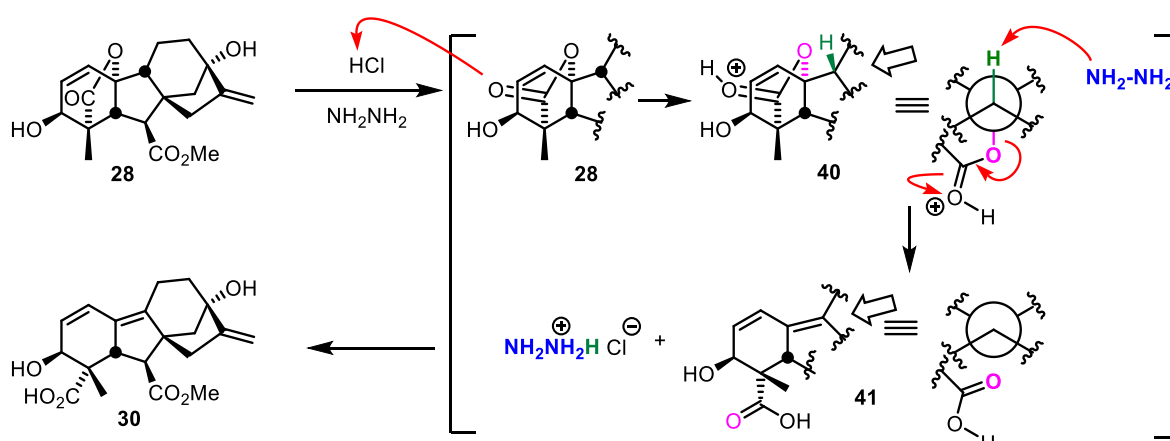


Schéma 10 - Předpokládaný mechanismus pro otevření laktonového kruhu v **28** pomocí hydrazinolýzy.

5.1.2.2 Selektivní chránění C19 karboxylu molekuly **30** a její další modifikace

Cílem této části bylo nalezení vhodné protektivní skupiny C19 karboxylu molekuly **30**, kterou by bylo možné posléze v pokročilých krocích syntézy selektivně odchránit a zpětně tak regenerovat laktonový kruh. Vyzkoušena byla řada protektivních skupin, z nich ty úspěšné jsou zobrazeny v následujícím schématu (Schéma 11). S látkami **31**, **32**, **33** bylo přistoupeno k dalším naplánovaným krokům syntézy, které jsou podrobně rozebrány v následujících podkapitolách (5.1.2.2.1, 5.1.2.2.2 a 5.1.2.2.3). Látku **34** nebylo možné připravit v adekvátním výtěžku a k dalším krokům s ní tedy nebylo přistoupeno.

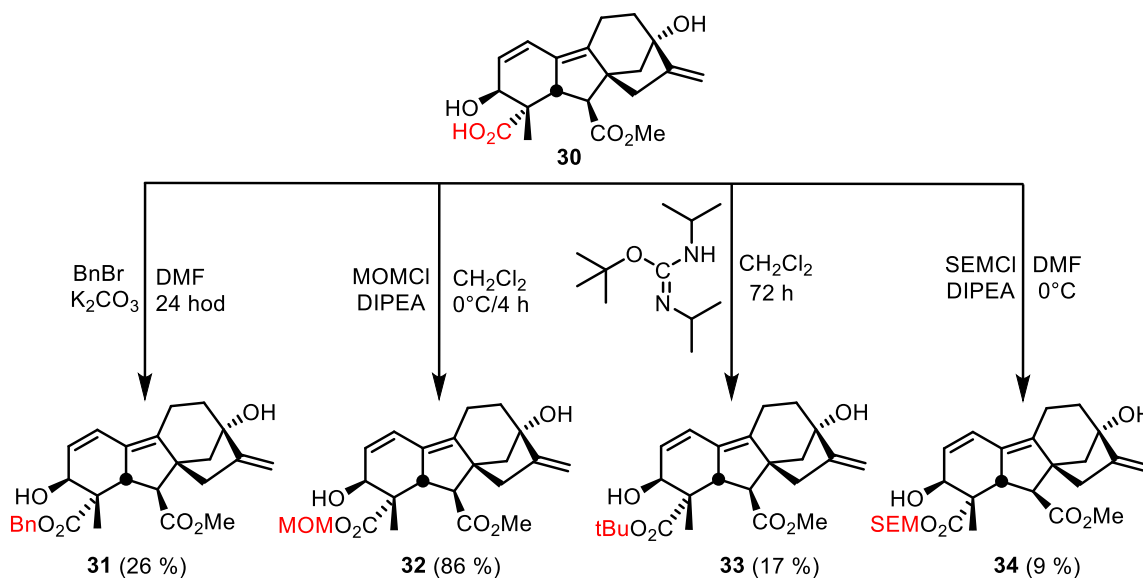


Schéma 11 – Chránění C19 karboxylu v molekule **30**

5.1.2.2.1 Modifikace molekuly 31

Z pohledu výtěžnosti byl za potencionálně nejvýhodnější chránicí skupinu zvolena benzylová funkční skupina. Benzylace byla provedena dle již optimalizovaného protokolu⁹¹ pomocí benzyloxybromidu v přítomnosti K_2CO_3 . Za těchto podmínek byla látka **31** získána s 86% výtěžkem. Následující krok zahrnoval selektivní oxidaci sekundárního alkoholu molekuly **31** na pozici C3 na odpovídající keton **35** (Schéma 12). Reakce byla provedena pomocí Dess-Martinova reagentu (DMP, oxidace pomocí hypervalentního jódu) za teploty 0 °C v CH_2Cl_2 . Za těchto podmínek bylo pozorováno, že reakce probíhala s úplnou konverzí látky **35**, avšak v jejím průběhu vzniká velké množství vedlejších produktů. Předpokládali jsme, že tvorba vedlejších produktů může být způsobena přítomností kyseliny octové, jež během reakce vzniká. K její neutralizaci byly tedy do reakční směsi přidány 3 ekvivalenty $NaHCO_3$. Přídavkem báze došlo ke značnému potlačení vedlejších reakcí, avšak výtěžnost reakce se příliš nezvedla. Maximální izolovaný výtěžek této reakce se tak pohyboval kolem 83 %. Dodatečně se také ukázalo, že rychlost reakce může být zvýšena přídavkem 5 ekvivalentů H_2O . Rychlost reakce se sice zvýšila (úplná konverze po 3 hodinách), ale výtěžek zůstal nezměněn (82% izolovaný výtěžek).

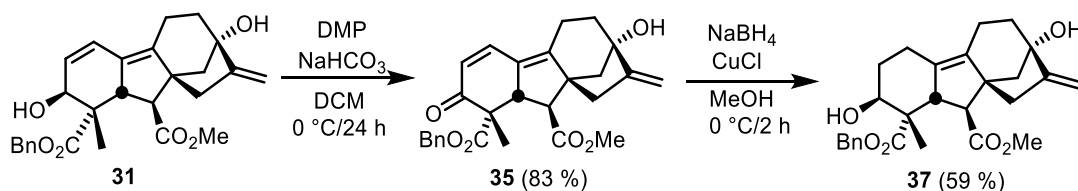


Schéma 12 – Selektivní oxidace C3 alkoholu **31** a následná redukce α,β -nenasyceného ketonu **35**

Po získání intermediátu **31** následovala redukce α,β -nenasyceného ketonu v A kruhu na příslušný nasycený alkohol **37**. Redukce probíhala na základě literatury⁹⁹ v jednom kroku pomocí selektivního redukčního činidla $NaBH_4/CuCl$ v MeOH při 0 °C. Pravým redukčním činidlem je při této reakci *in situ* generovaný hydrid mědi $[Cu-H]$ (generovaný redukcí $CuCl$ pomocí $NaBH_4$), který selektivně redukuje α,β -nenasycený keton na odpovídající nasycený keton. Nadbytek $NaBH_4$ pak následně zredukuje vzniklý keton na odpovídající alkohol. Protože tento keton je součástí rigidního cyklického skeletu, redukce je stereoselektivní a alkohol **37** vzniká pouze jako jeden diastereoizomer. Látka **37** byla získána v 59% výtěžku (Schéma 12).

Následně byla pozornost zaměřena na odstranění obou hydroxylových skupin z látky **37** (alkoholy na pozicích C3 a C13). Tento krok se následně ukázal jako kritický krok naší syntézy. Odstranění obou hydroxylových skupin mělo tak probíhat skrz Barton–McCombie deoxygenační reakci.¹⁰⁰ U této sekvence dvou reakcí dochází nejprve k „aktivaci“ obou hydroxylových funkčních skupin (transformace na dobře odstupné skupiny), které jsou následně v druhém kroku radikálovým mechanismem nahrazeny za atom vodíku. Aktivace hydroxylových skupin molekuly **37** byla provedena pomocí 1,1'-thiokarbonyldiimidazolu v THF za vzniku intermediátu **42**. Další způsob aktivace, jenž jsme využili, byl založen na převedení hydroxylových skupin na methyl oxalyl estery

reakcí s methyl oxalyl chloridem (vznik látky **43**, Schéma 13). Následně bylo přistoupeno k druhému kroku reakce, kdy získané deriváty **42** a **43** (kvůli jejich nestabilitě bylo pracováno se surovou reakční směsí, identifikace vzniku těchto látek na proběhla základě charakteristických signálů v ^1H NMR spektru – posun signálu C3 atomu vodíku směrem k vyššímu poli, a ^{13}C NMR spektru – změna posunu signálů atomů uhlíku C3 a C13) byly podrobeny radikálové reakci, ve které byly ponechány reagovat s $n\text{Bu}_3\text{SnH}$ (donor atomu vodíku) v přítomnosti AIBN (iniciátor radikálové reakce). Reakce probíhala při teplotě 130-140 °C (vnější teplota lázně) v roztoku toluenu po dobu 8 hodin. U obou látek, **42** a **43**, však při těchto reakcích došlo zejména k odchránění chránící benzylové skupiny C19 karboxylu (Schéma 13). Benzylická skupina byla pravděpodobně díky stabilizaci konjugovaným systémem aktivovaná pro tvorbu radikálů, které zapříčinily redukci esteru. To by neznamenal takový problém, neboť by bylo možné karboxylovou kyselinu dodatečně ochránit, ale bohužel v našem případě došlo navíc i k dekarboxylaci, která měla za následek rozpad celé molekuly. Bohužel se tedy ukázalo, že benzylová skupina je více než nevhodná pro tuto reakční sekvenci.

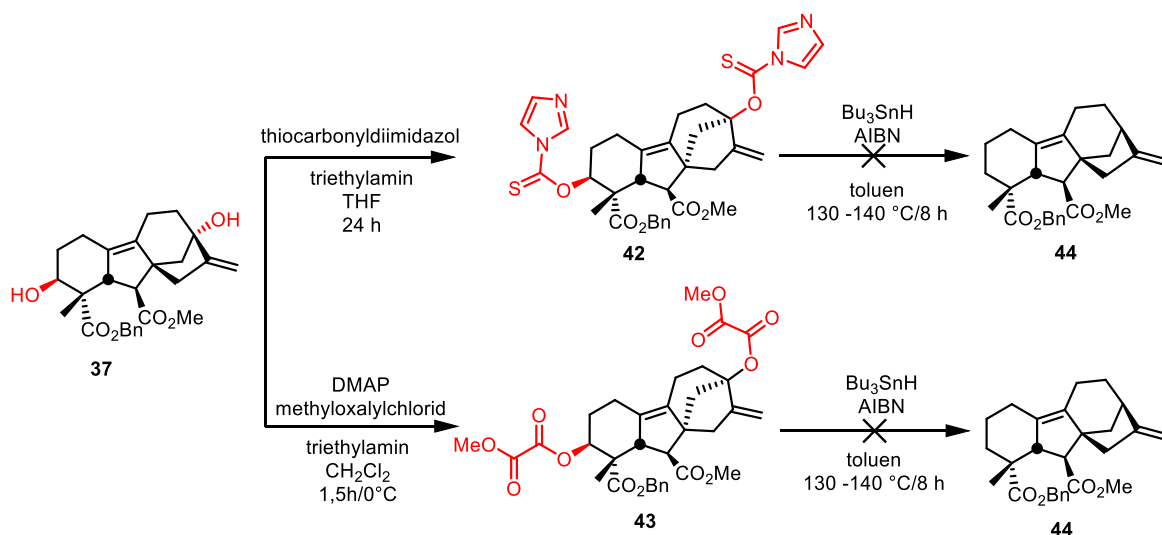


Schéma 13 – Aktivace hydroxylových skupin na pozicích C3 a C13 látky **37** s následným pokusem o jejich odstranění

5.1.2.2.2 Modifikace molekuly **32**

Jak již bylo zmíněno výše, k ochránění C19 karboxylu látky **30** byl využit taktéž MOM ester (kapitola 5.1.2.2). Protekce probíhala pomocí *in situ* připraveného MOMCl v přítomnosti DIPEA a poskytla ester **32** ve 26% výtěžku. I když tento výtěžek byl malý, rozhodli jsme se nejprve vyzkoušet (před tím, než bychom se jej pokusily zvýšit) redukci obou alkoholů na pozicích C3 a C13. Tato látka tedy ani nebyla transformována na odpovídající nenasycený alkohol (v analogii k přípravě látky **37**), ale okamžitě jsme se zaměřili na deoxygenační reakci (Schéma 12). Barton-McComnie deoxygenační sekvence tak probíhala podobným postupem, jak bylo popsáno v předešlé kapitole (5.1.2.2.1). Hydroxy skupiny tedy byly nejdříve aktivovány ve formě methyl oxalyl esteru za vzniku intermediátu **45**, který byl následně podroben deoxygenaci pomocí $n\text{Bu}_3\text{SnH}$ /AIBN systému. Avšak i v tomto případě MOM ester nebyl dostatečně stabilní a došlo k deMOMaci následovanou dekarboxylací.

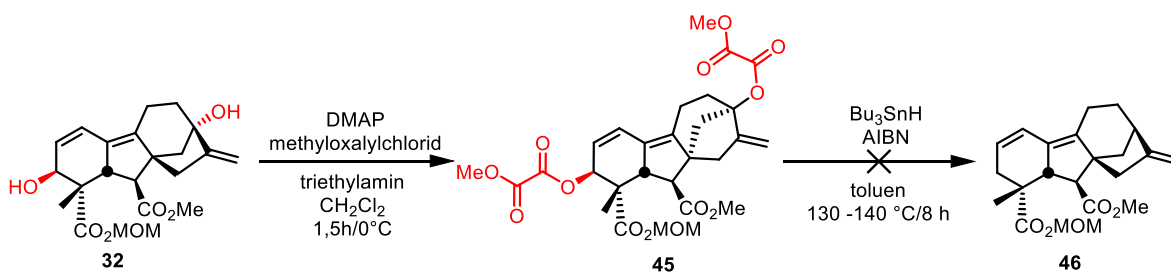


Schéma 14 - Aktivace hydroxylových skupin na pozicích C3 a C13 látky **32** s následným pokusem o jejich odstranění

5.1.2.2.3 Modifikace molekuly **33**

Po předchozích nezdarech bylo přistoupeno k otestování další chránicí skupiny – *tert*-butylu. Ochránění příslušné karboxylové kyseliny bylo provedeno pomocí *tert*-butyl *N,N'*-diisopropylkarbamimidátu, který byl připraven dle standartního protokolu z DIC v přítomnosti bezvodého *t*-butanolu a CuCl.¹⁰¹ Se získaným činidlem bylo následně přistoupeno k ochránění C19 karboxylu látky **30**. Reakce probíhala v bezvodém DCM po dobu 72 hodin a dala vzniknout produktu **33** v 17% výtěžku (Schéma 11). Výsledný produkt **33** byl následně podroben selektivní oxidaci C3 alkoholu na keton **36** (Schéma 15). Reakce probíhala po dobu 3,5 hodin při 0 °C a produkt **36** vznikl v 83% výtěžku. Se získaným ketonem bylo následně přistoupeno ke dvojité redukci α,β -nenасыceného δ -laktonu (olefin a keton) na příslušný alkohol **38** pomocí CuCl/NaBH₄. Reakce probíhala nejdříve dvě hodiny při teplotě 0 °C a následně dodatečných 24 hodin při laboratorní teplotě. Při reakci byl získán diol **38** v 50% výtěžku. Látka **38** pak byla podrobena dvoukrokové Barton–McCombie deoxygenační (hydroxylové skupiny v pozicích C3 a C13) reakci.

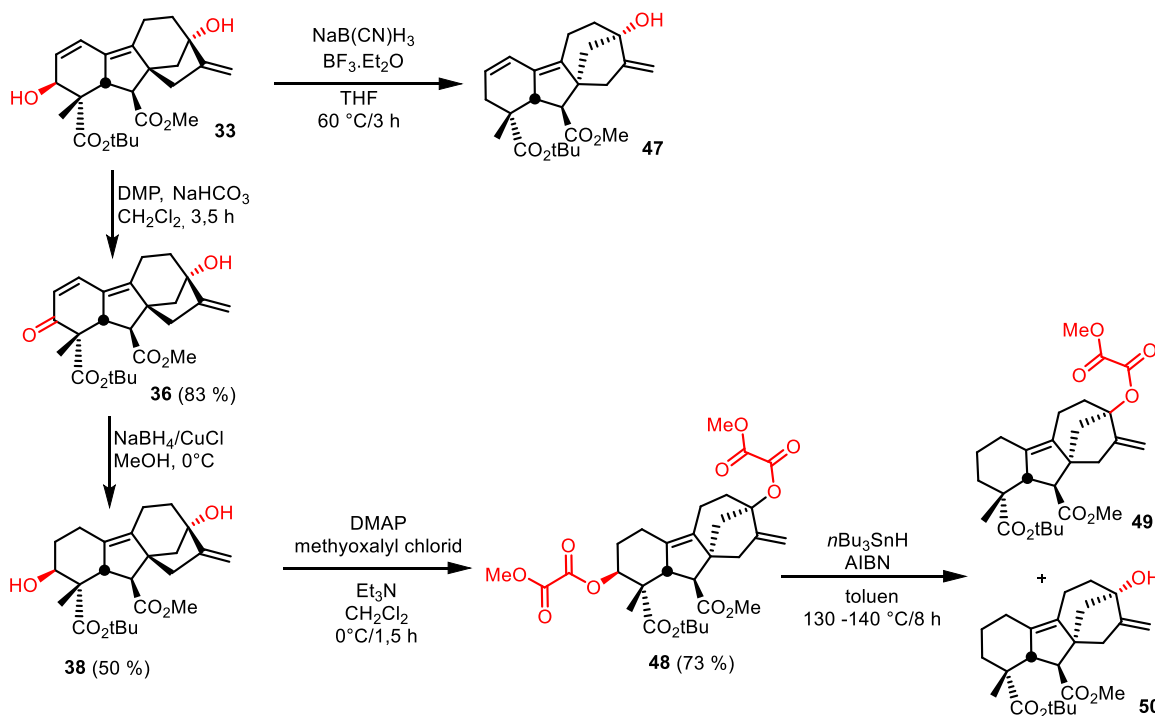


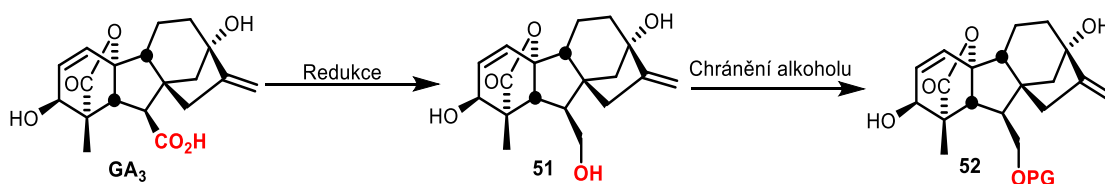
Schéma 15 - Detekované intermediáty po Barton–McCombie deoxygenaci **49** a **50**. K odstranění hydroxylových skupin došlo v obou případech pouze na pozici C3.

Při této reakci se nám povedlo v reakční směsi identifikovat dva typy produktů, látky **49** a **50** (Schéma 15). Na základě LC-MS analýzy a analýzy surové reakční směsi na základě ^1H NMR spektra jsme zjistili, že reakce proběhla pouze částečně a došlo k deoxygeanci u C3 alkoholu (kruh A). Na pozici C13 však stále zůstával methyl oxalyl ether (látko **49**) nebo volná hydroxy skupina vzniklá hydrolyzou tohoto esteru (látko **50**). Možným důvodem k tomuto pozorování je fakt, že základní molekulární skelet kolem molekuly **48** je značně stericky bráněn a neumožňuje tak přístup redukčního činidla ($n\text{Bu}_3\text{Sn}\bullet$) k C13 aktivovanému hydroxyly. Na druhou stranu se nám potvrdilo, že při použití *tert*-butylu jako chránicí skupiny nedochází k degradaci výchozí látky skrz hydrolyzu esteru a následnou dekarboxylaci.

Bohužel i když *tert*-butylová chránicí skupina vykazovala za deoxygenačních reakčních podmínkách stabilitu, její inhibice druhého deoxygenačního kroku je její velkou limitací. K odstranění hydroxylových skupin jsme tedy vyzkoušeli jinou metodu založenou na chemoselektivní reduktivní deoxygenace α,β -nenasycených alkoholů (Schéma 15).¹⁰² Výchozí látka **31** tedy byla podrobena redukcí v přítomnosti kyanoborohydridu sodného v přítomnosti BF_3 etherátu. V tomto případě ovšem také pouze došlo k deoxygenaci C3 hydroxyly, zatímco druhý allylický alkohol v pozici C13 zůstal nezměněn. I v tomto případě ale nedošlo k izolaci produktu (reakce prováděna na 3 mg diolu **31**), a přítomnost dané látky byla pouze potvrzena pomocí HPLC/MS metody (**47**; 423 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 439 $[\text{M}+\text{K}]^+$, R.t. = 25.6 min. Látko **49**; 527 $[\text{M}+\text{K}]^+$; R.t. = 3.42 min. Látko **50**; 425 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 441 $[\text{M}+\text{K}]^+$; R.t. = 27.05 min) a na základě charakteristických píků v ^1H NMR spektru).

5.1.2.3 Redukce C7 karboxylu na alkohol

Zároveň s pokusy o nalezení nejvhodnější chránicí skupiny C19 karboxylové funkční skupiny v látce **30**, u které bychom mohli provést deoxygenaci hydroxylových skupin na pozicích C3 a C13, jsme se rozhodli prozkoumat i alternativní možnost, kdy by došlo transformací C7 karboxylové skupiny na odpovídající alkohol. Této C7 alkohol by mohl být následně oxidován na odpovídající kyseliny v okamžiku, kdybychom to potřebovali. Tím pádem bychom mohli nově vytvořenou C19 karboxylovou skupinu transformovat na odpovídající methyl ester, který je plně kompatibilní se všemi testovanými reakčními podmínkami. Díky velmi dobré dostupnosti byla výchozí látkou pro tyto experimenty zvolena látka **GA**₃. Po potvrzení naší prvotní myšlenky by daný postup byl využit před otevřením laktonového kruhu (tvorba C19 karboxylu u **30**).



PG = protektivní skupina

Schéma 16 - Obecné schéma redukce karboxylové kyseliny (**51**) na alkohol a jeho následné ochrání (**52**)

Rozhodli jsme se tedy transformovat GA₃ na odpovídající chráněný alkohol **52** (Schéma 16). Tento přístup by nám také umožnil si vybrat vhodnou chránicí skupinu pro alkohol **51**, která by nám umožnila provádět všechny cílové reakční transformace. Navíc bychom připravili novou třídu látek vhodných k biologickému testování, neb jsou v literatuře dosud nepopsány. Ale hlavně, díky tomuto přístupu bychom rozšířili paletu možností výběru vhodné stabilní protektivní skupiny, která by byla ortogonální s ostatními funkčními skupinami v připravených derivátech gibberelinů. V pozdějších krocích syntézy by pak daná chránicí skupina byla selektivně odstraněna a vzniklý alkohol by podroben oxidaci za opětovného vzniku kýžené karboxylové kyseliny.

Plánovaná redukce zahrnovala selektivní transformaci C7 karboxylu u GA₃ na acyl chlorid (reakce s oxalyl chloridem). Vzniklý chlorid kyseliny by pak redukován na příslušný alkohol pomocí NaBH₄. První experimenty, které jsme zaměřili na přímou transformaci GA₃ na její acyl chlorid se setkaly s velkým neúspěchem, neboť se zdálo, že dochází k nechtěným intermolekulárním reakcím mezi acyl chloridem a zbývajícími alkoholy ve skeletu GA₃. Na základě těchto experimentů jsme tedy přistoupili k ochraně volných hydroxylových skupin na pozicích C3 a C13. K protekci byla využita acetylace pomocí anhydridu kyseliny octové v přítomnosti DMAP v pyridinu (Schéma 17). Byl zjištěn významný vliv délky reakční doby na průběh dané reakce. Po 24 hodinách došlo k acetylaci pouze u C3 hydroxyly (vznik molekuly **53**), zatímco pokud došlo k prodloužení reakční doby na 72 hodin, došlo k ochraně i druhého C13 hydroxyly (vznik diacetylované látky **54**).

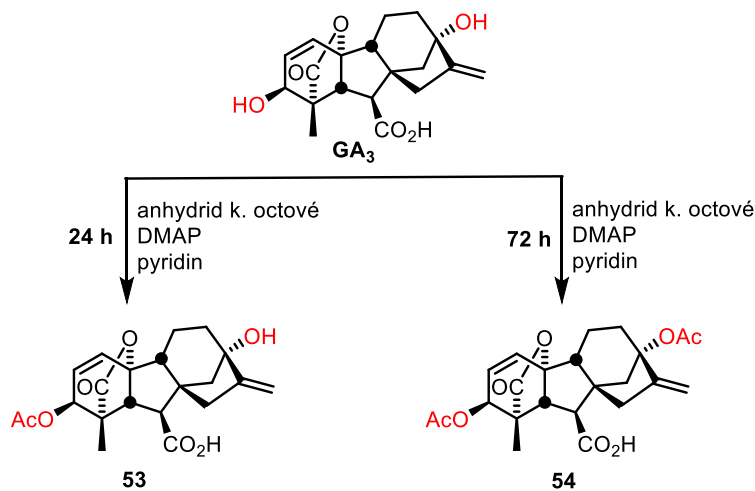


Schéma 17 – Příprava 3-acetyl GA₃ **53** a 3,13-diacetyl GA₃ **54**

Ačkoliv pro následnou syntézu byl využitelný pouze diacetylovaný intermediát **54** (ochráněn C3 i C13 hydroxylová skupia), rozhodli jsem se prozkoumat reaktivitu obou připravených látek. Bylo tedy přistoupeno ke dvoukrokové redukci (vznik acyl chloridu/redukce acyl chloridu) C7 karboxylu u těchto látek. V průběhu reakce tak musí vzniknout intermediáty **55** a **56**. Je známo, že acylchloridy jsou značně nestabilní, proto dané deriváty nebyly purifikovány a jakmile došlo k úplné konverzi výchozích látek **53** a **54** při jejich transformaci na C7 acyl chloridy (přítomnost acylchloridů byla

potvrzena na základě charakteristických signálů v ^{13}C NMR spektrech), surové produkty byly ponechány reagovat s NaBH_4 (Schéma 18).

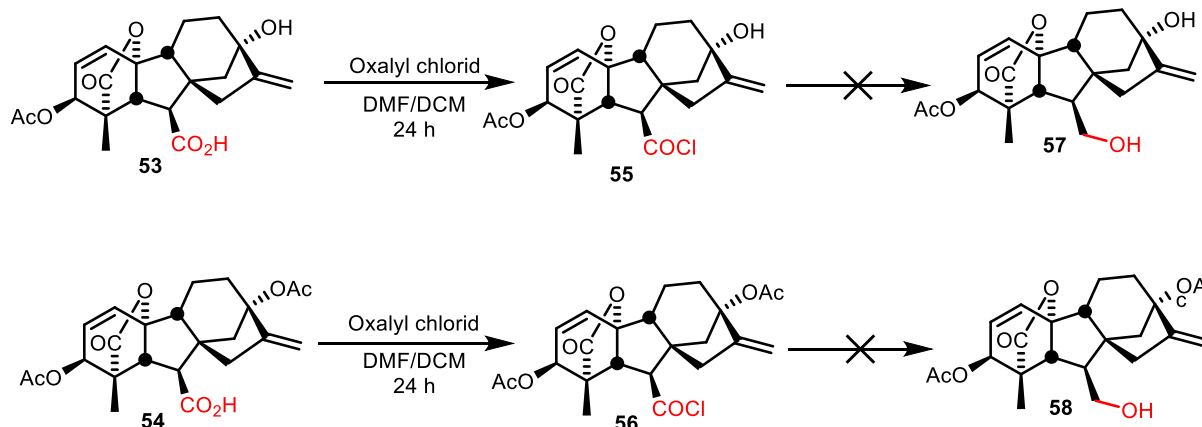


Schéma 18 - Postupná redukce C7 karboxylu na příslušný alkohol

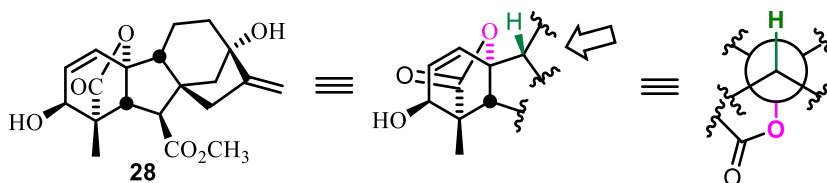
Bohužel, ani v jednom případě nebyla detekována přítomnost alkoholů **57** a **58** po reakci v reakční směsi. Látka **56** byla také redukována pomocí BH_3 v THF (pracováno s 1 ekviv., 2 ekviv., 4 ekviv., 6 ekviv.) při různých teplotách (0 °C, RT, 60 °C), avšak i v tomto případě byly reakce neúspěšné a pouze produkty degradace výchozí látky byly detekovány v průběhu reakce.

5.1.3 Syntéza vycházející z giberelinu **A₄**

5.1.3.1 Otevření laktonu u methyl (**50**) a MOM (**58**) derivátu **GA₄**

Jelikož se nám nepodařilo připravit dienový derivát giberelinu **A₃** (**30**) v dostatečném množství a výtěžku, rozhodli jsme se prozkoumat podobnou eliminaci v přítomnosti silných Bronstedtových (*t*BuOK) a Lewisových (DBU) bází u derivátů **GA₄**. Předpokládali jsme, že síla těchto bází nám umožní tvorbu $\text{D}^{9,10}$ olefinu v substrátě **38** díky příhodné *anti* orientaci eliminovatelného protonu a odstupující laktonové skupiny (Schéma 19A). Protože jsme z literatury věděli, že deriváty giberelinů **A₃** jsou náchylné na silně bazické prostředí (rozklad v řádu hodin), rozhodli jsme se optimalizovat tento typ eliminace derivátech giberelinu **A₄**, respektive u látek **38** a **59** (Schéma 19B). Deriváty giberelinů **A₄** jsou obecně mnohem stabilnější a to ať za vyšších teplot, tak i v silně kyselém a zásaditém prostředí (nehrozí kysele či bazicky katalyzovaný přesmyk na C kruhu z důvodu chybějící OH skupiny na uhlíku C13).²⁶ Na druhou stranu, při eliminaci může dojít ke kompetitivní eliminaci v rámci kruhu A a tvorbě olefinu $\text{D}^{1,10}$ (látka **60**) namísto cílového produktu **61** (tvorba olefinu $\text{D}^{9,10}$ na B kruhu). Z analýzy Newmanových projekcí jsme ale usoudili, že eliminace za tvorby olefinu $\text{D}^{9,10}$ bude z důvodu kinetického přístupu k „zelenému“ vodíku (na pozici C19) statisticky nejpravděpodobnější (nejlepší překryv mezi vazebným orbitalem s (vazba C-H) a protivazebným orbitalem s^* (vazba C-O). Vazebný orbital s (C-H) je přeci jen trochu více vychýlen, a tedy překryv není tak dokonalý. Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že eliminace vodíku v kruhu B bude probíhat rychleji.

A. Anti-orientace mezi cílovým atomem **vodíku** a odstupující **karboxylovou** skupinou u giberelinu A₃



B. Poněkud komplikovanější situace u modelové struktury derivátů giberelinu A₄

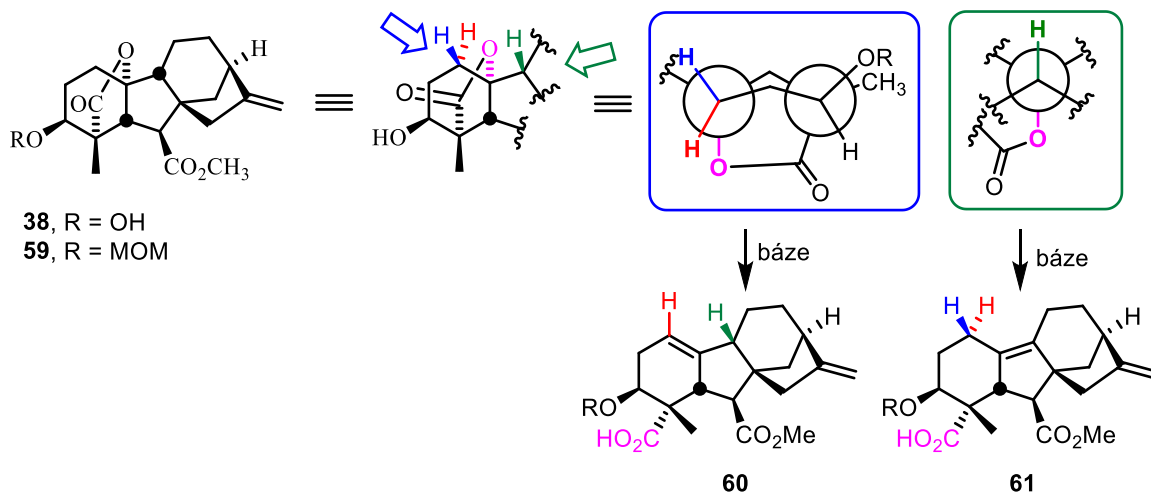
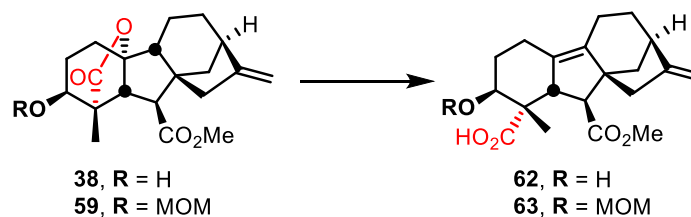


Schéma 19 - Schematizace možných eliminačních dějů u derivátů giberelinu A₃ a A₄ znázorněná pomocí Newmanových projekcí dle cílené C-C vazby

Takto posílení teoretickým konceptem jsme se rozhodli otestovat dvě báze DBU a *t*BuOK pro tuto reakci. Obě báze byly testovány v různých koncentracích, za různých teplot a v různých rozpouštědlech. Bohužel, ani v jednom případě nebyl pozorován vznik cílového produktu **61**. Ve všech případech jsme izolovali po reakci pouze nezreagovanou výchozí látku (Tabulka 5).

Tabulka 5 - Pokus o otevření laktonu a instalaci $\Delta^{9,10}$ olefinu u derivátů giberelinu A₄ (**38** a **59**)



| Vstup | Výchozí látka | Báze (ekviv.) | Reakční podmínky | Poznámka ^{a)} |
|-------|---------------|--------------------------|---|------------------------|
| 1 | 38 | DBU (3 ekviv.) | DCM (0,1M) 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 2 | 38 | DBU (3 ekviv.) | DMF (0,1M) 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 3 | 38 | DBU (3 ekviv.) | THF 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 4 | 38 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | DCM 24 h/RT | n.r. |
| 5 | 38 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | DMF 24 h při RT | n.r. |
| 6 | 38 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | THF 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 7 | 38 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | <i>t</i> -BuOH 24 h při RT | n.r. |
| 8 | 59 | DBU (6 ekviv.) | DCM 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 9 | 59 | DBU (6 ekviv.) | DMF 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 10 | 59 | DBU (3 ekviv.) | THF 24 h při RT | n.r. |
| 11 | 59 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | DCM 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 12 | 59 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | DMF 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 13 | 59 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | THF 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |
| 14 | 59 | <i>t</i> BuOK (3 ekviv.) | <i>t</i> -BuOH 24 h při RT, poté 4 h při 40 °C | n.r. |

a) n.r. = žádná reakce, pouze výchozí látka detekována pomocí TLC a ¹H NMR

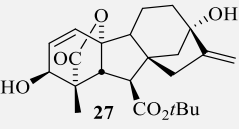
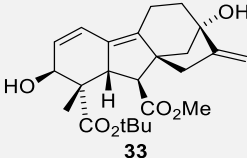
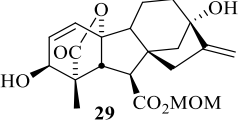
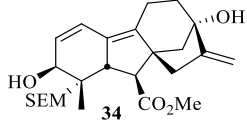
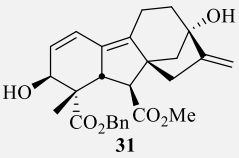
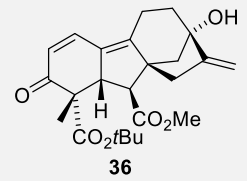
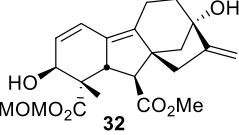
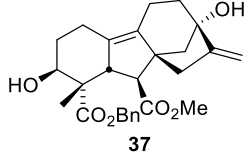
Je tedy nutné říct, že provedené experimenty nepotvrdily naši prvotní myšlenku o snadnosti eliminace a tvorbě olefinu v rámci B kruhu. Ani v jednom testovaném případě totiž nedošlo k otevření laktonového kruhu a vzniku produktu **62** nebo **63**. Myslíme si, že tato pozorovaná nereaktivita vůči silným bázím je způsobena vysokou stabilitou laktonového kruhu. Další proměnnou, která s velkou pravděpodobností hraje v náš neprospěch, je větší sterické bránění v okolí cílového atomu vodíku, které s velkou pravděpodobností zabraňuje jeho efektivní eliminaci.

5.2 Biologické testování

5.2.1 *In vitro* testování na buněčných liniích

V rámci výzkumu byla připravena knihovna GA derivátů s potencionální biologickou aktivitou, u kterých bylo provedeno ohodnocení biologické aktivity z pohledu jejich vlivu (cytotoxicita a protinádorová aktivita) na nádorové i nenádorové buněčné linie. Testování proběhlo na buněčných liniích MCF-7 odvozených od prsního adenokarcinomu a RPE1-hTERT linii epitelových buněk retiny imortalizovaných lidskou telomerázou (Tabulka 6). Žádná z testovaných látek (molekuly **27**, **29**, **31**, **32**, **33**, **34**, **36** a **37**) nevykazovala cytotoxicitu vůči nenádorovým (RPE1-hTERT) buněčným liniím ani protinádorové účinky vůči nádorovým liniím rakoviny prsu (MCF-7).

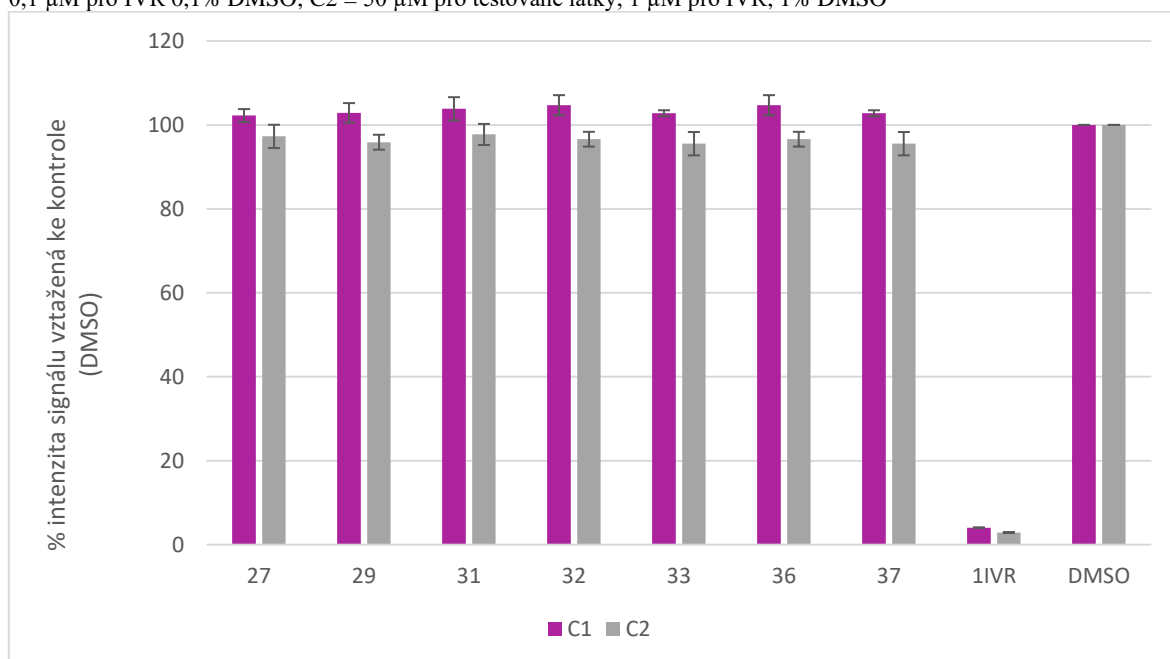
Tabulka 6 - Výsledky biologických testů na buněčné linii MCF-7 (odvozeno od prsního adenokarcinomu) a RPE1-hTERT (odvozené od epitelových buněk retiny imortalizovaných lidskou telomerázou) pro vybrané testované látky. Látky byly testovány v různých koncentracích (maximální koncentrace 50 μM) a vyhodnoceny po 72 h inkubaci.

| Testovaná látka | IC ₅₀ (μM) MCF-7 | IC ₅₀ (μM) RPE-1 | Testovaná látka | IC ₅₀ (μM) MCF-7 | IC ₅₀ (μM) RPE-1 |
|--|---|---|---|---|---|
|  27 | >50 | >50 |  33 | >50 | >50 |
|  29 | >50 | >50 |  34 | >50 | >50 |
|  31 | >50 | >50 |  36 | >50 | >50 |
|  32 | >50 | >50 |  37 | >50 | >50 |

5.2.2 Anthelmintická aktivita

Aktivita vybraných připravených látek byla otestována taktéž na larvách hlístic *C. elegans*. Krátkodobá toxicita vybraných připravených látek (molekuly **27**, **29**, **31**, **32**, **33**, **36** a **37**) a jejich účinek na diverzitu červů byl testován pomocí chitinázového testu i vizuálního hodnocením červů pod mikroskopem. Látky byly testovány ve dvou koncentracích 5 μM (C1) a 50 μM (C2) a u žádné nebyla zaznamenána cytotoxická aktivita. Ani vizuální hodnocení v mikroskopu neodhalilo výrazný toxický efekt ani snížení produkce potomstva (Graf 1).

Graf 1 - Výsledky chitinázového testu – průměr ze 3 experimentů +/- SEM. Koncentrace C1 = 5 μM pro testované látky, 0,1 μM pro IVR 0,1% DMSO; C2 = 50 μM pro testované látky, 1 μM pro IVR, 1% DMSO



5.2.3 Kompetitivní inhibice giberelin 2-oxidázy (GA3ox2)

Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, v dnešní době se vědecká komunita zaměřuje na přípravu nových derivátů giberelinů, které mohou potencionálně sloužit jako takzvané retardéry růstu. I proto jsme se rozhodli připravené deriváty nechat otestovat na inhibici GA3ox2, která katalyzuje přeměnu GA₉ na bioaktivní GA₄. Žádná významná inhibiční aktivita u testovaných látek (látky **27**, **29**, **31**, **32**, **33**, **36** a **37**) však nebyla zaznamenána.

6 Závěr

Předložená diplomová práce popisuje práci na totální syntéze nového endogenního giberelinu nedávno detekovaného v laboratoři prof. Heddena v Rotsham Research center. Jako výchozí struktury byly vybrány komerčně dostupné gibereliny A₃, A₄ a A₇, paralelně tedy bylo pracováno na třech různých syntetických cestách. Syntézy vycházející z giberelinu A₄ a A₇ však odhalily své limitace již během prvních několika kroků a bylo od nich tedy brzy upuštěno. Největší úsilí bylo věnováno syntéze založené na využití giberelinu A₃ s cílem co nejbližší se přiblížit struktuře klíčového intermediátu **1**. Cesta k němu vedoucí byla velice detailně prozkoumána (příloha č.2) a i nadále jí bude věnována dostatečná pozornost.

V průběhu syntézy byla připravena knihovna nových giberelinových derivátů, jež byla ohodnocena z hlediska své biologické aktivity. Primární důraz byl kladen na prověření cytotoxické aktivity, kdy cílem těchto experimentů bylo vyhodnotit (a následně vyloučit) jakékoliv potenciální riziko, které by mohlo vzniknout z nežádoucích interakcí semisyntetických derivátů GA s lidskými buňkami. Jestliže by byla v případě některého připraveného GA derivátu zjištěna cytotoxicita vůči nenádorové buněčné linii, tento derivát by byl okamžitě vyloučen z dalších testů, aby se zabránilo vývoji GA derivátů, které by nemohly být potenciálně použity při vývoji nových derivátů giberelinů pro využití v polních podmínkách. U žádné z testovaných látek cytotoxická aktivita nebyla zaznamenána. U vybraných molekul byla dále prověřována jejich protinádorová aktivita, krátkodobá toxicita na *C. elegans* a inhibiční aktivita vůči GA3ox2. Ani v tomto případě biologické testy žádnou aktivitu neodhalily.

7 Použitá literatura

- (1) Davies, P. J. *Plant Hormones*, 3rd ed.; Davies, P. J., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>.
- (2) Fleet, C. M.; Sun, T. A DELLAcate Balance: The Role of Gibberellin in Plant Morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8* (1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.015>.
- (3) Stowe, B. B.; Yamaki, T. Gibberellins: Stimulants of Plant Growth: Thirty Years' Work in Japan Has Initiated World-Wide Research with a Novel Group of Plant Hormones. *Science*. **1959**, *129* (3352), 807–816. <https://doi.org/10.1126/science.129.3352.807>.
- (4) Kleczkowski, K.; Schell, J.; Bandur, R. Phytohormone Conjugates: Nature and Function. *Crc. Cr. Rev. Plant Sci.* **1995**, *14* (4), 283–298. <https://doi.org/10.1080/07352689509382361>.
- (5) Hedden, P.; Sponsel, V. A Century of Gibberellin Research. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34* (4), 740–760. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9546-1>.
- (6) Mander, L. N.; Sherburn, M.; Camp, D.; King, R. W.; Evans, L. T.; Pharis, R. P. Effects of D-Ring Modified Gibberellins on Flowering and Growth in *Lolium Temulentum*. *Phytochemistry* **1998**, *49* (8), 2195–2206. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00310-0).
- (7) Rademacher, W. Rowth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu. Rev. Plant Physio.* **2000**, *51* (1), 501–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>.
- (8) Marcelle, R.; Sironval, C. Effect of Gibberellic Acid on Flowering of Apple Trees. *Nature* **1963**, *197* (4865), 405–405. <https://doi.org/10.1038/197405a0>.
- (9) Zhang, S.; Gottschalk, C.; van Nocker, S. Genetic Mechanisms in the Repression of Flowering by Gibberellins in Apple (*Malus x Domestica* Borkh.). *BMC Genomics* **2019**, *20* (1), 747. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6090-6>.
- (10) Xie, L.; Chen, Y.; Chen, J.; Zhang, H.; Liao, Y.; Zhou, Y.; Zhou, L.; Qing, C. Anti-Tumor Effects and Mechanism of GA-13315, a Novel Gibberellin Derivative, in Human Lung Adenocarcinoma: An in Vitro and in Vivo Study. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2019**, *24* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s11658-018-0126-9>.
- (11) Zhang, Y.; Zhang, H.; Chen, J.; Zhao, H.; Zeng, X.; Zhang, H.; Qing, C. Antitumor and Antiangiogenic Effects of GA-13315, a Gibberellin Derivative. *Invest. New Drugs* **2012**, *30* (1), 8–16. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9501-8>.
- (12) Chen, J.; Sun, Z.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Qing, C.; Liu, J.; Li, L.; Zhang, H. Synthesis of Gibberellin Derivatives with Anti-Tumor Bioactivities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (18), 5496–5499. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.090>.
- (13) Tian, H.; Xu, Y.; Liu, S.; Jin, D.; Zhang, J.; Duan, L.; Tan, W. Synthesis of Gibberellic Acid Derivatives and Their Effects on Plant Growth. *Molecules* **2017**, *22* (5), 694.

- <https://doi.org/10.3390/molecules22050694>.
- (14) Dayan, J.; Voronin, N.; Gong, F.; Sun, T.; Hedden, P.; Fromm, H.; Aloni, R. Leaf-Induced Gibberellin Signaling Is Essential for Internode Elongation, Cambial Activity, and Fiber Differentiation in Tobacco Stems. *Plant Cell* **2012**, *24* (1), 66–79. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093096>.
- (15) Ragni, L.; Nieminen, K.; Pacheco-Villalobos, D.; Sibout, R.; Schwechheimer, C.; Hardtke, C. S. Mobile Gibberellin Directly Stimulates Arabidopsis Hypocotyl Xylem Expansion. *Plant Cell* **2011**, *23* (4), 1322–1336. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084020>.
- (16) Beck, E. J.; Twitchin, B.; Mander, L. N. Radio Labelling of the Gibberellin Plant Growth Inhibitor 16,17-Dihydro-GA 5. *Can. J. Chem.* **2004**, *82* (2), 293–300. <https://doi.org/10.1139/v03-202>.
- (17) Tanaka, J.; Yano, K.; Aya, K.; Hirano, K.; Takehara, S.; Koketsu, E.; Ordonio, R. L.; Park, S.-H.; Nakajima, M.; Ueguchi-Tanaka, M.; Matsuoka, M. Antheridiogen Determines Sex in Ferns via a Spatiotemporally Split Gibberellin Synthesis Pathway. *Science*. **2014**, *346* (6208), 469–473. <https://doi.org/10.1126/science.1259923>.
- (18) Sponsel, V. M. Signal Achievements in Gibberellin Research: The Second Half-Century. In *Annual Plant Reviews, Volume 49*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2016; Vol. 49, pp 1–36. <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch1>.
- (19) Navarro, L.; Bari, R.; Achard, P.; Lisón, P.; Nemri, A.; Harberd, N. P.; Jones, J. D. G. DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Curr. Biol.* **2008**, *18* (9), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.060>.
- (20) Wiemann, P.; Sieber, C. M. K.; von Bargen, K. W.; Studt, L.; Niehaus, E.-M.; Espino, J. J.; Huß, K.; Michielse, C. B.; Albermann, S.; Wagner, D.; Bergner, S. V.; Connolly, L. R.; Fischer, A.; Reuter, G.; Kleigrew, K.; Bald, T.; Wingfield, B. D.; Ophir, R.; Freeman, S.; Hippler, M.; Smith, K. M.; Brown, D. W.; Proctor, R. H.; Münsterkötter, M.; Freitag, M.; Humpf, H.-U.; Güldener, U.; Tudzynski, B. Deciphering the Cryptic Genome: Genome-Wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. *Plos Pathog.* **2013**, *9* (6), e1003475. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003475>.
- (21) Lu, X.; Hershey, D. M.; Wang, L.; Bogdanove, A. J.; Peters, R. J. An Ent-kaurene-derived Diterpenoid Virulence Factor from *Xanthomonas oryzae* Pv. *Oryzicola*. *New Phytol.* **2015**, *206* (1), 295–302. <https://doi.org/10.1111/nph.13187>.
- (22) Mander, L. N. The Chemistry of Gibberellins: An Overview. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (4), 573–612. <https://doi.org/10.1021/cr00012a005>.
- (23) Ueguchi-Tanaka, M.; Ashikari, M.; Nakajima, M.; Itoh, H.; Katoh, E.; Kobayashi, M.; Chow, T.; Hsing, Y. C.; Kitano, H.; Yamaguchi, I.; Matsuoka, M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 Encodes a Soluble Receptor for Gibberellin. *Nature* **2005**, *437*

- (7059), 693–698. <https://doi.org/10.1038/nature04028>.
- (24) West, C. A. Gibberellins as Native Plant Growth Regulators. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1960**, *11* (1), 411–436. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.11.060160.002211>.
- (25) Bruckner, B.; Blechschmidt, D. Nitrogen Regulation of Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella Fujikuroi*. *Appl Microbiol Biot.* **1991**, *35* (5), 163. <https://doi.org/10.1007/BF00169631>.
- (26) Mander, L. N. Twenty Years of Gibberellin Research. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 49–69. <https://doi.org/10.1039/b007744p>.
- (27) MacMillan, J.; Takahashi, N. Proposed Procedure for the Allocation of Trivial Names to the Gibberellins. *Nature* **1968**, *217* (5124), 170–171. <https://doi.org/10.1038/217170a0>.
- (28) Cen, Y.-K.; Lin, J.-G.; Wang, Y.-L.; Wang, J.-Y.; Liu, Z.-Q.; Zheng, Y.-G. The Gibberellin Producer *Fusarium Fujikuroi*: Methods and Technologies in the Current Toolkit. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8* (232). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00232>.
- (29) Ropers, H.-J.; Graebe, J. E.; Gaskin, P.; MacMillan, J. Gibberellin Biosynthesis in Cell-Free System from Immature Seeds of *Pisum Sativum*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1978**, *80* (4), 690–697. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91299-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91299-8).
- (30) Barendse, G. W. M.; Kepczynski, J.; Karssen, C. M.; Koornneef, M. The Role of Endogenous Gibberellins during Fruit and Seed Development: Studies on Gibberellin-Deficient Genotypes of *Arabidopsis Thaliana*. *Physiol. Plant.* **1986**, *67* (2), 315–319. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb02463.x>.
- (31) MacMillan, J. Biosynthesis of the Gibberellin Plant Hormones. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14* (3), 221. <https://doi.org/10.1039/np9971400221>.
- (32) Peng, J.; Carol, P.; Richards, D. E.; King, K. E.; Cowling, R. J.; Murphy, G. P.; Harberd, N. P. The *Arabidopsis* GAI Gene Defines a Signaling Pathway That Negatively Regulates Gibberellin Responses. *Genes Dev.* **1997**, *11* (23), 3194–3205. <https://doi.org/10.1101/gad.11.23.3194>.
- (33) Ueguchi-Tanaka, M.; Nakajima, M.; Motoyuki, A.; Matsuoka, M. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58* (1), 183–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830>.
- (34) Hedden, P. Gibberellins Close the Lid. *Nature* **2008**, *456* (27), 455–456. <https://doi.org/10.1038/456455a>.
- (35) Cross, B. E.; Galt, R. H. B.; Hanson, J. R. The Biosynthesis of the Gibberellins. Part I. (—)-Kaurene as a Precursor of Gibberellic Acid. *J. Chem. Soc.* **1964**, *0* (0), 295–300. <https://doi.org/10.1039/JR9640000295>.
- (36) Yamaguchi, S. Gibberellin Metabolism and Its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59* (1), 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>.
- (37) de Oliveira, B. H.; Stiirmer, J. C.; de Souza Filho, J. D.; Ayub, R. A. Plant Growth Regulation Activity of Steviol and Derivatives. *Phytochemistry* **2008**, *69* (7), 1528–1533.

- <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.015>.
- (38) Hedden, P.; Thomas, S. G. Gibberellin Biosynthesis and Its Regulation. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), 11–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20120245>.
- (39) Yamaguchi, S. Gibberellin Metabolism and Its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59* (1), 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>.
- (40) Hedden, P. The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **2020**, *61* (11), 1832–1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>.
- (41) Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M.; Schwender, J. Two Independent Biochemical Pathways for Isopentenyl Diphosphate and Isoprenoid Biosynthesis in Higher Plants. *Physiol. Plant.* **1997**, *101* (3), 643–652. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010327.x>.
- (42) Van Schie, C. C. N.; Ament, K.; Schmidt, A.; Lange, T.; Haring, M. A.; Schuurink, R. C. Geranyl Diphosphate Synthase Is Required for Biosynthesis of Gibberellins. *Plant J.* **2007**, *52* (4), 752–762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03273.x>.
- (43) Morrone, D.; Chambers, J.; Lowry, L.; Kim, G.; Anterola, A.; Bender, K.; Peters, R. J. Gibberellin Biosynthesis in Bacteria: Separate Ent-Copalyl Diphosphate and Ent-Kaurene Synthases in *Bradyrhizobium Japonicum*. *FEBS Lett.* **2009**, *583* (2), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.052>.
- (44) Graebe, J. E.; Hedden, P.; MacMillan, J. The Ring Contraction Step in Gibberellin Biosynthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1975**, *1* (5), 161. <https://doi.org/10.1039/c39750000161>.
- (45) Helliwell, C. A.; Chandler, P. M.; Poole, A.; Dennis, E. S.; Peacock, W. J. The CYP88A Cytochrome P450, Ent-Kaurenoic Acid Oxidase, Catalyzes Three Steps of the Gibberellin Biosynthesis Pathway. *P Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (4), 2065–2070. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.2065>.
- (46) Su, P.; Tong, Y.; Cheng, Q.; Hu, Y.; Zhang, M.; Yang, J.; Teng, Z.; Gao, W.; Huang, L. Functional Characterization of Ent-Copalyl Diphosphate Synthase, Kaurene Synthase and Kaurene Oxidase in the *Salvia Miltiorrhiza* Gibberellin Biosynthetic Pathway. *Sci Rep-UK.* **2016**, *6* (1), 23057. <https://doi.org/10.1038/srep23057>.
- (47) Giacomelli, L.; Rota-Stabelli, O.; Masuero, D.; Acheampong, A. K.; Moretto, M.; Caputi, L.; Vrhovsek, U.; Moser, C. Gibberellin Metabolism in *Vitis Vinifera* L. during Bloom and Fruit-Set: Functional Characterization and Evolution of Grapevine Gibberellin Oxidases. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64* (14), 4403–4419. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert251>.
- (48) Thomas, S. G.; Phillips, A. L.; Hedden, P. Molecular Cloning and Functional Expression of Gibberellin 2- Oxidases, Multifunctional Enzymes Involved in Gibberellin Deactivation. *P Natl Acad Sci USA* **1999**, *96* (8), 4698–4703. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4698>.
- (49) Schomburg, F. M.; Bizzell, C. M.; Lee, D. J.; Zeevaart, J. A. D.; Amasino, R. M. Overexpression of a Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Decreases Gibberellin Levels and Creates Dwarf Plants. *Plant Cell* **2003**, *15* (1), 151–163.

- <https://doi.org/10.1105/tpc.005975>.
- (50) Zhu, Y.; Nomura, T.; Xu, Y.; Zhang, Y.; Peng, Y.; Mao, B.; Hanada, A.; Zhou, H.; Wang, R.; Li, P.; Zhu, X.; Mander, L. N.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S.; He, Z. ELONGATED UPPERMOST INTERNODE Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. *Plant Cell* **2006**, *18* (2), 442–456. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038455>.
- (51) Schneider, G.; Jensen, E.; Spray, C. R.; Phinney, B. O. Hydrolysis and Reconjugation of Gibberellin A20 Glucosyl Ester by Seedlings of Zea Mays L. *P Natl Acad Sci USA* **1992**, *89* (17), 8045–8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8045>.
- (52) Brian, P. W. Effects of Gibberellins on Plant Growth and Development. *Biol. Rev.* **1959**, *34* (1), 37–77. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1959.tb01301.x>.
- (53) Hazebroek, J. P.; Metzger, J. D. Thermoinductive Regulation of Gibberellin Metabolism in *Thlaspi Arvense* L. *Plant Physiol.* **1990**, *94* (1), 157–165. <https://doi.org/10.1104/pp.94.1.157>.
- (54) Hedden, P. *Annual Plant Reviews, Volume 49*; Hedden, P., Thomas, S. G., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2016.
- (55) Achard, P.; Gusti, A.; Cheminant, S.; Alioua, M.; Dhondt, S.; Coppens, F.; Beemster, G. T. S.; Genschik, P. Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **2009**, *19* (14), 1188–1193. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.059>.
- (56) McGinnis, K. M.; Thomas, S. G.; Soule, J. D.; Strader, L. C.; Zale, J. M.; Sun, T.; Steber, C. M. The Arabidopsis SLEEPY1 Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase. *Plant Cell* **2003**, *15* (5), 1120–1130. <https://doi.org/10.1105/tpc.010827>.
- (57) Harberd, N. P. Botany: Relieving DELLA Restraint. *Science*. **2003**, *299* (5614), 1853–1854. <https://doi.org/10.1126/science.1083217>.
- (58) Murase, K.; Hirano, Y.; Sun, T.; Hakoshima, T. Gibberellin-Induced DELLA Recognition by the Gibberellin Receptor GID1. *Nature* **2008**, *456* (7221), 459–463. <https://doi.org/10.1038/nature07519>.
- (59) Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, S. T. Repressing a Repressor: Gibberellin-Induced Rapid Reduction of the RGA Protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **2001**, *13* (7), 1555–1566. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.7.1555>.
- (60) Achard, P.; Genschik, P. Releasing the Brakes of Plant Growth: How GAs Shutdown DELLA Proteins. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60* (4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern301>.
- (61) Dill, A.; Jung, H.-S.; Sun, T. -p. The DELLA Motif Is Essential for Gibberellin-Induced Degradation of RGA. *P Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (24), 14162–14167. <https://doi.org/10.1073/pnas.251534098>.
- (62) Wexler, S.; Schayek, H.; Rajendar, K.; Tal, I.; Shani, E.; Meroz, Y.; Dobrovetsky, R.; Weinstain, R. Characterizing Gibberellin Flow in Planta Using Photocaged Gibberellins. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (5), 1500–1505. <https://doi.org/10.1039/C8SC04528C>.

- (63) Rademacher, W. Chemical Regulators of Gibberellin Status and Their Application in Plant Production. In *Annual Plant Reviews, Volume 49*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2016; pp 359–404. <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch12>.
- (64) Daviere, J.-M.; Achard, P. Gibberellin Signaling in Plants. *Development* **2013**, *140* (6), 1147–1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>.
- (65) Chandler, P. M.; Marion-Poll, A.; Ellis, M.; Gubler, F. Mutants at the Slender1 Locus of Barley Cv Himalaya. Molecular and Physiological Characterization. *Plant Physiol.* **2002**, *129* (1), 181–190. <https://doi.org/10.1104/pp.010917>.
- (66) Janevska, S.; Tudzynski, B. Secondary Metabolism in Fusarium Fujikuroi: Strategies to Unravel the Function of Biosynthetic Pathways. *Appl Microbiol Biot.* **2018**, *102* (2), 615–630. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8679-5>.
- (67) Živičnjak, M.; Franke, D.; Zenker, M.; Hoyer, J.; Lücke, T.; Pape, L.; Ehrich, J. H. H. SMARCAL1 Mutations: A Cause of Prepubertal Idiopathic Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Pediatr. Res.* **2009**, *65* (5), 564–568. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181998a74>.
- (68) Guttridge, C. G. Inhibition of Fruit-Bud Formation in Apple with Gibberellic Acid. *Nature* **1962**, *196* (4858), 1008–1008. <https://doi.org/10.1038/1961008a0>.
- (69) Mitchell, J. W.; Wirwille, J. W.; Weil, L. Plant Growth-Regulating Properties of Some Nicotinium Compounds. *Science.* **1949**, *110* (2854), 252–254. <https://doi.org/10.1126/science.110.2854.252>.
- (70) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- (71) Sixt, M.; Koudous, I.; Strube, J. Process Design for Integration of Extraction, Purification and Formulation with Alternative Solvent Concepts. *Cr Chim* **2016**, *19* (6), 733–748. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.12.016>.
- (72) Rehman, M.; Singh, Z.; Khurshid, T. Pre-Harvest Spray Application of Prohexadione-Calcium and Paclobutrazol Improves Rind Colour and Regulates Fruit Quality in M7 Navel Oranges. *Sci Hortic - Amsterdam.* **2018**, *234* (1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.018>.
- (73) Beck, E. J.; Twitchin, B.; Mander, L. N. Radio Labelling of the Gibberellin Plant Growth Inhibitor 16,17-Dihydro-GA 5. *Can. J. Chem.* **2004**, *82* (2), 293–300. <https://doi.org/10.1139/v03-202>.
- (74) Adams, D. J. The Valley of Death in Anticancer Drug Development: A Reassessment. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33* (4), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.001>.
- (75) Bailón-Moscoso, N.; Romero-Benavides, J. C.; Ostrosky-Wegman, P. Development of Anticancer Drugs Based on the Hallmarks of Tumor Cells. *Tumor Biol.* **2014**, *35* (5), 3981–3995. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1649-y>.
- (76) Spencer, C. M.; Faulds, D. Paclitaxel. *Drugs* **1994**, *48* (5), 794–847.

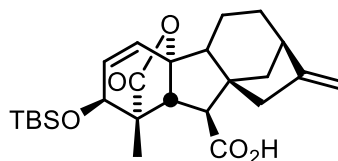
<https://doi.org/10.2165/00003495-199448050-00009>.

- (77) Hartwell, L. H. Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs. *Science*. **1997**, 278 (5340), 1064–1068. <https://doi.org/10.1126/science.278.5340.1064>.
- (78) Sun, H.-D.; Huang, S.-X.; Han, Q.-B. Diterpenoids from *Isodon* Species and Their Biological Activities. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23 (5), 673. <https://doi.org/10.1039/b604174d>.
- (79) Clardy, J.; Walsh, C. Lessons from Natural Molecules. *Nature* **2004**, 432 (7019), 829–837. <https://doi.org/10.1038/nature03194>.
- (80) Bömke, C.; Tudzynski, B. Diversity, Regulation, and Evolution of the Gibberellin Biosynthetic Pathway in Fungi Compared to Plants and Bacteria. *Phytochemistry* **2009**, 70 (15–16), 1876–1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.020>.
- (81) Wang, L.; Zhao, W.-L.; Yan, J.-S.; Liu, P.; Sun, H.-P.; Zhou, G.-B.; Weng, Z.-Y.; Wu, W.-L.; Weng, X.-Q.; Sun, X.-J.; Chen, Z.; Sun, H.-D.; Chen, S.-J. Eriocalyxin B Induces Apoptosis of t(8;21) Leukemia Cells through NF- κ B and MAPK Signaling Pathways and Triggers Degradation of AML1-ETO Oncoprotein in a Caspase-3-Dependent Manner. *Cell Death Differ.* **2007**, 14 (2), 306–317. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401996>.
- (82) Konaklieva, M.; Plotkin, B. Lactones: Generic Inhibitors of Enzymes? *Mini-Reviews Med. Chem.* **2005**, 5 (1), 73–95. <https://doi.org/10.2174/1389557053402828>.
- (83) Folkman, J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* **1995**, 333 (26), 1757–1763. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512283332608>.
- (84) Carmeliet, P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* **2005**, 69 (3), 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>.
- (85) Chen, K. G.; Sikic, B. I. Molecular Pathways: Regulation and Therapeutic Implications of Multidrug Resistance: Figure 1. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18 (7), 1863–1869. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1590>.
- (86) Hermanson, D. L.; Das, S. G.; Li, Y.; Xing, C. Overexpression of Mcl-1 Confers Multidrug Resistance, Whereas Topoisomerase II β Downregulation Introduces Mitoxantrone-Specific Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Pharmacol.* **2013**, 84 (2), 236–243. <https://doi.org/10.1124/mol.113.086140>.
- (87) Yang, R.; Chen, J.-B.; Dai, X.-Y.; Huang, R.; Xiao, C.-F.; Gao, Z.-Y.; Yang, B.; Yang, L.-J.; Yan, S.-J.; Hong-Bin Zhang; Qing, C.; Lin, J. Inclusion Complex of GA-13315 with Cyclodextrins: Preparation, Characterization, Inclusion Mode and Properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 89 (1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.054>.
- (88) Davis, M. E.; Brewster, M. E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3 (12), 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>.
- (89) Zhang, S.; Xu, Z.; Gao, C.; Ren, Q.-C.; Chang, L.; Lv, Z.-S.; Feng, L.-S. Triazole Derivatives and Their Anti-Tubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138 (1), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.051>.
- (90) He, Y.-W.; Dong, C.-Z.; Zhao, J.-Y.; Ma, L.-L.; Li, Y.-H.; Aisa, H. A. 1,2,3-Triazole-

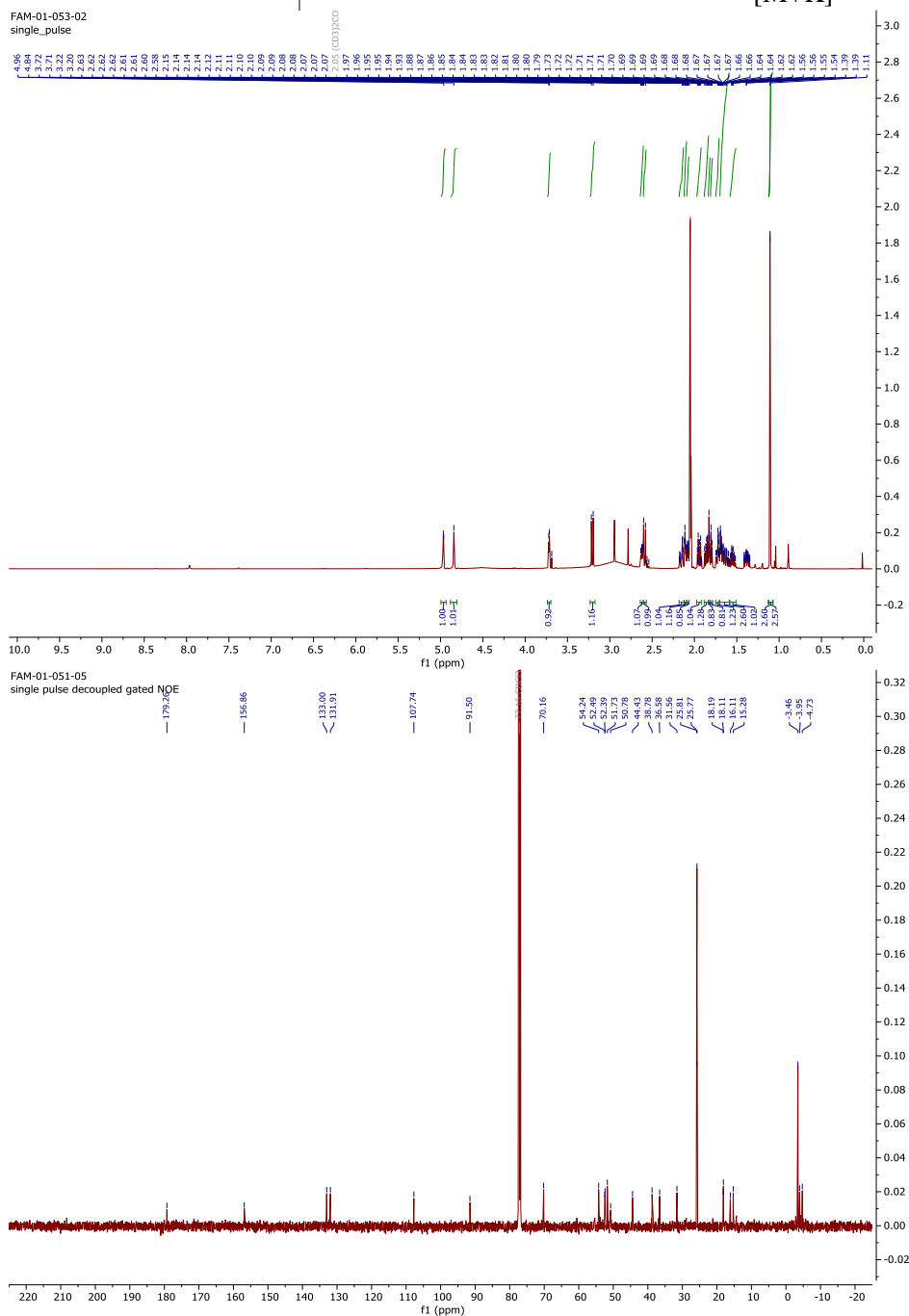
- Containing Derivatives of Rupestonic Acid: Click-Chemical Synthesis and Antiviral Activities against Influenza Viruses. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76 (1), 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.029>.
- (91) Fuksová, M. Příprava Klíčového Intermediátu Vhodného k Identifikaci Struktury Nově Izolovaných Gibberelinů, Palacky University, 2019.
- (92) Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>.
- (93) Lancefield, C. S.; Westwood, N. J. The Synthesis and Analysis of Advanced Lignin Model Polymers. *Green Chem.* **2015**, 17 (11), 4980–4990. <https://doi.org/10.1039/c5gc01334h>.
- (94) Jacobsen, J. V.; Chandler, P. M. Gibberellin and Abscisic Acid in Germinating Cereals. In *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*; Springer Netherlands: Dordrecht, 1987; pp 164–193. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3585-3_10.
- (95) Ku, Y.-Y.; Sawick, D. Separation of GA4-GA7 Mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43 (3), 801–803. <https://doi.org/10.1021/jf00051a045>.
- (96) Cross, B. E. Gibberellic Acid. Part I. *J. Chem. Soc.* **1954**, 4670. <https://doi.org/10.1039/jr9540004670>.
- (97) Phuoc, L. T.; Mander, L. N.; Koshioka, M.; Oyama-Okubo, N.; Nakayama, M.; Ito, A. Confirmation of Structure and Synthesis of Three New 11 β -OH C₂₀ Gibberellins from Loquat Fruit. *Tetrahedron* **2008**, 64 (21), 4835–4851. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.01.131>.
- (98) Lowry, T. H. ; Richardson, K. S. *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, 3rd ed.; Harpercollins College Div: New York, 1987.
- (99) Matsumoto, Y.; Yonaga, M. One-Pot Sequential 1,4- and 1,2-Reductions of α,β -Unsaturated δ -Lactones to the Corresponding δ -Lactols with CuCl and NaBH₄ in Methanol. *Synlett* **2014**, 25 (12), 1764–1768. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340195>.
- (100) Barton, D. H. R.; McCombie, S. W. A New Method for the Deoxygenation of Secondary Alcohols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, No. 16, 1574. <https://doi.org/10.1039/p19750001574>.
- (101) West, K. R.; Bake, K. D.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Libraries of Disulfide Cages in Water. *Org. Lett.* **2005**, 7 (13), 2615–2618. <https://doi.org/10.1021/ol0507524>.
- (102) Srikrishna, A.; Viswajanani, R.; Sattigeri, J. A.; Yelamaggad, C. V. Chemoselective Reductive Deoxygenation of α,β -Unsaturated Ketones and Allyl Alcohols. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (13), 2347–2350. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)00252-8](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00252-8).

8 Příloha č. 1: Charakterizace jednotlivých připravených látek – kopie ^1H a ^{13}C NMR spekter

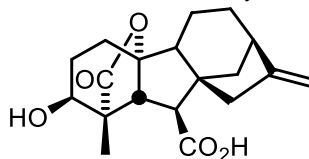
(1*S*,2*S*,4*aR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4*b*,5,6,7,8,9,10,10*a*-decahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-10-karboxyová kyselina (**23**)



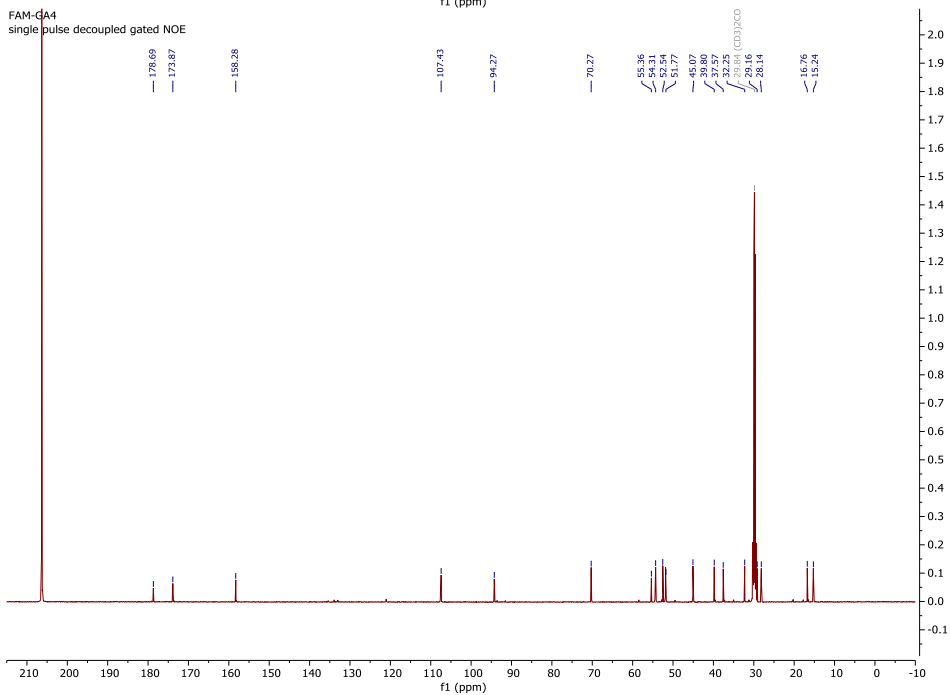
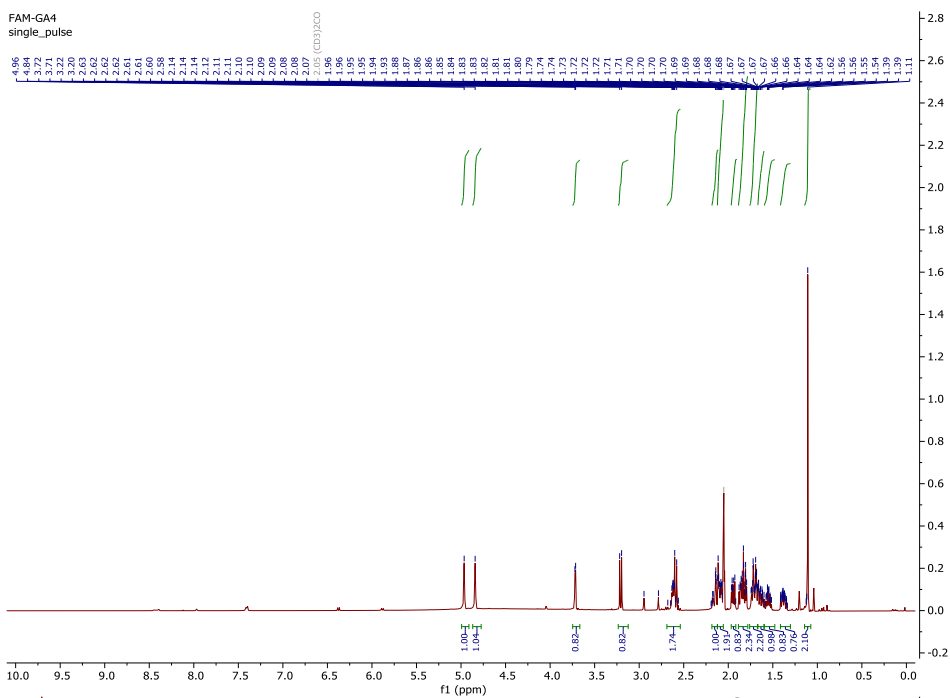
| | | |
|-------------------|---|---|
| MW: 444,23 | B. t. | 188,8-190,2 °C |
| | R.t. | 28.37 min |
| | α_D^{26} | $\alpha_D^{22} = -84,5^\circ$ (<i>c</i> 1,42; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), <i>m/z</i> (%) | 445 [M+H] ⁺ , 467 [M+Na] ⁺ , 483 [M+K] ⁺ |



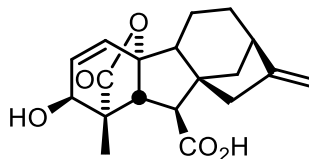
(1*S*,2*S*,4*aR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxododekahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzof[*a*]azulen-10-karboxylová kyselina (**GA₄**)



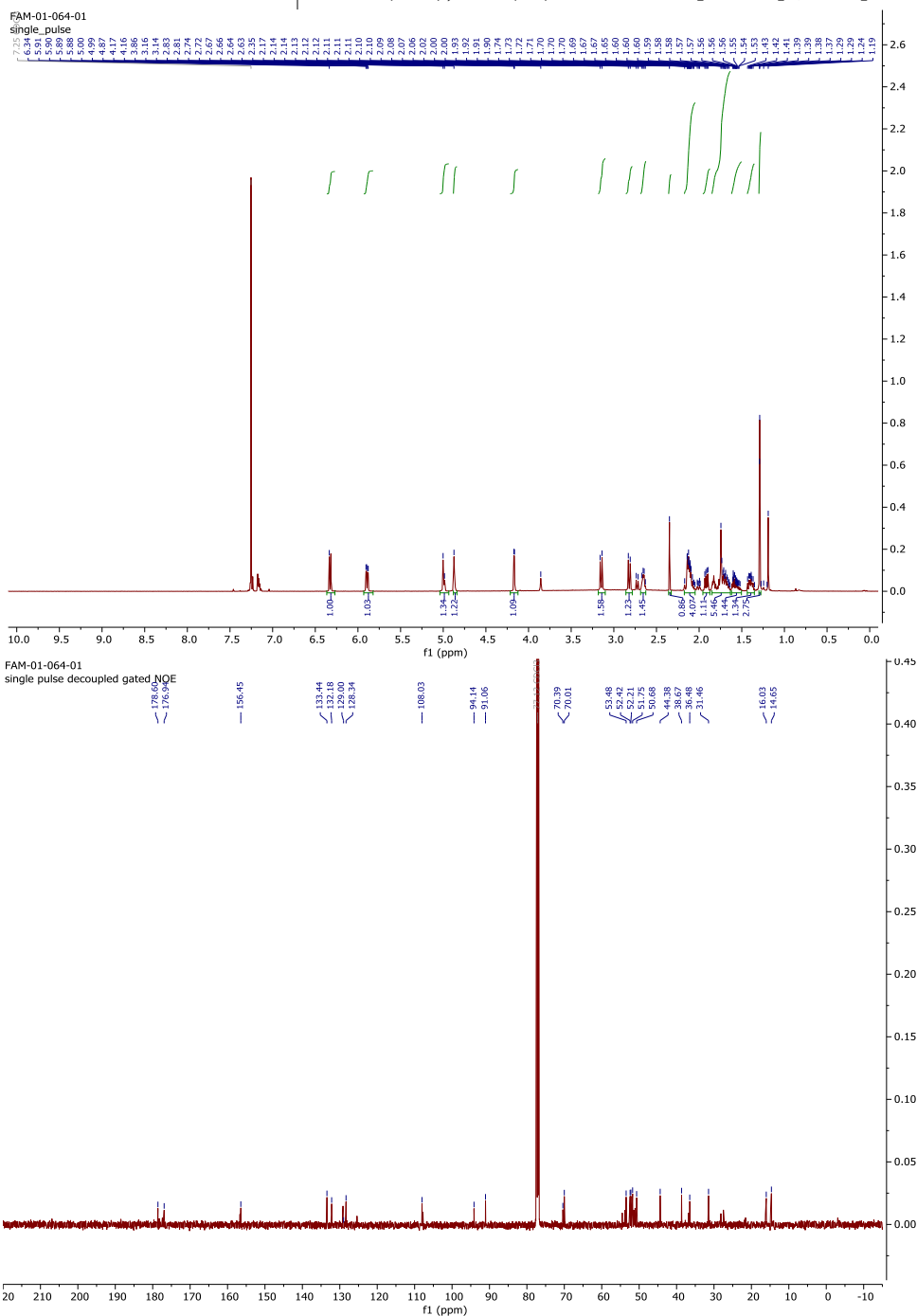
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|---|
| MW: 332,16 | B.t. | 201-201,7 °C |
| | R.t. | 20.83 min. |
| | α_D^{26} | $\alpha_D^{22} = -17^\circ$ (c 0,95; CH ₃ OH); |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 315 [M-H ₂ O + H] ⁺ |



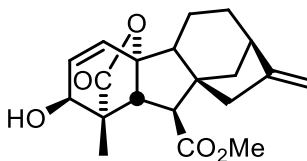
(1*S*,2*S*,4*aR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4*b*,5,6,7,8,9,10,10*a*-dekahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-10-karboxylová kyselina (**GA7**)



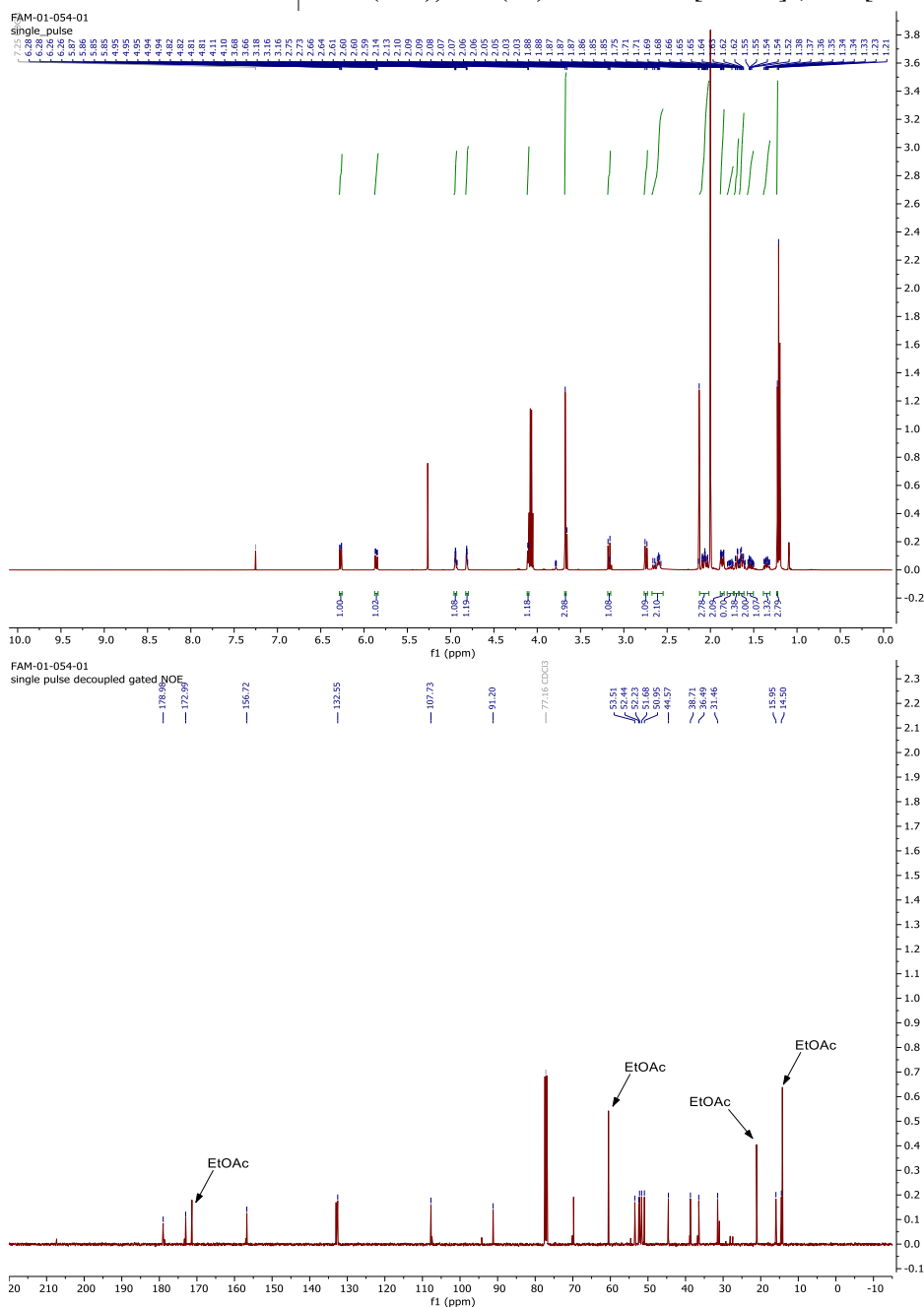
| | | |
|-------------------|-------------------------------------|--|
| MW: 330,15 | B. t. | 190,2-192,2 °C |
| | R.t. | 20.35 min |
| | α_D^{23} | -12,7° (c 1,28; CH ₃ OH) |
| | MS (ES⁺), m/z (%) | 353 [M+Na] ⁺ , 369 [M+K] ⁺ |



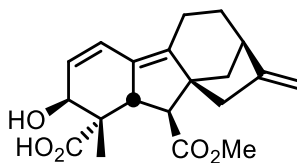
Methyl (1S,2S,4aR,7R,9aR,10S,10aR)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-dekhydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzof[a]azulen-10-karboxylát (24)



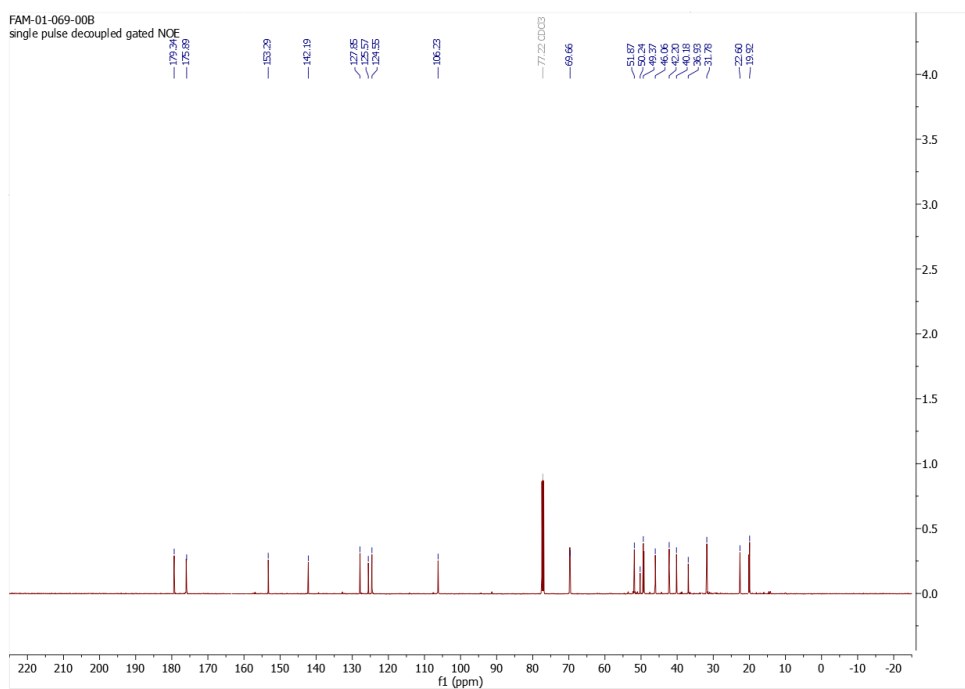
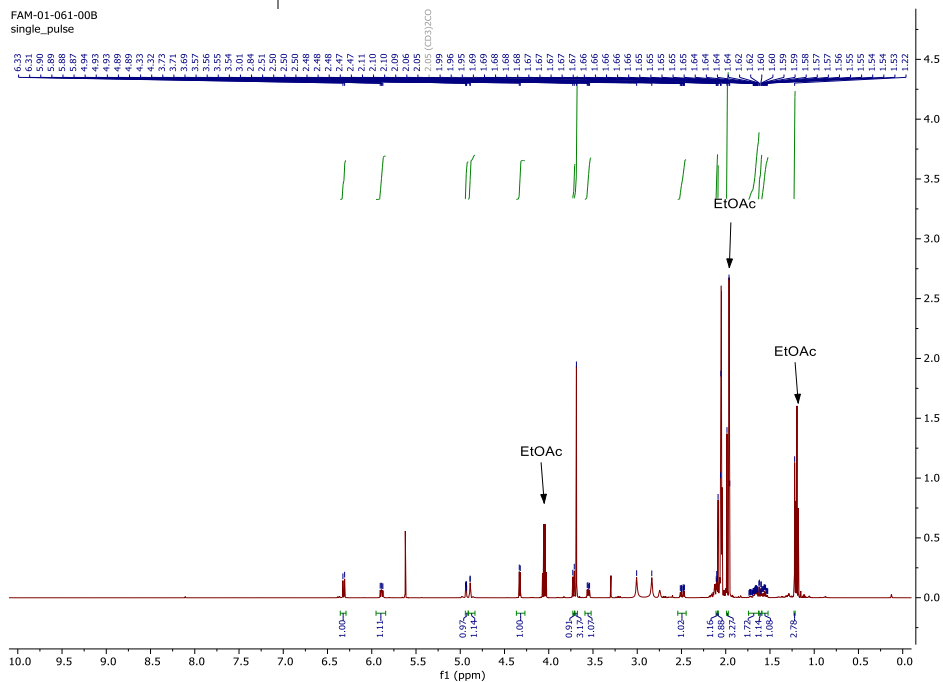
| | | |
|-------------------|-------------------------------------|--|
| MW: 344,16 | B. t. | 148,3-148,7 °C |
| | R.t. | 22.53 min |
| | α_D^{22} | +17,6° (c 1,63; CH ₃ OH) |
| | MS (ES⁺), m/z (%) | 367 [M+Na] ⁺ , 383 [M+K] ⁺ |



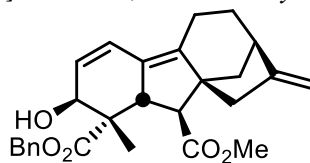
(1*S*,2*S*,7*R*,9*aS*,10*S*,10*aS*)-2-hydroxy-10-(methoxykarbonyl)-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10*a*-octahydro-1*H*-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azule-1-karboxylová kyselina (**25**)



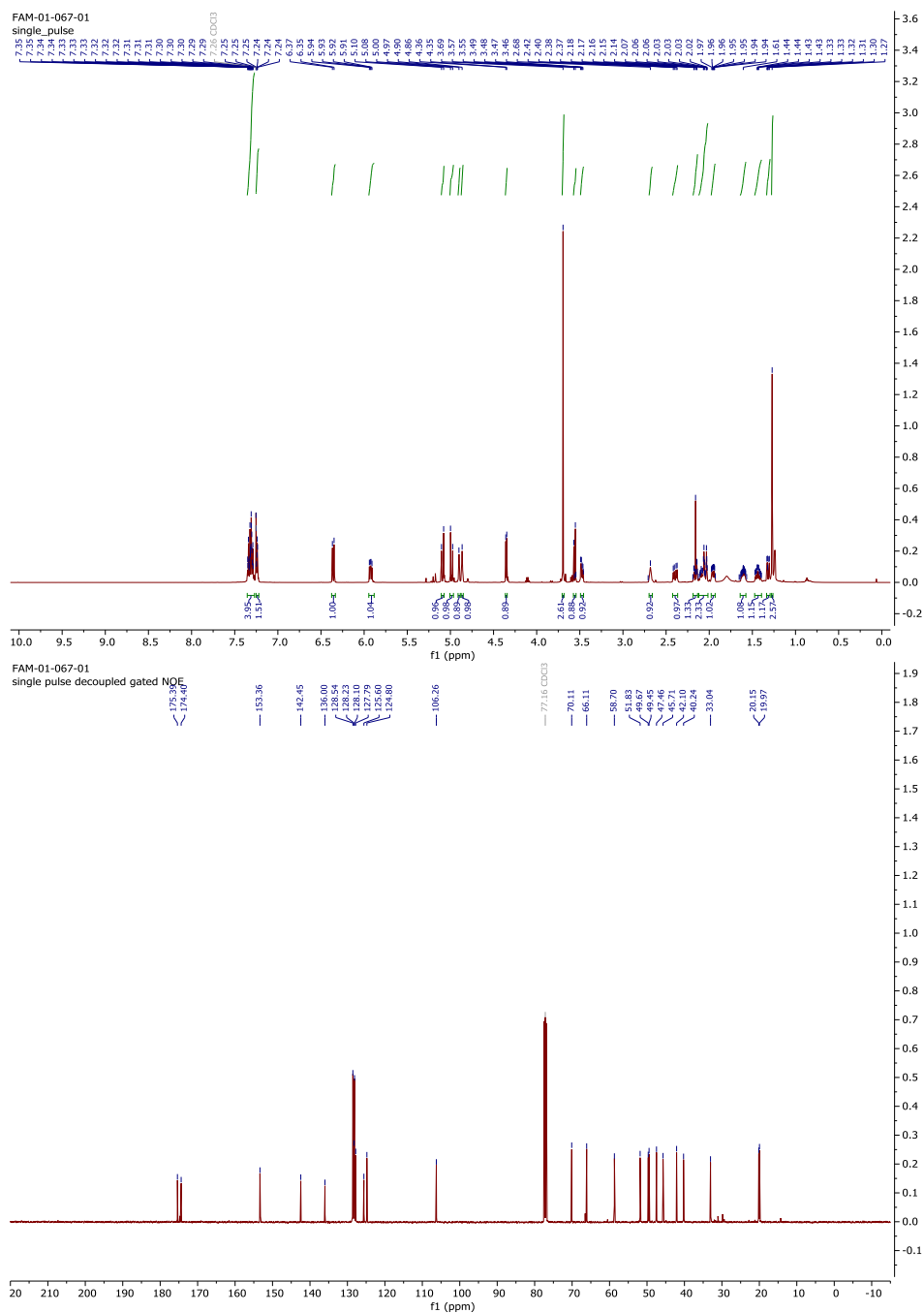
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 344,16 | B.t. | 136,5-137,4 °C |
| | R.t. | 18.3 min. |
| | α_D^{22} | +7,9° (c 1,79; CH ₃ OH); |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 345 [M+H] ⁺ , 367 [M+Na] ⁺ |



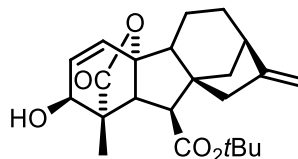
1-benzyl 10-methyl (1S,2S,7R,9aS,10S,10aS)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dikarboxylát (26)



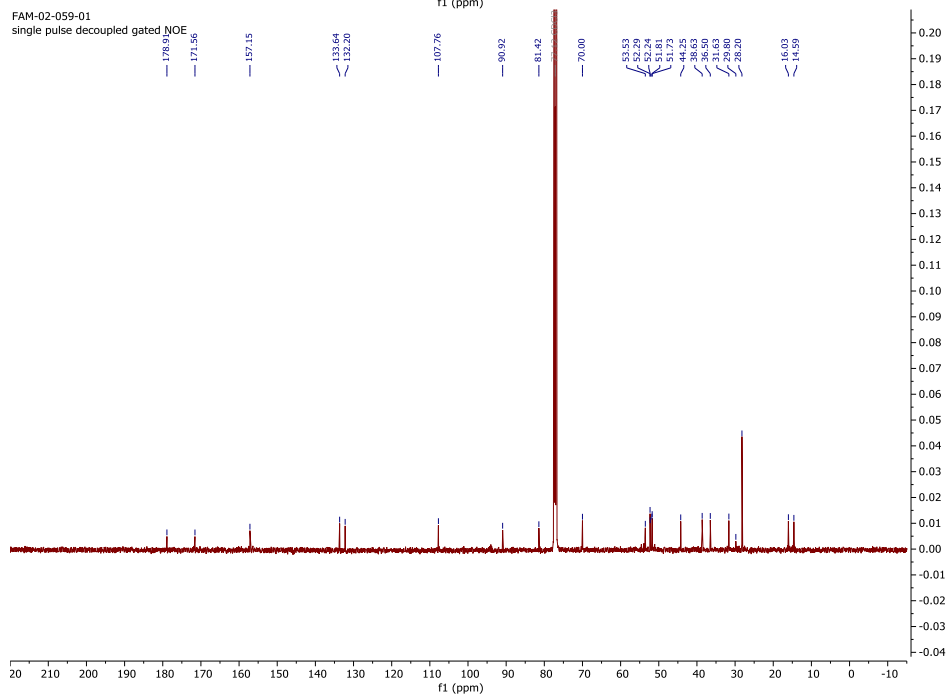
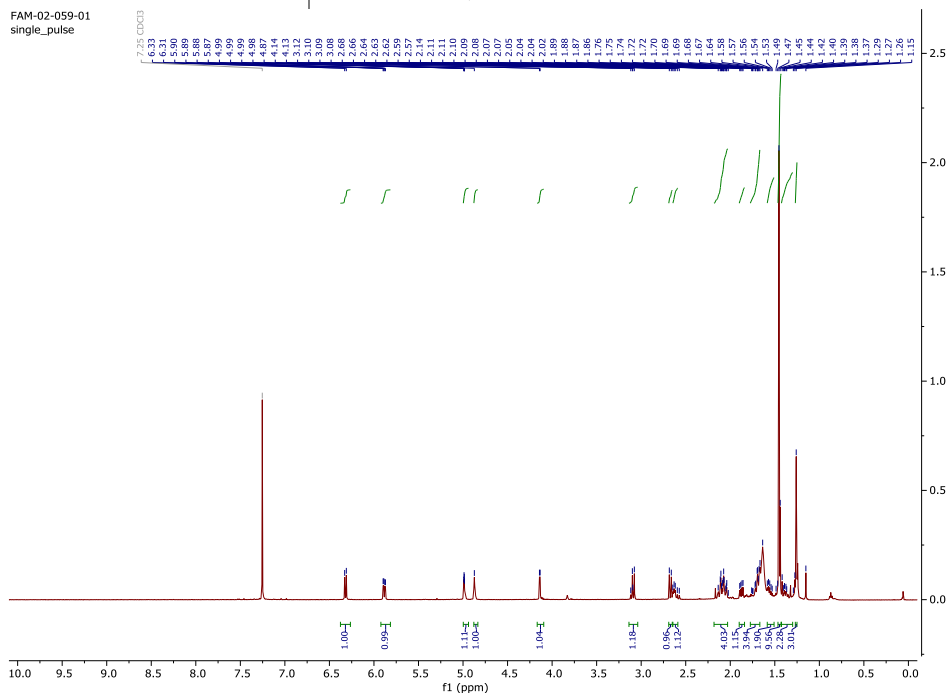
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| MW: 434,21 | B.t. | 129,2-130,4 °C |
| | R.t. | 20.8 min. |
| | α^2_2 | -30,9° (c 1,09; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 435 [M+H] ⁺ |



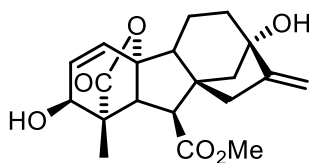
tert-butyl (1S,2S,4aR,7R,9aR,10S)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulen-10-karboxylát (27)



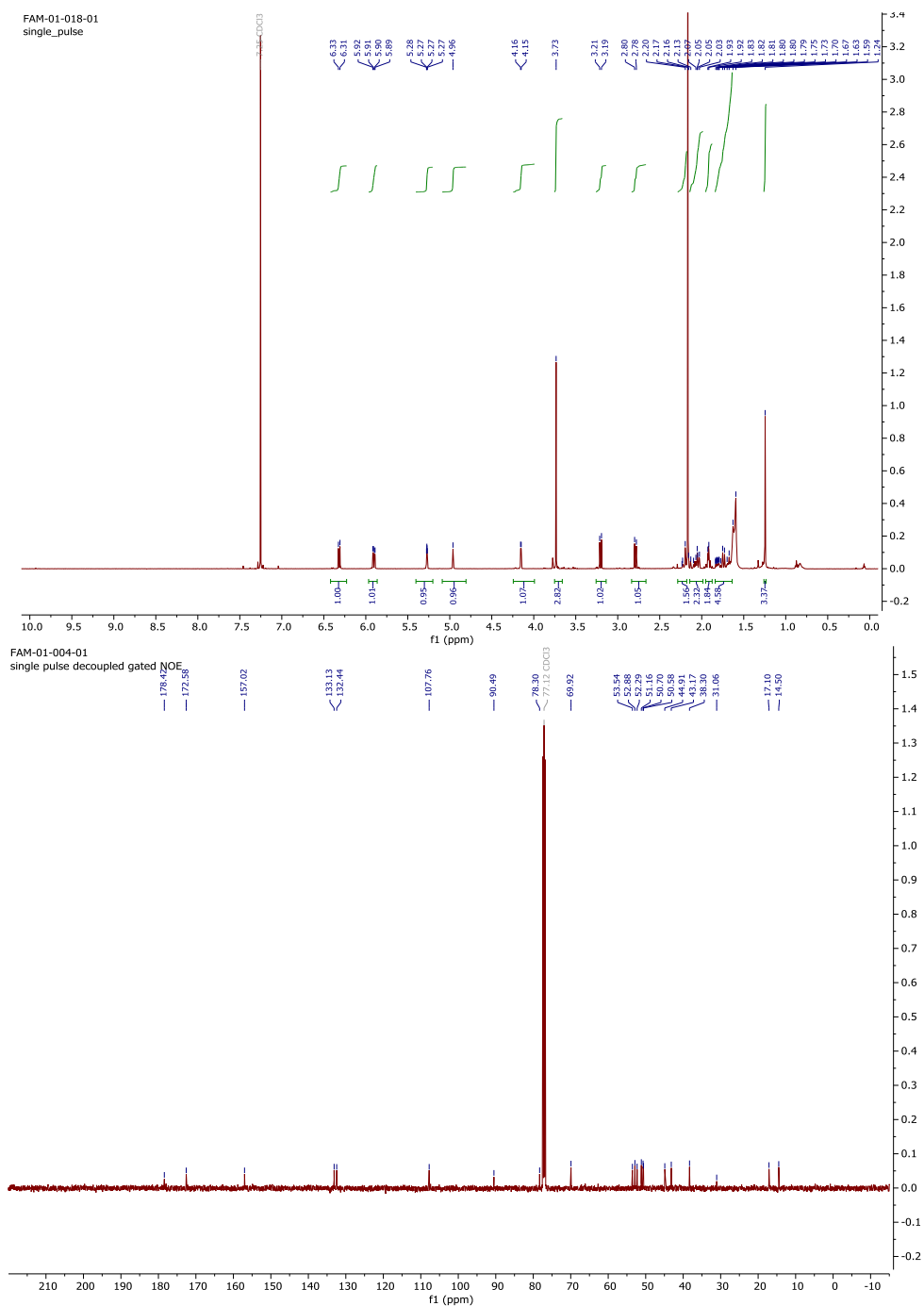
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| MW: 386,49 | B. t. | 162,2-164,1 °C |
| | R.t. | 21.47 min. |
| | α_D^{23} | +1,8° (c 1,09; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 387,5 [M+H] ⁺ |



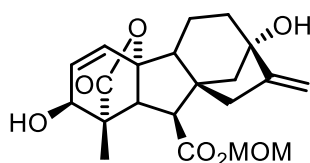
Methyl (1S,2S,4aR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzof[a]azulen-10-karboxylát (28)



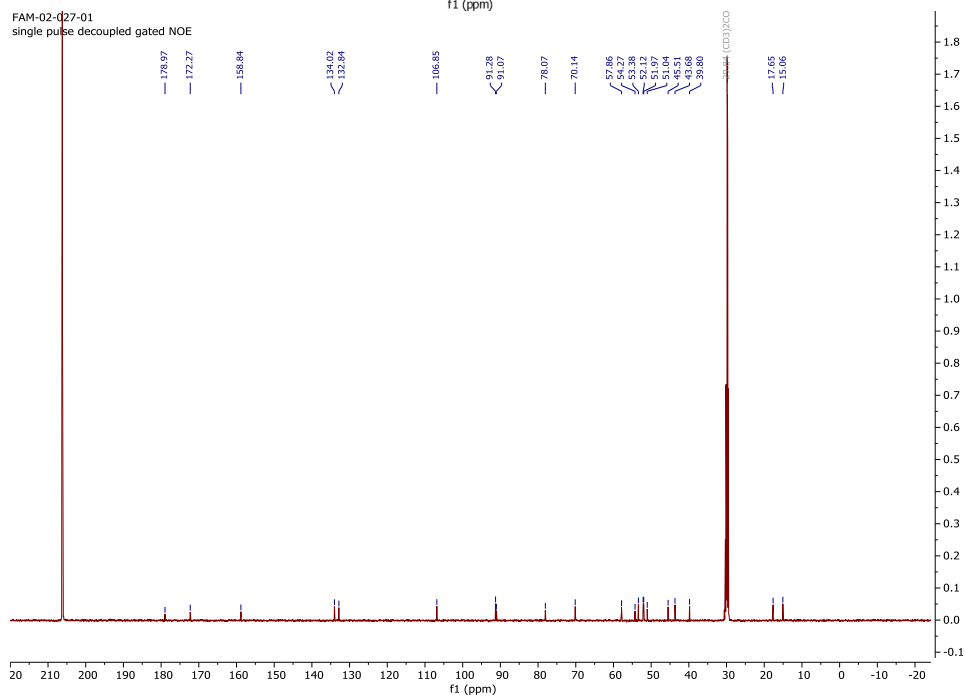
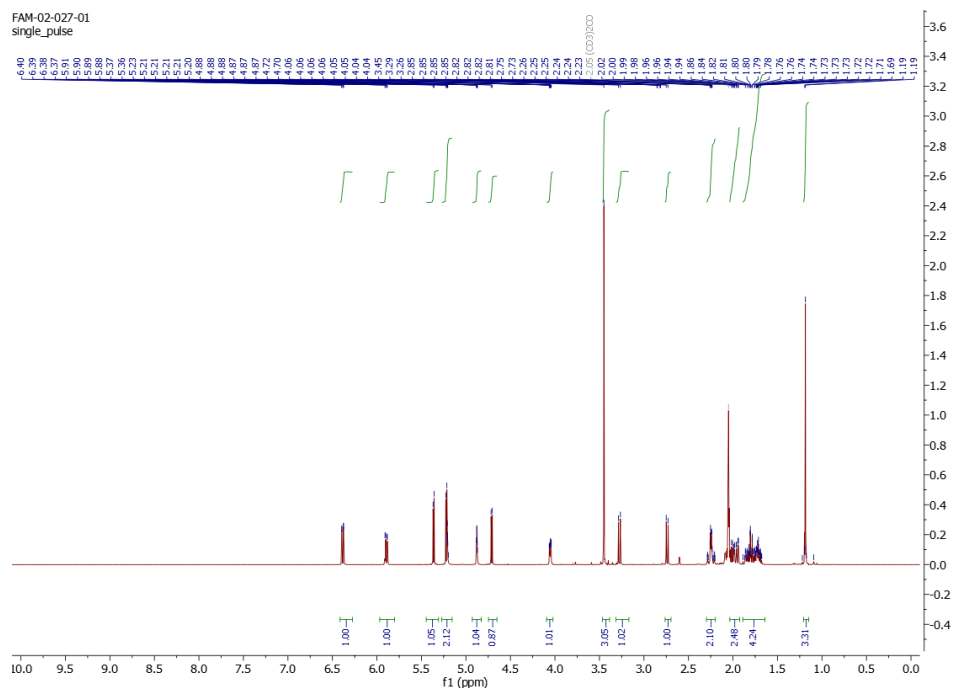
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 360,41 | B. t. | 195-196,5 °C |
| | R.t. | 14,06 min |
| | α^2_3 α^2_3 | 53,2° (c 1,62; CH ₃ OH); |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 378 [M+NH ₄] ⁺ , 399 [M+K] ⁺ |



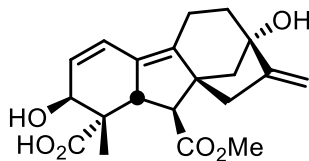
Methoxymethyl (1S,2S,4aR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulen-10-karboxylát (29)



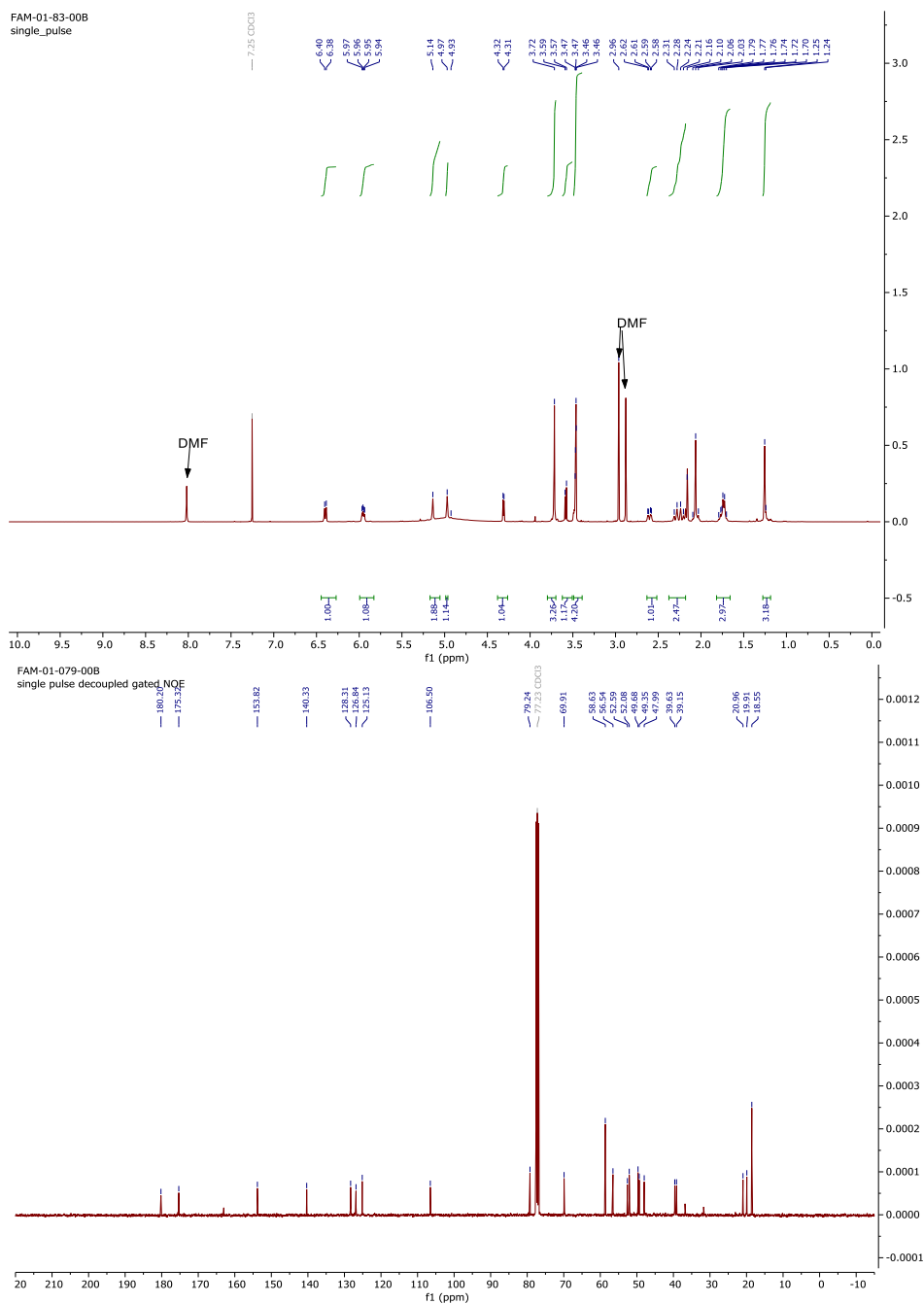
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| MW: 390,43 | B. t. | 159,6-160,6 °C |
| | R.t. | 14.72 min |
| | α_D^{23} | +53,2° (c 1,62; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 429 [M+K] ⁺ |



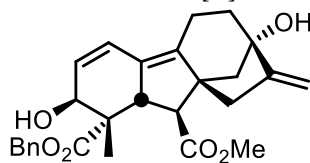
(1*S*,2*S*,7*S*,9*aR*,10*S*,10*aS*)-2,7-dihydroxy-10-(methoxykarbonyl)-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10*a*-oktahydro-1*H*-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-1-karboxylová kyselina (**30**)



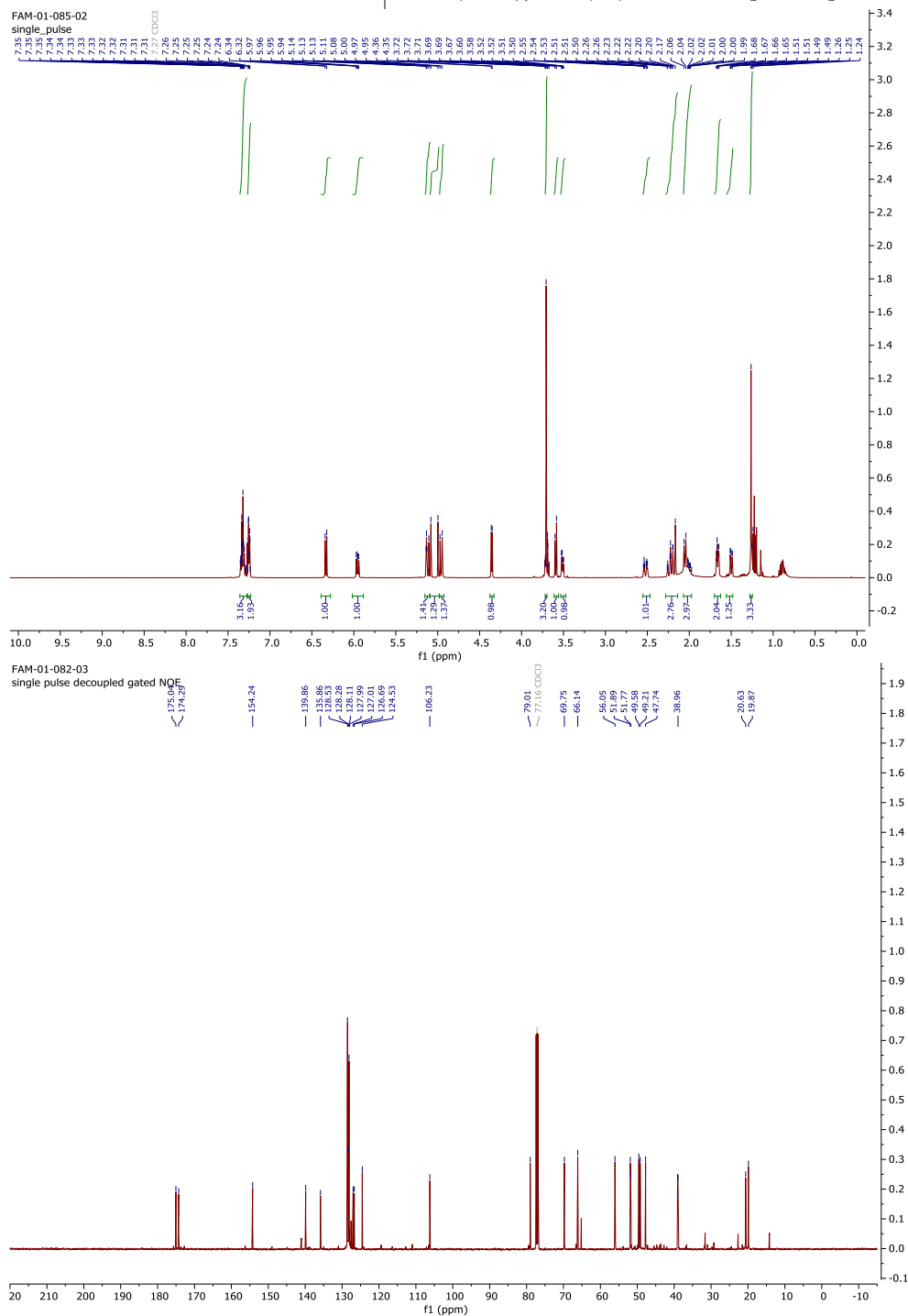
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|---|
| MW: 360,16 | B. t. | 126,6-127,9 °C |
| | R.t. | 13.26 min |
| | α_D^{24} | -50,5° (c 1,30; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 361 [M+H] ⁺ , 383 [M+Na] ⁺ , 399 [M+K] ⁺ |



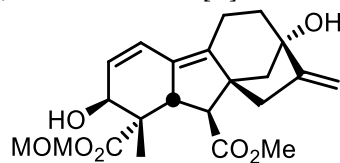
1-benzyl 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (31)



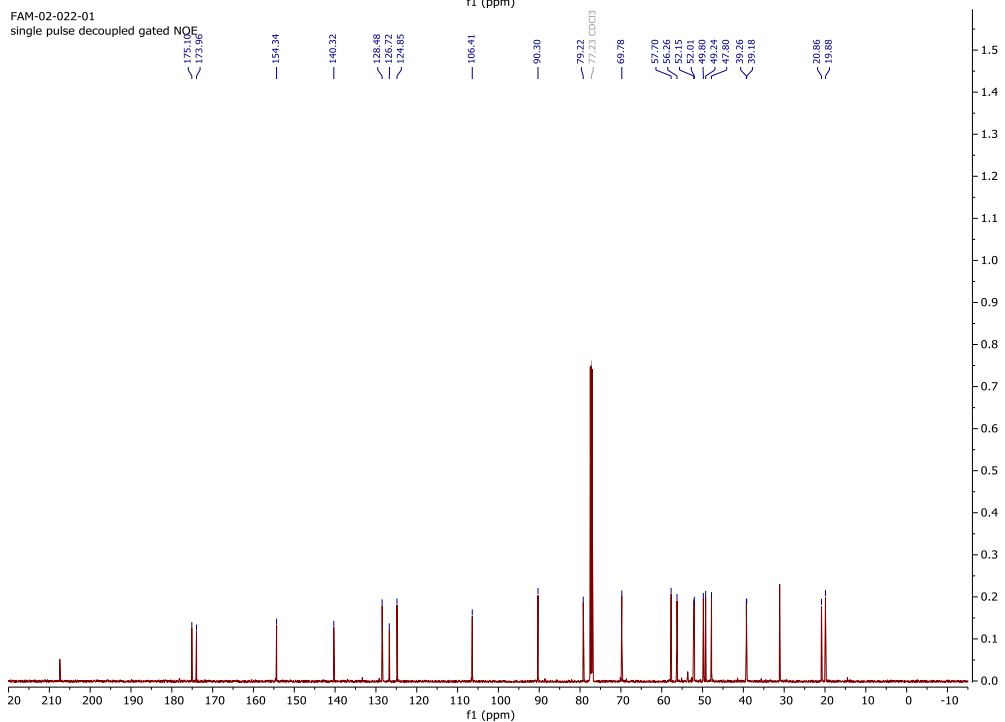
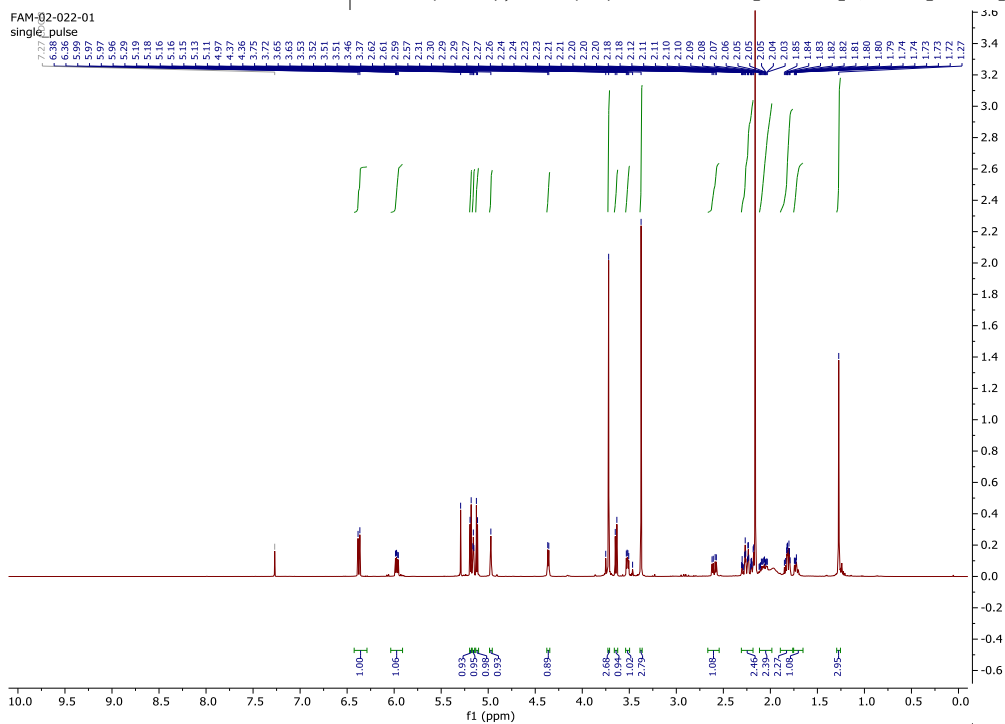
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 450,20 | B. t. | 124-124,5 °C |
| | R.t. | 20.59 min |
| | α_D^{24} | -24,8° (c 1,9; CH ₃ OH). |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 473 [M+Na] ⁺ , 489 [M+K] ⁺ |



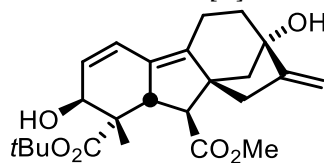
1-(methoxymethyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanbenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (32)



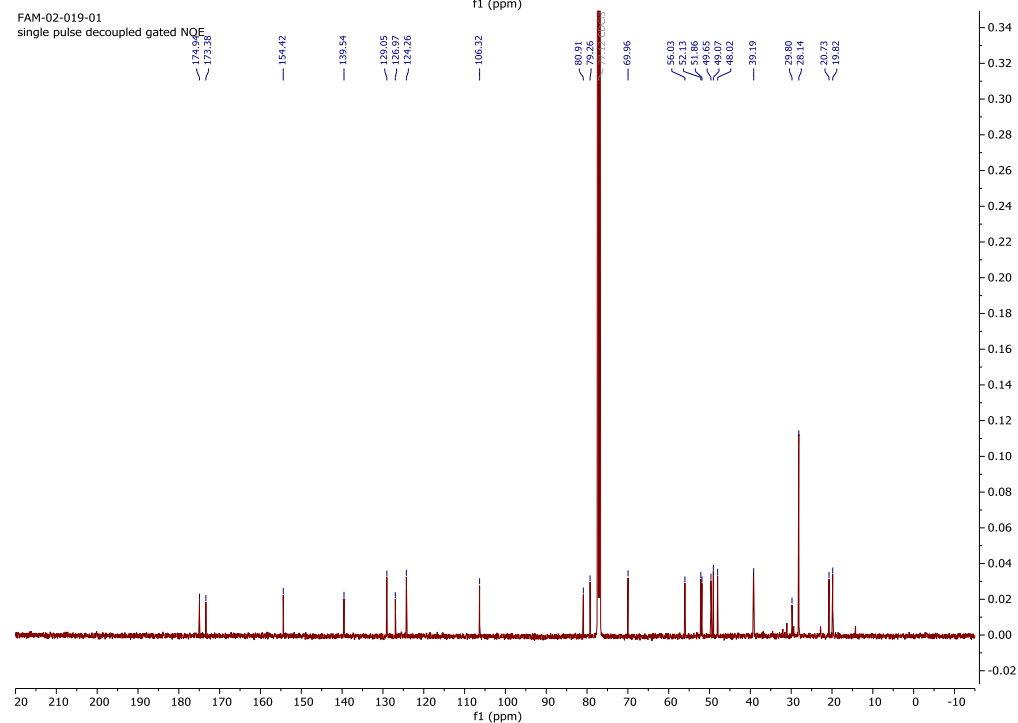
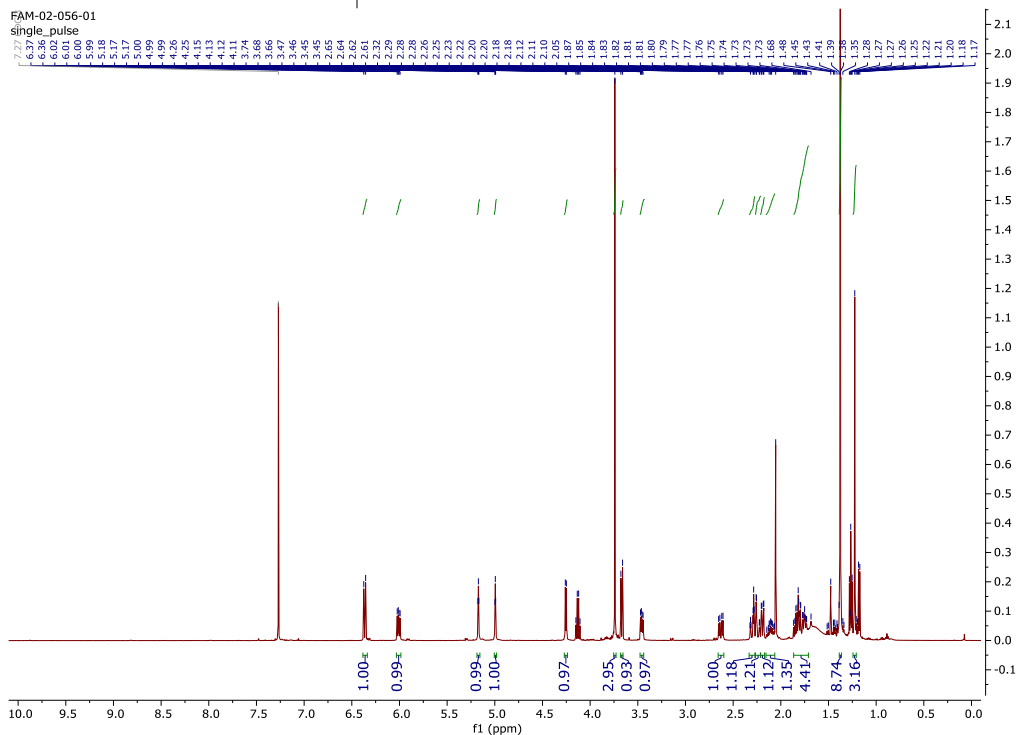
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 404,18 | B. t. | 136-137,9 °C |
| | R.t. | 15.76 min |
| | α_D^{24} | -83,5° (c 1,49; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 427 [M+Na] ⁺ , 443 [M+K] ⁺ |



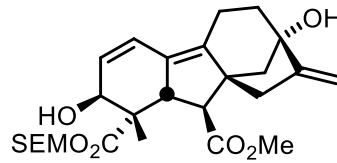
1-(tert-butyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylát (33)



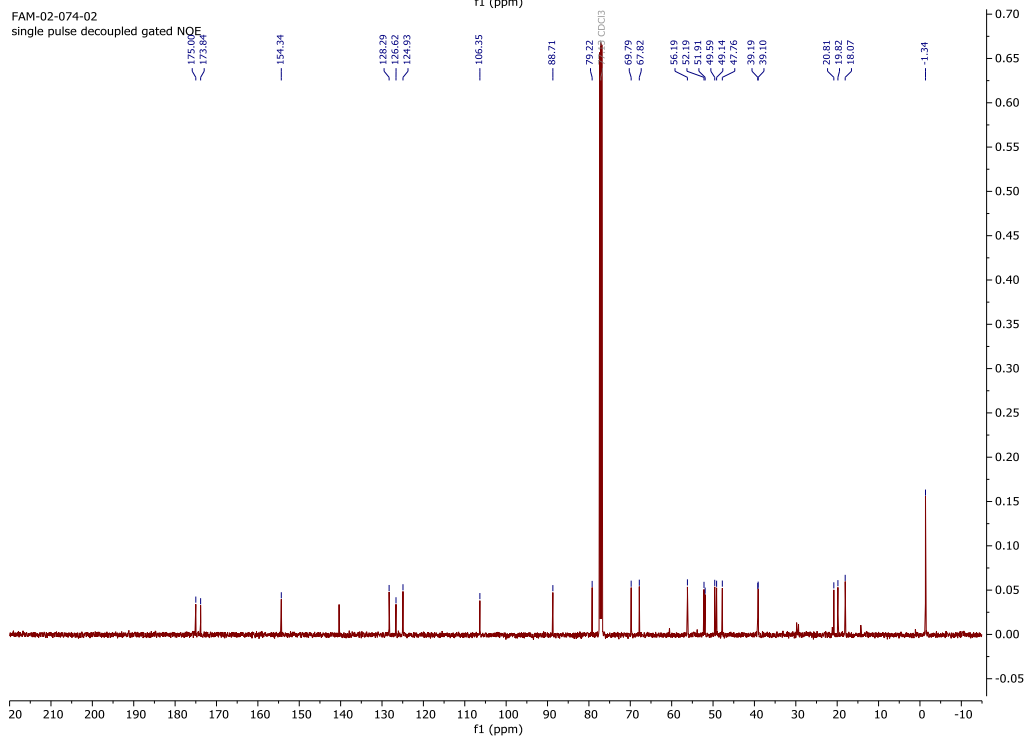
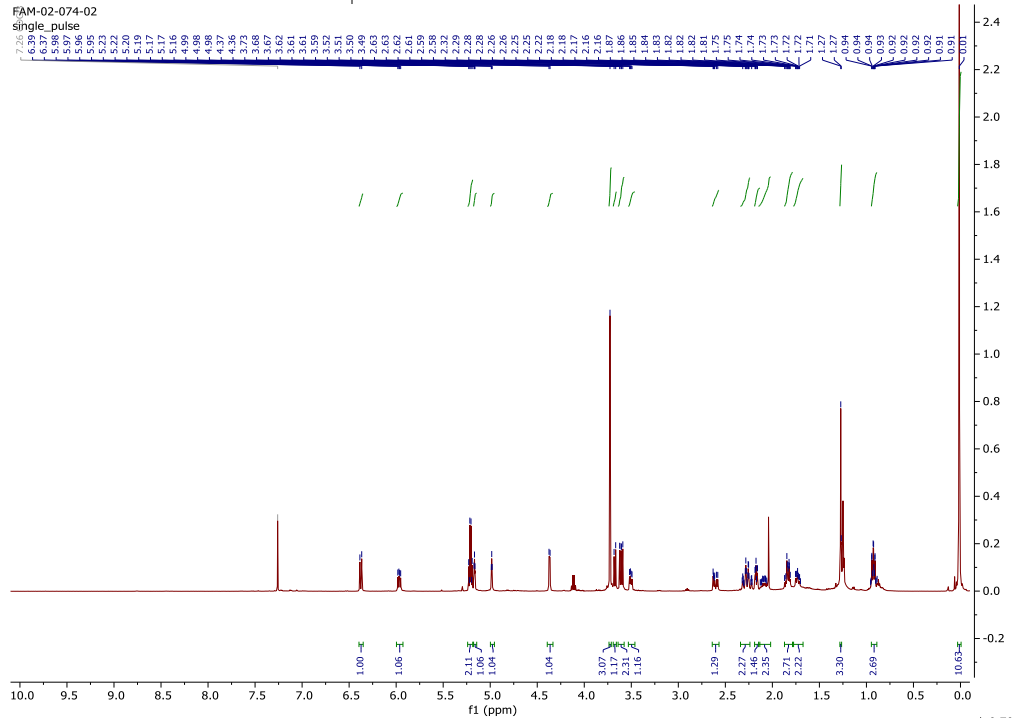
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 416,22 | B. t. | 190,2-190,5 °C |
| | R.t. | 19.53 min |
| | α_D^{24} | -2,2° (c 1,29; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 437 [M+Na] ⁺ , 455 [M+K] ⁺ |



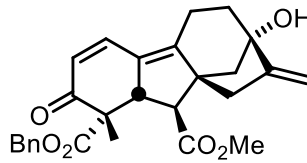
10-methyl 1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl) (1*S*,2*S*,7*S*,9*aR*,10*S*,10*aS*)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,5,6,7,8,9,10,10*a*-oktahydro-1*H*-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulen-1,10-dikarboxylát (**34**)



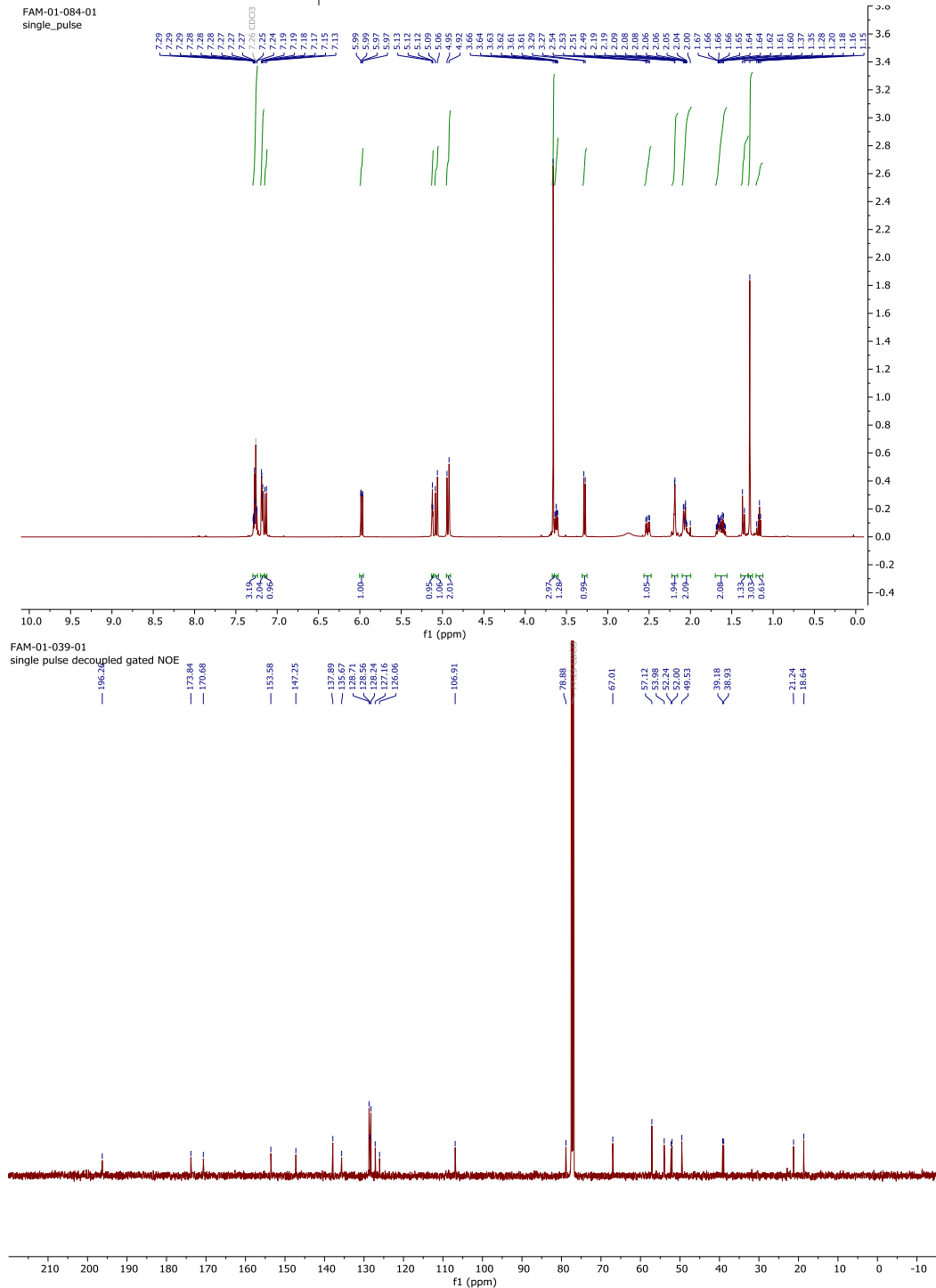
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 490,24 | B. t. | - |
| | R.t. | 26.31 min |
| | α_D^{23} | -8,4° (c 1,39; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 513 [M+Na] ⁺ , 529 [M+K] ⁺ |



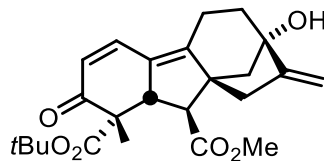
1-benzyl 10-methyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylen-2-oxo-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (35)



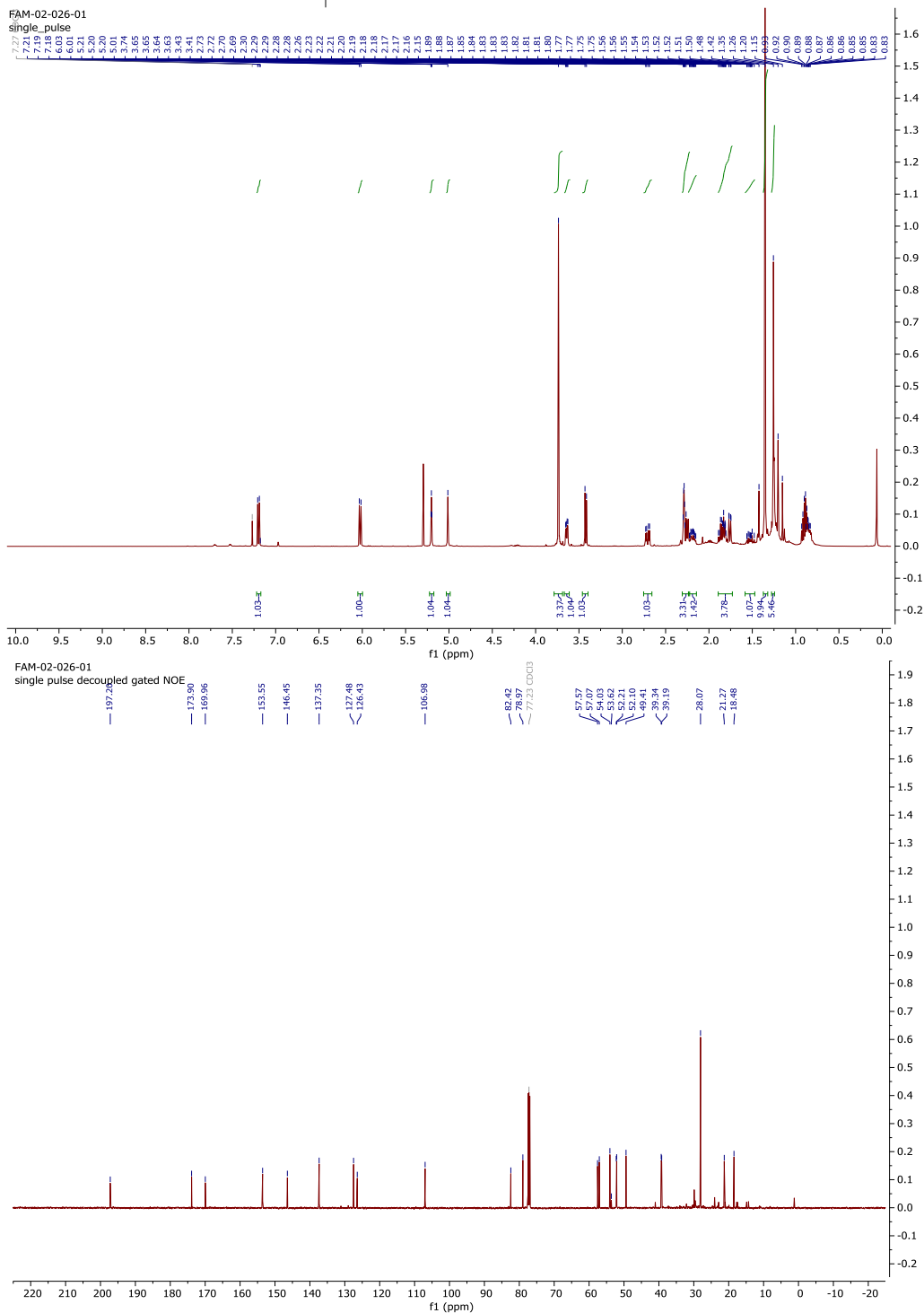
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| MW: 448,19 | B. t. | 125-125,9 °C |
| | R.t. | 22.79 min |
| | α_D^{22} | - 92,9° (c 1,69, CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 471 [M+Na] ⁺ , 487 [M+K] ⁺ |



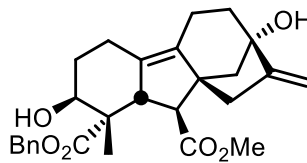
1-benzyl 10-methyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylen-2-oxo-2,5,6,7,8,9,10,10a-oktahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (36)



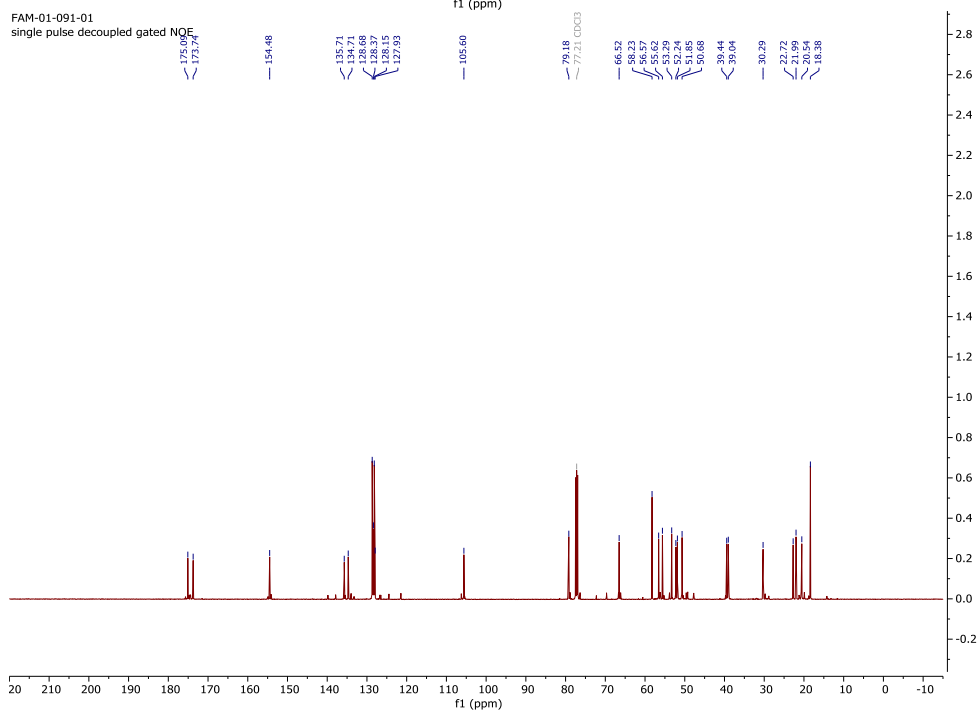
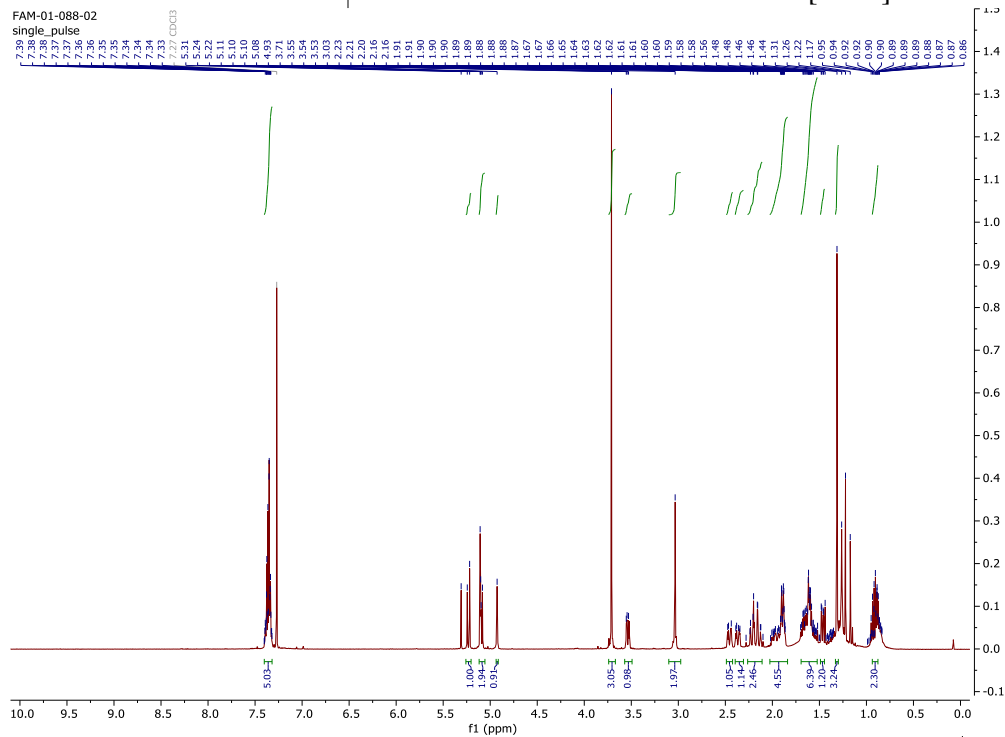
| | | |
|--------------------|-------------------------------------|---|
| MW: 4414,20 | B. t. | 144,6-145,0 °C |
| | R.t. | 20.42 min. |
| | α_D^{22} | +47,9° (c 1,1; CH ₃ OH) |
| | MS (ES⁺), m/z (%) | 415 [M+H] ⁺ , 453 [M+K] ⁺ |



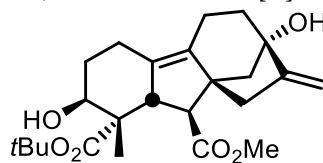
1-benzyl 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,3,4,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (37)



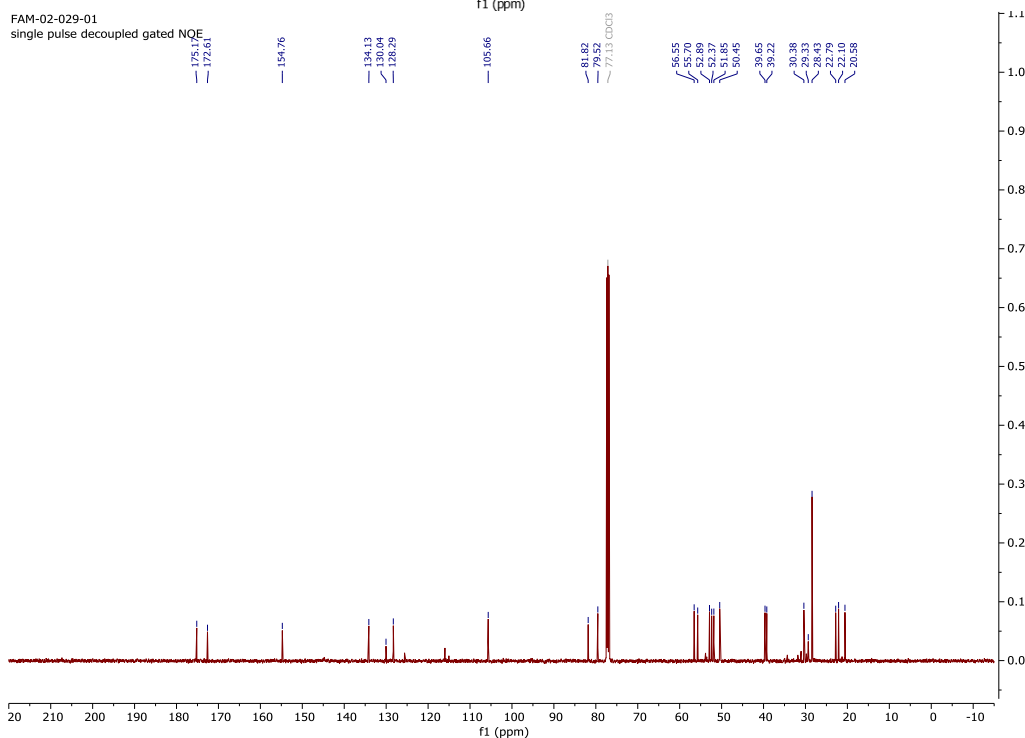
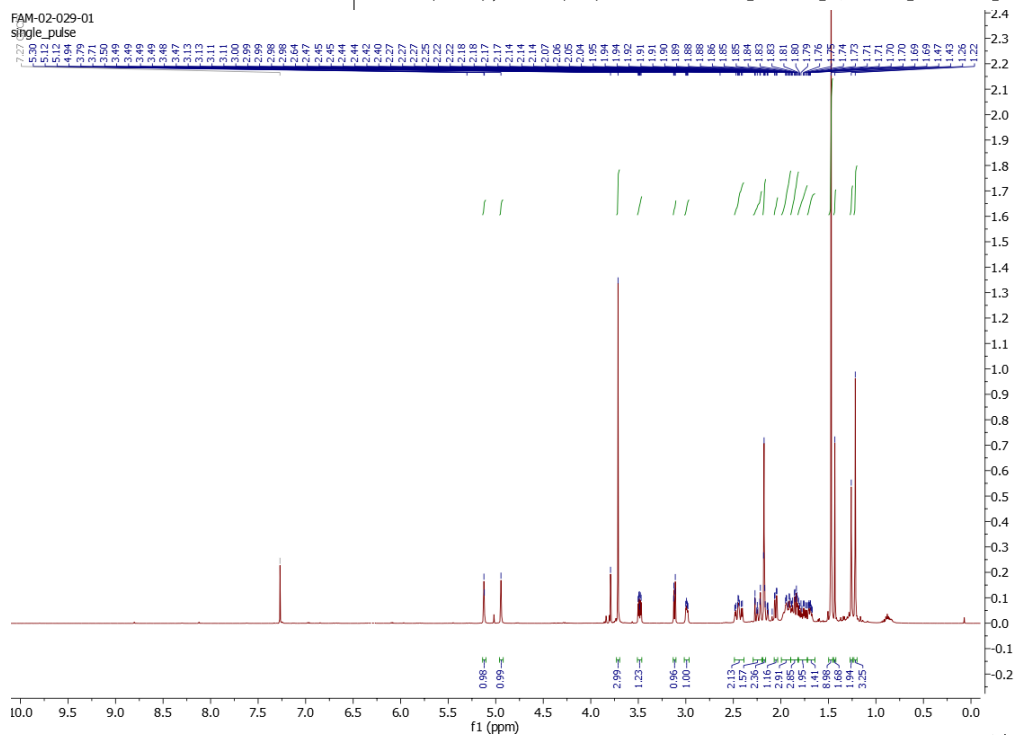
| | | |
|-------------------|--------------------------------------|---|
| MW: 452,22 | B. t. | 121-121,9 °C |
| | R.t. | 20.09 min |
| | α_D^{22} | -81,9° (c 1,91; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 453 [M+H] ⁺ , 475 [M+Na] ⁺ , 491 [M+K] ⁺ |



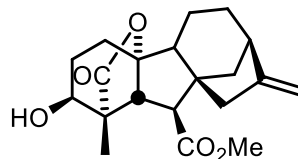
1-(tert-butyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-2,3,4,5,6,7,8,9,10,10a-dekahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulen-1,10-dikarboxylát (38)



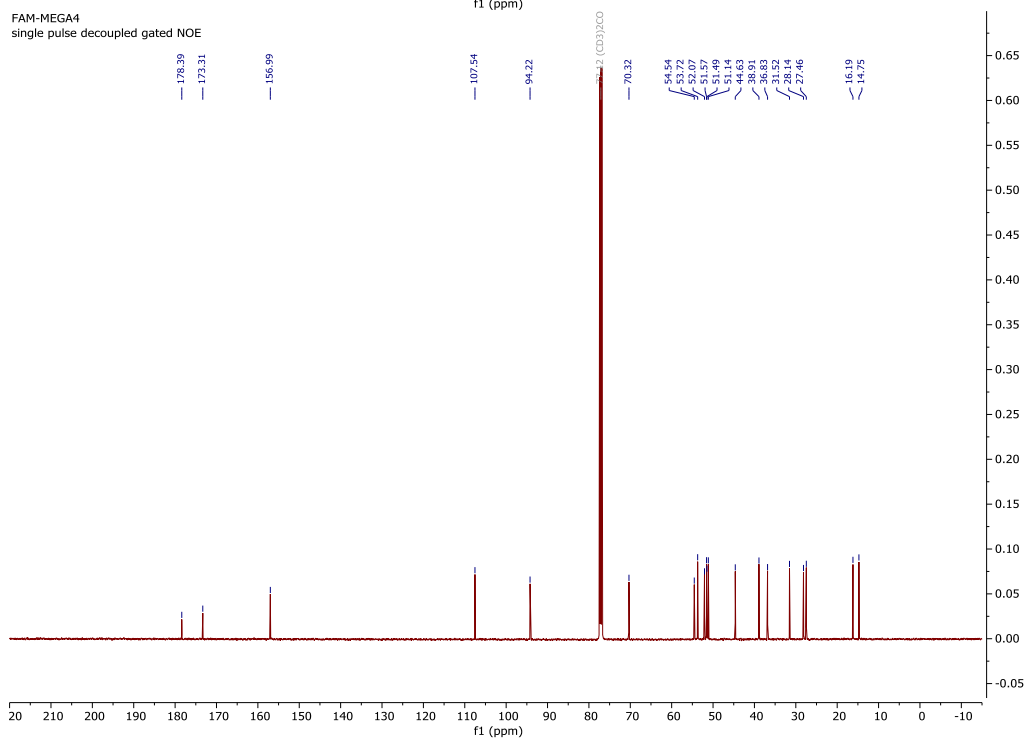
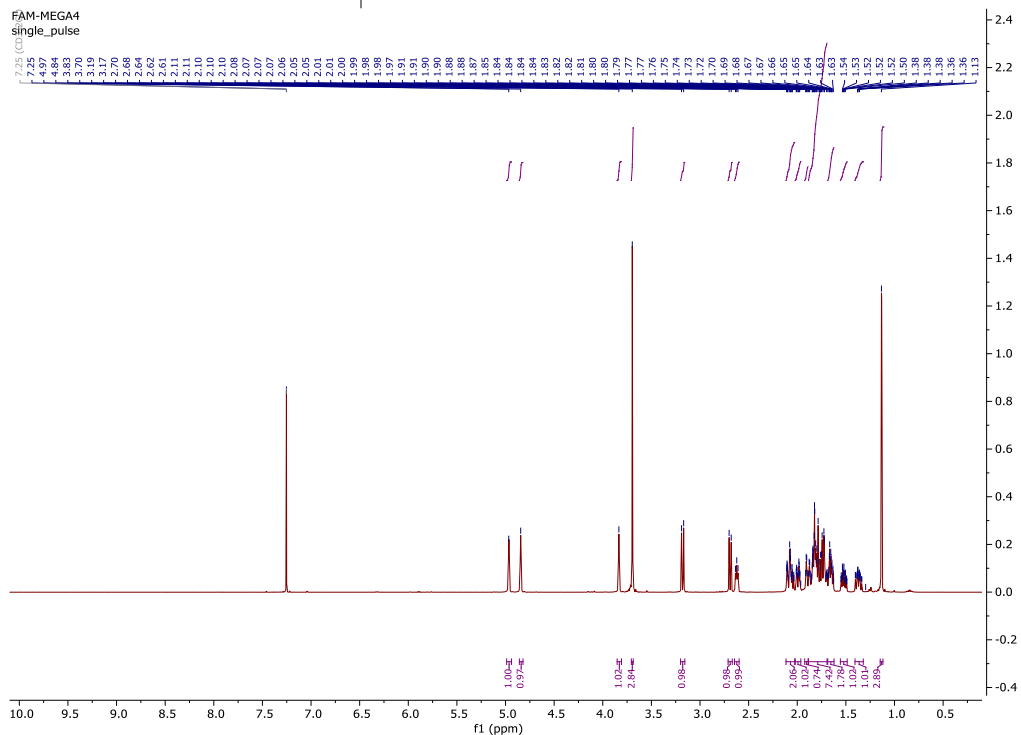
| | | |
|-------------------|-------------------------------------|--|
| MW: 418,53 | B. t. | 187,7–189,1 °C |
| | R.t. | 20.42 min |
| | α_D^{22} | – 4,1° (c 1,32; CH ₃ OH) |
| | MS (ES⁺), m/z (%) | 419 [M+H] ⁺ , 441 [M+Na] ⁺ |



Methyl (1S,2S,4aR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylen-13-oxododekahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulen-10-karboxylát (39)



| | | |
|-------------------|--------------------------------------|---|
| MW: 346,42 | B. t. | 170,5 °C-172,1 °C |
| | R.t. | 22.94 min. |
| | α_D^{22} | - 14,1° (c 1,02; CH ₃ OH) |
| | MS (ESI⁺), m/z (%) | 347 [M+H] ⁺ , 385 [M+K] ⁺ |



**9 Příloha č. 2: Mapa provedených syntéz vycházející
z giberelinu A₃**

Syntéza vycházející z GA₃

