

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Syntéza biokonjugátů odvozených od giberelinů A<sub>3</sub> a A<sub>4</sub>**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: Filip Cheníček

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jiří Pospíšil

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D., a že jsem použil parametrů, které cituji v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne: .....

.....

Filip Cheníček

## **Poděkování**

Upřímné poděkování bych rád věnoval vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovy, Ph.D. Jsem vděčný za jeho trpělivost, ochotu a za cenné rady týkající se praktické tak i teoretické stránky. Dále mé poděkování náleží i skvělému kolektivu ve výzkumné skupině doc.Pospíšila a pracovníkům na Katedře organické chemie za podporu a pomoc při výkonu práce.

Na závěr bych poděkoval za finanční podporu Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA\_PrF\_2022\_022).

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Filip Cheníček
Název práce	Syntéza biokonjugátů odvozených od giberelinů A <sub>3</sub> a A <sub>4</sub>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra organické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Práce se zabývá vývinem metody pro přípravu cukerných a aminokyselinových konjugátů giberelinů A <sub>3</sub> a A <sub>4</sub> . Teoretická část zahrnuje informace o struktuře a biosyntéze giberelinů a včetně známých biokonjugátů a jejich chemických a fyzikálních vlastností. Experimentální část je poté zaměřena na syntézu vybraných cukerných a aminokyselinových biokonjugátů odvozených od giberelinů A <sub>3</sub> a A <sub>4</sub> .
Klíčová slova	Fytohormony, gibereliny, glukopyranosa, kyselina giberelová, cukerné konjugáty, aminokyselinové biokonjugáty.
Počet stran	73
Počet stran příloh	21
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname Filip Cheníček

Title of thesis	Synthesis of bioconjugates derived from gibberellins A <sub>3</sub> and A <sub>4</sub>
Type of thesis	Bachelor
Department	The Department of Organic Chemistry
Supervisor	Assoc. Prof. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	Development of novel synthetic methods for the preparation of sugar and amino acid conjugates of gibberellin A <sub>3</sub> and A <sub>4</sub> is pursued within this work. The theoretical part includes information about the structure and biosynthesis of gibberellins. It also includes the informations about known bioconjugates and their chemical and physical properties. The experimental part focus on the synthesis of selected sugar and amino acid bioconjugates derived from gibberellins A <sub>3</sub> and A <sub>4</sub> .
Keywords	Phytohormones, gibberellines, glucopyranose, giberelic acid, sugar conjugates, aminoacid bioconjugates.
Number of pages	73
Number of appendix pages	21
Number of appendices	1
Language	Czech

---

# Obsah

Seznam zkratk.....	1
Seznam obrázků.....	2
Seznam schémat.....	3
Úvod.....	4
Předešlé studie a cíle práce.....	5
1    Cíle práce.....	6
Teoretická část.....	7
2    Role fytohormonů v rostlinném systému.....	7
2.1    Auxin jako generální koordinátor růstu.....	8
3    Gibereliny.....	9
3.1    Produkce kyseliny giberelové–giberelinu A <sub>3</sub> .....	10
3.2    Struktura.....	11
3.2.1    Struktura bioaktivních GA.....	12
3.2.2    Struktura cukerných konjugátů.....	12
3.2.3    Struktura aminokyselinových konjugátů.....	13
3.3    Bioaktivita a mechanismus účinku.....	13
3.3.1    Mechanismus účinku.....	14
3.4    Biosyntéza GA.....	15
3.4.1    Od MEP po ent–kauren.....	15
3.4.2    První giberelin.....	16
3.4.3    Pár kroků k bioaktivitě.....	16
3.5    Regulace bioaktivity GA.....	17
3.5.1    Volba mezi GA <sub>1</sub> a GA <sub>4</sub> .....	17
3.5.2    Inaktivace bioaktivních GA prostřednictvím GA 2–oxidázy.....	17
3.5.3    Epoxidace GA <sub>4</sub> v poloze C 16 a C17.....	18
3.5.4    Regulace GA v závislosti na koncentraci auxinů.....	19
3.5.5    Vznik konjugátů GA jako prostředek deaktivace.....	19
3.6    Cukerné konjugáty GA.....	20
3.6.1    Cukerné konjugáty v roli transportní jednotky.....	20
3.6.2    Biosyntéza a hydrolýza GA cukerných konjugátů.....	21

3.6.3	Purifikace a separace gibberelinových konjugátů z rostlinného extraktu.....	22
3.6.4	Syntéza cukerných a aminokyselinových konjugátů .....	23
	Experimentální část.....	25
4	Úvod do experimentální části .....	25
5	Organická syntéza.....	25
5.1	Seznam použitých chemikálií, rozpouštědel a vizualizačních činidel.....	26
5.2	Použité metody, postupy a materiály .....	28
5.2.1	Organická syntéza .....	28
5.2.2	Analytické metody .....	28
5.3	Postup organické syntézy cukerných konjugátů .....	31
5.3.1	Acetylace kyseliny gibberelové–vznik látky I .....	32
5.3.2	Glykosylace acetylované kyseliny gibberelové–vznik látky II .....	33
5.3.3	Deacetylace chráněného GA <sub>3</sub> β-D-glucopyranosyl esteru pomocí CH <sub>3</sub> ONa/NaOH v metanolu–příprava látky III .....	34
5.4	Postup organické syntézy aminokyselinových konjugátů .....	35
5.4.1	Ochránění aminokyseliny pomocí Di–tert–butyl dikarbonátu .....	36
5.4.2	Ochránění Boc-aminokyselin IV-VII pomocí benzylbromidu. Příprava dichráněných aminokyselin VIII-XI .....	38
5.4.3	Odchránění protektivní skupiny Boc z atomu dusíku derivátů VIII-XI.....	40
5.4.4	Tvorba peptidu – reakce aminoesterů s GA <sub>4</sub> .....	42
5.4.5	Odchránění benzylové skupiny .....	46
	Výsledky .....	47
6	Organická syntéza cukerných a aminokyselinových konjugátů gibberelinů A <sub>3</sub> a A <sub>4</sub> .....	47
6.1	Syntéza GA <sub>3</sub> glukopyranosyl esteru .....	47
6.2	Syntéza GA <sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů.....	50
	Diskuze .....	54
7	Organická syntéza.....	54
7.1	Syntéza GA <sub>3</sub> glukopyranosyl esteru .....	55
7.2	Syntéza GA <sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů .....	57
	Závěr .....	62
	Seznam použité literatury .....	63
	Přílohy .....	67

---

# Seznam zkratek

Auxin-releated F—Box (AFB) .....	8
Cytokininy (CK) .....	7
Dimethylallyldifosfát (DMADP) .....	15
Elongeted uppermost internode (EUI) .....	18
Endoplasmatické retikulum (ER) .....	15
Geranylgeranyldifosfát (GGDP) .....	15
Geranylgeranyldifosfát syntáasa (GGDPS).....	15
Gibberellin intensive dwarf 1 (GID1).....	14
Gibereliny (GA).....	5
Isopentenylidifosfát (IDP) .....	15
Isopentenylidifosfát isomeráasa (IDI) .....	15
Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC—MS).....	20
Kauren oxidáasa (KO).....	16
Kauren syntáasa (KS).....	15
Kopalyldifosfát (CDP) .....	15
Kopalyldifosfát syntáasa (CDPS) .....	15
Kyselina abcisová (ABA).....	7
Kyselina indol-3-octová (IAA).....	8
Kyselina salicylová (SA) .....	7
Methylerythritolfosfátová dráha (MEP) .....	15
Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC—MS).....	20
Skp, Cullin, F—box komplex (SCF).....	14
Transport inhibitor response 1 (TIR1).....	8
Uridindifosfát (UDP).....	21



---

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Hlavní dráha pro regulaci transkripce .....	8
Obrázek 2: Produkce GA <sub>3</sub> .....	10
Obrázek 3: Popis skeletu C-19 a C-20 giberelinů.....	11
Obrázek 4: Struktury GA <sub>1</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>3</sub> a GA <sub>7</sub> .....	12
Obrázek 5: GA <sub>3</sub> β-D-glukopyranosyl ester a GA <sub>3</sub> β-D-glukopyranosyl ether .....	12
Obrázek 6: Struktura GA <sub>4</sub> -Alanin a struktura GA <sub>4</sub> -Tyrosin.....	13
Obrázek 7: Mechanismus bioaktivních GA.....	14

---

## Seznam schémat

Schéma 1: Epoxidace GA <sub>12</sub> .....	18
Schéma 2: Glukosylace GA <sub>3</sub> pomocí glukosyltransferázy .....	21
Schéma 3: Syntéza konstitučně isomerních GA <sub>8</sub> -O-β-D-glukopyranosyl ether konjugát .....	23
Schéma 4: Syntéza aminokyselinových konjugátů .....	24
Schéma 5: Postup organické syntézy cukerných konjugátů (experimentální část) .....	31
Schéma 6: Postup organické syntézy aminokyselinových konjugátů (experimentální část) .....	35
Schéma 7: Acetylace hydroxy skupin v poloze C3 a C13 (experimentální část) .....	47
Schéma 8: Glykosylace (experimentální část) .....	48
Schéma 9: Odchránění acetátových skupin (experimentální část) .....	48
Schéma 10: Přehled získaných zásadních molekul (experimentální část) .....	49
Schéma 11: Ochránění aminoskupiny pomocí Boc <sub>2</sub> O (experimentální část) .....	50
Schéma 12: Ochránění karboxylové skupiny s pomocí benzylobromidu (experimentální část) ...	51
Schéma 13: Deprotekce boc skupiny (experimentální část) .....	51
Schéma 14: Kaplingová reakce (experimentální část) .....	52
Schéma 15: Hydrogenace (experimentální část) .....	52
Schéma 16: Přehled zásadních získaných molekul (experimentální část) .....	53
Schéma 17: Methoxid sodný (experimentální část) .....	55
Schéma 18: Deacetylace (experimentální část) .....	56
Schéma 19: Esterifikace aminokyselin (experimentální část) .....	57
Schéma 20: Kaplingová reakce–vznik produktu, intermediátu a GA <sub>4</sub> benzylolesteru (experimentální část) .....	58
Schéma 21: Kaplingová reakce GA <sub>4</sub> a L-Prolin (experimentální část) .....	59
Schéma 22: Kaplingová reakce pomocí EDC (experimentální část) .....	60
Schéma 23: Reakce s FeCl <sub>3</sub> (experimentální část) .....	61

---

# Úvod

Mezi známé fytohormony řadíme skupinku látek s názvem gibereliny (GA). Gibereliny jsou diterpenoidní přírodní látky vyskytující se v říši rostlin, hub a mikroorganismů. Jak bylo postupem času zjištěno, hrají velmi důležitou roli při vývoji daného organismu, kontrolují aspekty růstu, jako je prodlužování stonků, větvení listů a klíčení semen. Tyto poznatky nám ukazují, že se jedná o jedny z klíčových rostlinných regulátorů růstu.<sup>1</sup>

Historie výzkumu GA zasahuje až do 19. století, kdy v roce 1828 byla objevena nemoc rýžových sazenic, která způsobovala nadměrné prodlužování stonku. Následkem toho se stala nemoc středem pozornosti a posléze bylo zjištěno, že nemoc sazenic je způsobena houbou *Gibberella fujikuroi*. Doposud se tento druh houby využívá k masivní průmyslové výrobě kyseliny giberelové a to pomocí procesu fermentace.<sup>2</sup>

Objeveno bylo již přes 136 giberelinů, ale pouze malá část z těchto látek je v rostlinách biologicky aktivní. Mezi hlavní zástupce se řadí GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub>. S pokrokem molekulární genetiky a díky nedávným studiím biosyntézy, metabolismu, transportu, signalizace GA a vztahem mezi jinými rostlinnými hormony se dosáhlo velkého porozumění mechanismu funkce. Gibereliny stimulují elongaci rostlinných buněk a bylo zjištěno, že ovlivňují pokles produkce proteinu DELLA, který patří mezi skupinu represorů růstu rostliny.<sup>1,3</sup>

---

## Předešlé studie a cíle práce

Jedním předmětů zkoumání v našem týmu je cílená syntéza konjugovaných giberelinů, které by pomohly více objasnit transportní děje spojené s těmito růstovými hormony v rostlinách. Předešlé a pokročilé práce na téma gibereliny ve skupině pod vedením doc. RNDr. Jiřího Pospíšila Ph.D. se např. již zaměřily na přípravu klíčových intermediátů vhodných k identifikaci struktury nově izolovaných giberelinů a na přípravu značených derivátů. Zveřejněných publikací a studií týkajících se fytohormonů je poměrně velké množství, ale stále se v této problematice najdou témata, která nejsou zcela objasněna. Konjugáty GA by mohli vynikat doposud neznámými vlastnostmi, a proto jsou úspěšně nasyntetizované látky testovány na biologickou aktivitu v rámci živočišných biologických systémech s cílem ohodnotit jejich potenciální vliv na živočišné buňky. Na základě předešlého zkoumání i mimo naši skupinu se dokonce předpokládá, že deriváty giberelinů mohou vykazovat protinádorovou aktivitu. Tato vlastnost byla hlavně pozorována u derivátů s obsahem  $\alpha$ - $\beta$  nenasycených ketonů.

Gibereliny se ve vyšších rostlinách vyskytují jak ve formě volných kyselin, tak i konjugátů. Nejběžnějšími izolovanými konjugáty jsou gibereliny, které jsou připojeny k cukrům konkrétně ke glukose. Cukerné konjugáty se dělí do dvou základních skupin. Mezi první skupinu můžeme zařadit glukosyl ethery GA, kde esterová vazba vzniká v místě hydroxy skupiny GA. Druhou skupinou by v tomto případě byly glukosyl estery, kde je glukosa připojena k GA přes 7-karboxylovou skupinu.<sup>4</sup> V současné době je toho o cukerných konjugátech GA známo velice málo, ale předpokládá se, že slouží jako jakýsi pomyslný rezervoár aktivního giberelinu, který může být rychle uvolněn v případě nutnosti.

Tato práce se člení do dvou částí, teoretická a experimentální. Teoretická část je zaměřena na literární rešerši a dává si za cíl shrnout dosavadní informace týkající se biosyntézy, biologické aktivity a možné role cukerných a aminokyselinových konjugátů v rostlinné říši. Experimentální část se věnuje syntéze cukerných a aminokyselinových konjugátů giberelinů a charakterizací připravených látek pomocí dostupných fyzikálně–chemických metod.

# 1 Cíle práce

Cíle mé práce v bodech:

- Literární rešerše na téma: (bio)syntéza, biologická aktivita a možná role biokonjugátů giberelinů A<sub>3</sub> a A<sub>4</sub>.
- Syntéza biokonjugátů giberelinů A<sub>3</sub> a A<sub>4</sub>
- Charakterizace připravených látek pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

---

# Teoretická část

## 2 Role fytohormonů v rostlinném systému

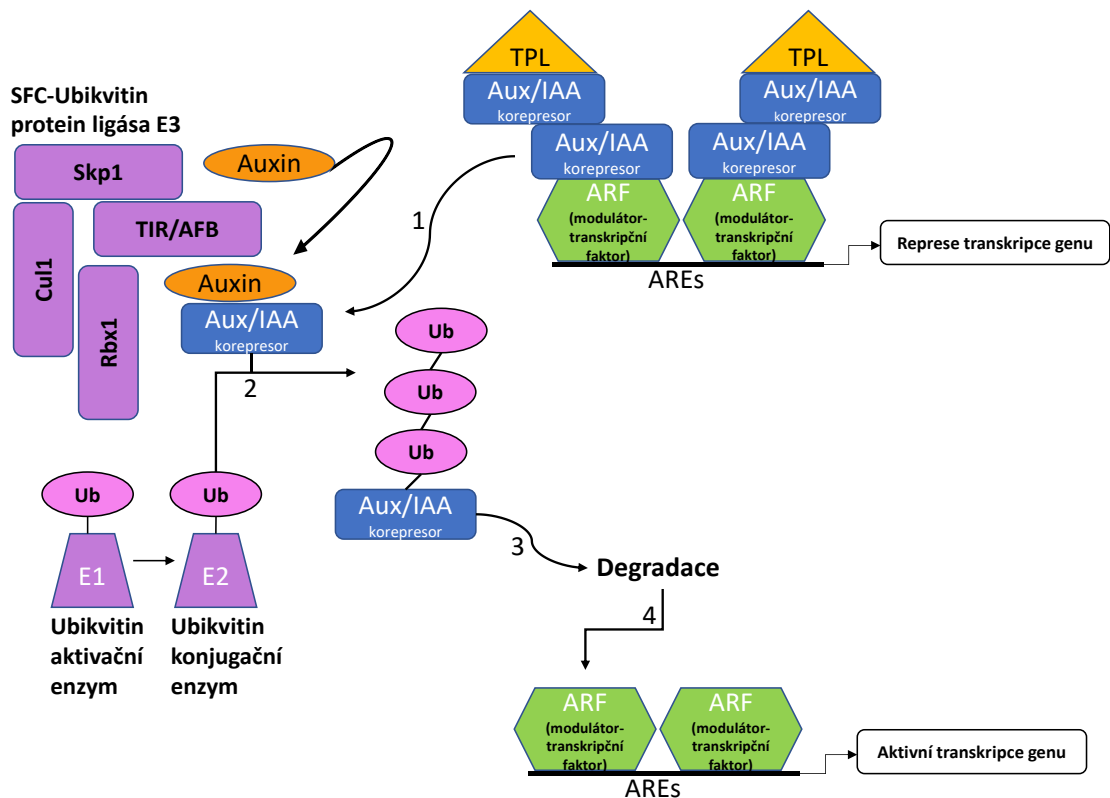
Rostliny jsou eukaryotní fotosyntetické organismy, které jako jiné vícebuněčné organismy musí reagovat na potenciální enviromentální změny, jako je např. zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, změna teplot nebo nedostatek slunečního záření. Proto se u rostlin vyvinul komplexní systém biochemických procesů, kde fytohormony hrají důležitou roli nízkomolekulárních látek, které se podílejí na regulaci růstu a vývoji rostliny.<sup>5</sup> Tyto látky můžeme označit za integrátory vnějších a vnitřních signálů.<sup>6</sup> Fyziologické účinky se již projevují ve velmi nízkých koncentracích, což nám napovídá, že celkové množství jednotlivých fytohormonů v rostlinném systému bude velmi malé. Nicméně existuje celkem široká řada těchto látek, které byly detailně prostudovány. Mezi klasické fytohormony bychom mohli zařadit 5 základních a to auxiny, cytokininy (CK), kyselinu abcisovou (ABA), kyselinu salicylovou (SA) a gibereliny.<sup>7</sup>

Fytohormony tvoří nezbytnou složku ve vývoji rostliny, a každý z fytohormonů má svoji specifickou úlohu, ale i přes to existuje mezi těmito látkami jaká si spojitost, nýbrž dva i více fytohormonů se může podílet na stejné funkci. Účinky se projevují jak synergicky, tak i antagonicky. Uveďme si příklad auxinu a giberelinu, obě tyto látky se podílejí na elongaci buněk, to nás přivádí k řadě otázek typu: Mohou sdílet tyto dva fytohormony s podobnou funkcí stejnou signální kaskádu? Nebo jak jednotlivé fytohormony získávají svoji specifitu? Pro porozumění těmto otázkám se fytohormony stávají předmětem zkoumání a čím více rozumíme mechanismu jednotlivých fytohormonů, tím lépe se dostáváme ke správné odpovědi. Než se dostaneme k samotným giberelinům, popišme si narychlo další fytohormon pro porovnání.<sup>7,6</sup>

## 2.1 Auxin jako generální koordinátor růstu

Auxiny ovlivňují mnoho fyziologických procesů rostliny a fungují jako generální koordinátor růstu. Mezi jeho funkci bychom mohli zařadit stimulaci buněčného dělení, prodlužování stonků, větvení kořenů a stejně jako cytokininy inhybují proces stárnutí. Struktura auxinů obsahuje aromatický skelet s karboxylovou kyselinou v postranním řetězci a nejdůležitějším zástupcem této skupiny je přirozeně se vyskytující kyselina indol-3-octová (IAA). V rostlině se objevuje ve formě různých derivátů či konjugátů cukrů nebo aminokyselin, které jsou důležitou součástí pro biosyntézu a regulaci hladiny volné IAA.<sup>6,8</sup>

Prostředkem, který umožňuje převést změnu koncentrace auxinů na buněčnou odpověď, je ovlivnění transkripce. Auxin reguluje transkripci skrze krátkou signální dráhu, která byla podrobně přezkoumána Elisabeth J Chapman a Mark Estelle v roce 2009 a v roce 2015 Mohammad Salehin et al., ve které auxin dohromady spojuje F-box proteiny (TIR1/AFB) a transkripční represory Aux/IAA.<sup>8</sup>



Obrázek 1: Hlavní dráha pro regulaci transkripce

### 3 Gibereliny

Jak již bylo řečeno, gibereliny patří mezi skupinu rostlinných hormonů. U vyšších rostlin je pouze malá část biologicky aktivní, která působí jako endogenní regulátor růstu anebo jako zprostředkovatel vývojových a environmentálních signálů nezbytných pro vývoj rostliny. Prvním izolovaným a charakterizovaným členem byl giberelin A<sub>3</sub>, dříve nazývaný kyselina giberelová. Ukázalo se, že při aplikaci má schopnost stimulovat růst a je schopen podpořit vývoj i u rostlin trpící trpasličím vzrůstem.<sup>3</sup> Těchto účinků se dostávalo i tehdy, kdy byla látka aplikována ve formě rostlinných extraktů, což bylo důkazem, že se jedná o rostlinné endogenní metabolity. Toto tvrzení bylo potvrzeno po izolování giberelinu A<sub>1</sub> z nezralých semen Fazolu šarlatového (*Phaseolus coccineus*) v roce 1958. Od té doby znalost těchto látek značně pokročila a v současné době známe už přes 130 giberelinů, které byly postupem času získány z rostlin, hub a bakterií.<sup>3</sup>

Výskyt giberelinů je především u vyšších rostlin a patogenních hub, které na oplátku napadené rostlině poskytují přísun těchto látek a probíhá tzv. mykorhiza. Největší koncentrace giberelinů je v růstové tkáni rostliny, kde se objevu v rozmezí 10<sup>-11</sup>-10<sup>-8</sup> g na jeden gram surové hmoty, ovšem vše se odvíjí od typu tkáně a druhu rostliny. Jako každý jiný endogenní fytohormon musí mít svoji biosyntetickou cestu k dosažení své biologicky aktivní formy, proto jsou bioaktivní GA vždy doprovázeny prekurzory a různými konjugáty, které se v rostlině mohou vyskytovat v mnohem větší koncentraci než samotná biologicky aktivní forma.<sup>9</sup>

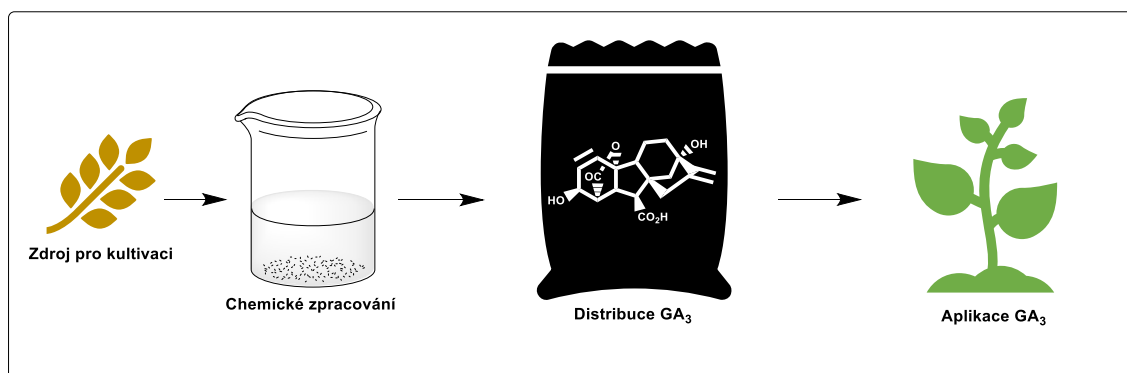


### 3.1 Produkce kyseliny giberelové–giberelinu A<sub>3</sub>

Jelikož, kyselina giberelová ovlivňuje rostlinný vývoj a může značně zvýšit výnos v široké řadě rostlinných produktů, je v zemědělském průmyslu důležitou a ceněnou biochemickou látkou. Velikost poptávky je spjatá s čistotou a účinností dané látky, proto výrobci GA<sub>3</sub> stále usilují inovovat své metody za vidinou levné a kvalitní produkce.<sup>10</sup>

Roční produkce je okolo 100 tun, kdy se jeden kilogram pohybuje okolo 150 až 500 amerických dolarů.<sup>11</sup> Průmyslově se GA<sub>3</sub> může získávat submerzní fermentací houbového patogenu *Gibberella Fujikuroi*, ovšem k vzhledem k nízkému výnosu je tato metoda velice nákladná. Řešením tohoto problému se zdá být solit–state fermentation neboli SSF.<sup>12</sup> Metoda spočívá na kultivaci mikroorganismů na pevném podkladě (matrici) bohatém na živiny za podmínek chudých na vodu. Díky tomu je možné získat vyšší koncentraci požadovaného metabolitu s nízkou bakteriální kontaminací.<sup>13</sup> Velkou výhodou je využití zemědělského odpadu (směs obilných otrub a zbytků sladu), jako substrát pro kultivaci houbového patogenu.<sup>12</sup>

Ovšem zvýšení produkce GA<sub>3</sub> není otázkou pouze inovací metod zpracování, ale i stránkou vývoje efektivních geneticky modifikovaných houbových patogenů, které by přispěly k vyšší koncentraci GA<sub>3</sub>.<sup>10</sup>

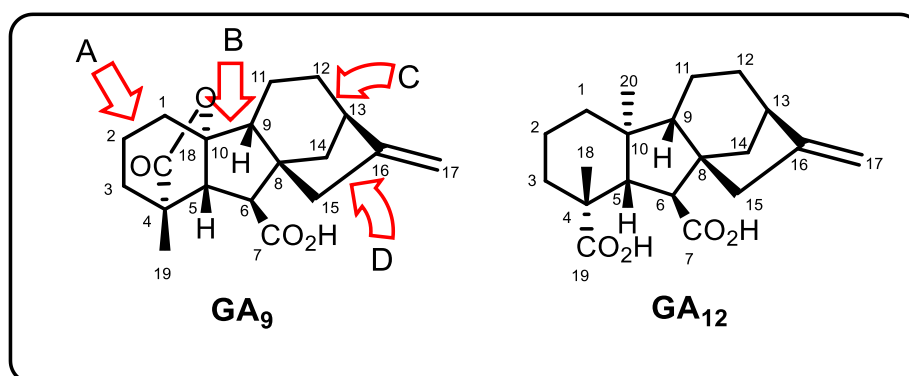


Obrázek 2: Produkce GA<sub>3</sub>

## 3.2 Struktura

Typologie giberelinů je velmi rozsáhlá, aby se předešlo problému s triviálními názvy, vymyslelo se systematické číslování typu GA<sub>(1,2,3,4...)</sub>. Díky velké variaci funkčních skupin existuje již kolem 136 GA. K první správně navržené struktuře kyseliny giberelové vedla velmi spletitá, zdlouhavá cesta, a kromě stereochemie na uhlíku C9 se v roce 1959 podařilo předložit správný návrh. V letech 20. století rentgenová krystalografie přispěla k získání důležitých strukturních informací ohledně prostorového uspořádání a tvaru molekul. Výjimkou nebyly ani gibereliny, kdy postupem času veškeré spjaté strukturní nejasnosti byly objasněny právě vyhotovením rentgenové krystalografie.<sup>14</sup>

Všeobecně gibereliny patří mezi skupinu tetracyklických diterpenoidů, a jak už název skupiny napovídá, každý giberelin se skládá ze 4 cyklů. Pro lepší orientaci jsou tyto jednotlivé cykly označeny A,B,C a D. Což umožňuje rozdělit strukturní znaky na jednotlivé odvětví a to tedy na chemii a reaktivitu kruhu A,B,C a D.<sup>14,15</sup>

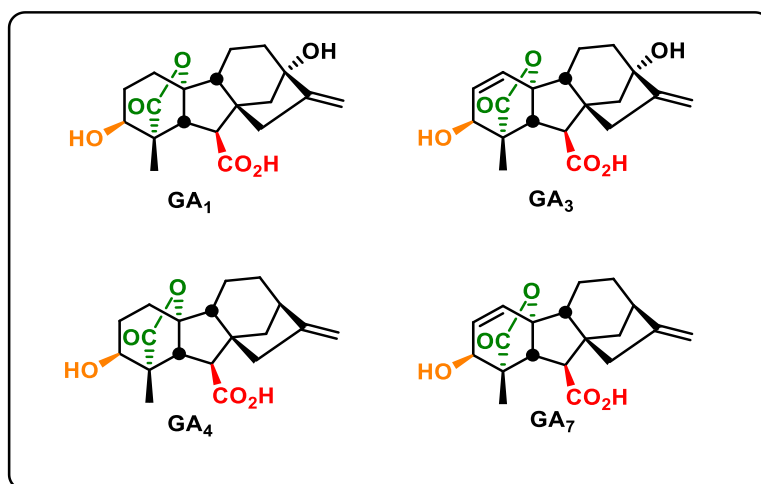


Obrázek 3: Popis skeletu C-19 a C-20 giberelinů

Veškeré známé GA můžeme zahrnout do dvou podskupin. První podskupina obsahuje 19 uhlíkatý pentacyklický skelet a lze označit za 20-nor-ent-giberelanový. Charakteristickými chemickými skupinami pro GA C-19 jsou 7- karboxylová kyselina, 17-methylen, a 19,10- $\gamma$ -lakton. Za mateřskou strukturu u této podskupiny by se mohl považovat GA<sub>9</sub>. Druhou podskupinou je 20 uhlíkatý ent-giberelanový skelet. Pro tento skelet je charakteristická absence 19,10- $\gamma$ -laktonového kruhu. Kromě laktonu se zde mohou nalézt substituenty od metylu až po karboxylovou skupinu. Jako u předešlé podskupiny se i zde jeden z giberelinů dá považovat za mateřský a to GA<sub>12</sub>.<sup>14,4</sup> Předpona ent v názvu podskupin má co do činění s faktem, že skelet GA je odvozen od ent-kaurenu, který je enantiomerem ke své přirozeně vyskytující se formě kaurenu.<sup>4</sup>

### 3.2.1 Struktura bioaktivních GA

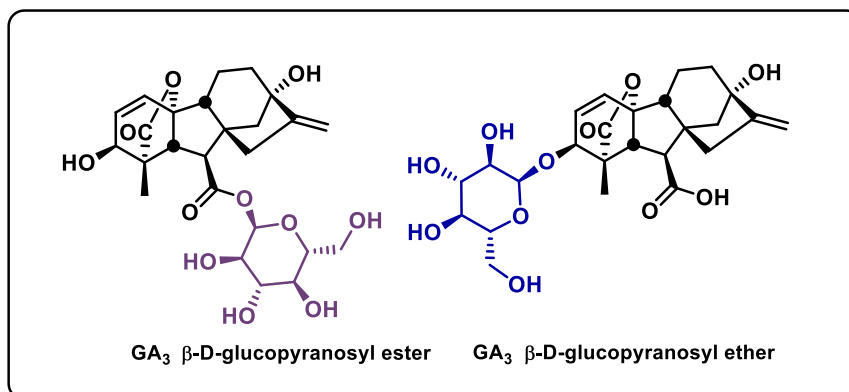
Mezi nejznámější biologicky aktivních gibereliny se řadí GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>. U biologicky aktivních GA se většinou vyskytuje hydroxy skupina na C-3β uhlíku, karboxylová skupina na C-6 a v poslední řadě lakton mezi C-4 a C-10. Hydroxy skupina na uhlíku C-13 má samozřejmě také velký vliv na biologickou aktivitu, jak bude vysvětleno v kapitolách 3.4.3 a 3.5.1, ovšem její přítomnost či nepřítomnost není podmínkou.<sup>16,14</sup>



Obrázek 4: Struktury GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>3</sub> a GA<sub>7</sub>

### 3.2.2 Struktura cukerných konjugátů

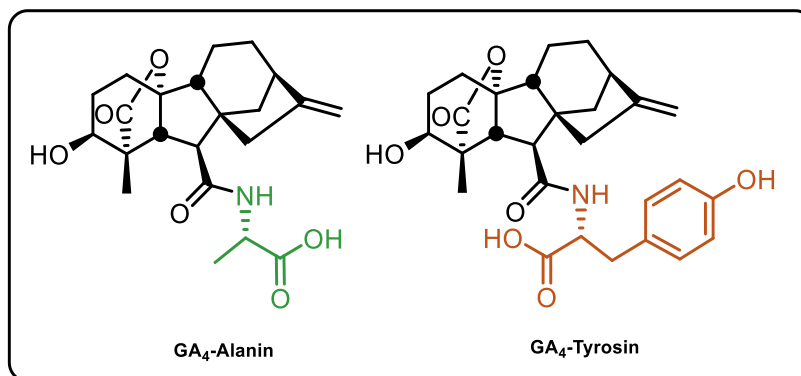
Jak již bylo v předchozích stránkách zmíněno, gibereliny se v rostlinném systému vyskytují i v zastoupení ve formě konjugátů. Nejrozšířenější skupinou jsou cukerné konjugáty, které rozlišujeme na dvě skupiny, konkrétně na glukosyl ethery GA a glukosyl estery GA. Bylo zjištěno, že forma β-D-glukopyranosa se vyskytuje v obou případech a může být vázána na 2-O, 3-O, 11-O, 13-O, 17-O a 7-karboxylovou skupinu.<sup>4</sup>



Obrázek 5: GA<sub>3</sub> β-D-glukopyranosyl ester a GA<sub>3</sub> β-D-glukopyranosyl ether

### 3.2.3 Struktura aminokyselinových konjugátů

Doposud se s jistotou nedá tvrdit, že by se GA aminokyselinové nebo GA peptidové konjugáty přirozeně vyskytovaly v rostlinné říši, ale jisté závěry studií a teorie se k této možnosti přiklání. Menší řada GA aminokyselinových konjugátů byla již dříve chemicky připravena, kdy se podařilo k 7-karboxylové skupině GA přichytit aminoskupinu nebo oligopeptid za vzniku klasické peptidové vazby.<sup>17</sup>



Obrázek 6: Struktura GA<sub>4</sub>-Alanin a struktura GA<sub>4</sub>-Tyrosin

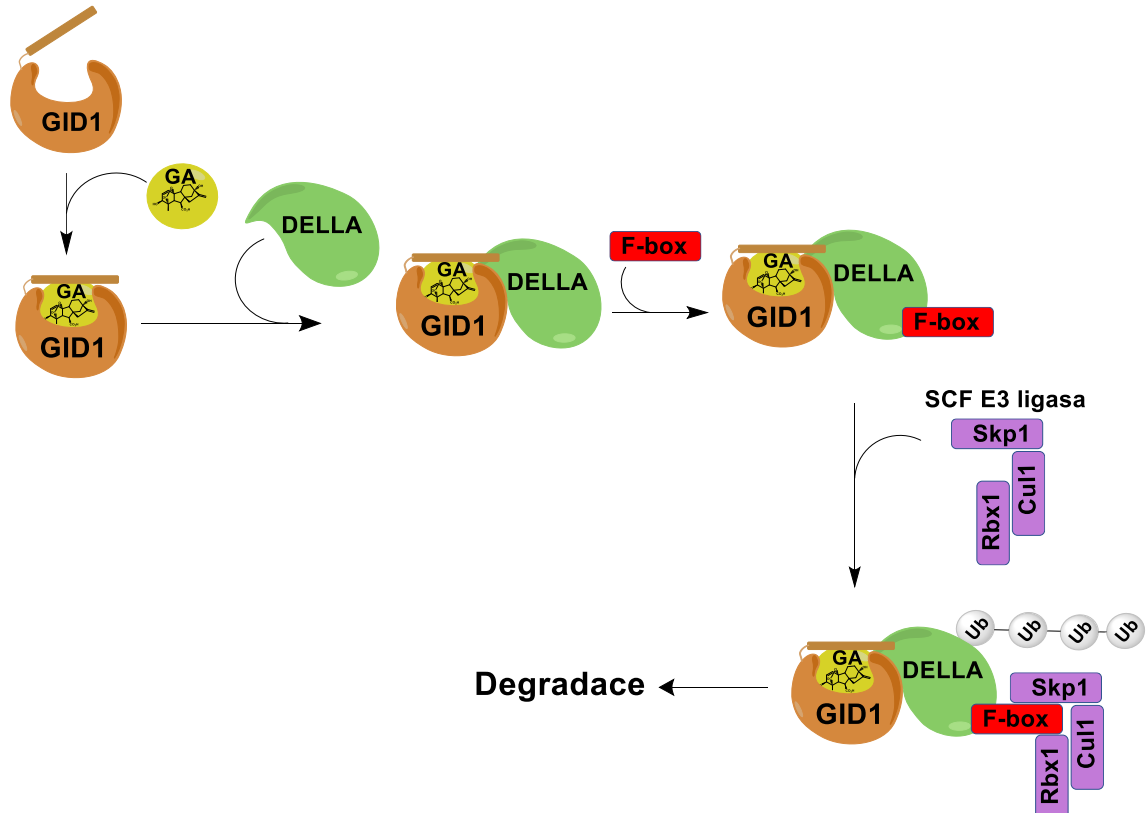
### 3.3 Bioaktivita a mechanismus účinku

Bioaktivní GA v rostlinném systému jsou důležitou jednotkou, která řídí různé aspekty při vývoji rostliny. Těmito aspekty jsou např. regulace klíčení semen přerušáním období vegetativního klidu, podpora buněčného dělení, elongace buněk, růst kořenů, indukce kvetení nebo přizpůsobení rostliny biotickému a abiotickému stresu.<sup>6,1</sup> Role GA je vcelku rozsáhlá a aby vše fungovalo perfektně jak má, musí mít rostlinný systém vyvinut spletitý mechanismus regulace a inaktivace biosyntézy GA. To by ovšem bylo moc jednoduché, důležitou součástí je také souhra mezi ostatními růstovými hormony rostliny.<sup>6</sup> Příkladem může být souhra mezi kyselinou abscisovou a gibereliny během zrání neklimakterického ovoce (např. citrusů a hroznů)<sup>18</sup> nebo interakce mezi auxiny a GA během prodlužování stonku.<sup>19</sup>

### 3.3.1 Mechanismus účinku

Mechanismus giberelinů je spjatý s DELLA proteinem, který funguje jako jaderný růstový represor. DELLA represor potlačuje GA signální dráhu a omezuje růst rostliny prostřednictvím přeprogramování transkripce.<sup>20,21</sup> Pro aktivaci mechanismu účinku giberelinů, je potřeba Gibberellin insensitive dwarf 1 (GID1) receptoru.

GID1 je rozpustný protein s vysokou afinitou k bioaktivním giberelinům a je lokalizován jak v cytoplasmě, tak i v jádře buňky.<sup>20,22</sup> Po navázání GA na receptor dojde ke změně v konformaci GID1 receptoru a mnohonásobně se zvýší možnost interakce s DELLA represorem. Zvýšená interakce je zapříčiněna lepší přístupností mezi podjednotkou GID1 receptoru se dvěma hlavními DELLA domenami.<sup>23</sup> Jakmile je vytvořen GA/GID1/DELLA complex, přichází do hry F-box protein, který je důležitou podjednotkou specifické Skp, Cullin, F-box komplex (SCF) E3 ligázy. F-box protein umožňuje navázání SCF E3 ligázy na GA/GID1/DELLA komplex, což následně vede k ubikvitinaci. Výsledkem je degradace DELLA represoru pomocí 26s proteosomu, kde se odbourávají proteiny a tím je umožněna regulace potřebných genů pro vývoj rostliny.<sup>3,21,23</sup>



Obrázek 7: Mechanismus bioaktivních GA

## 3.4 Biosyntéza GA

Biosyntetická dráha giberelinů je velmi komplexní a vzhledem širokému zastoupení v různých organismech se biosyntetická dráha může lišit. Ovšem díky delšímu zájmu a provedením celé řady studií je dnes obecná biosyntéza GA více objasněna a tím se otevírají možnosti k jejímu pochopení. U vyšších rostlin probíhá biosyntetická dráha přes methylerythritol fosfátovou dráhu (MEP), kdežto v říši hub přes mevalonátovou dráhu.<sup>24</sup> Nicméně jisté biosyntetické pochody nadále zůstávají záhadou a pro hlubší porozumění musí být detailněji prozkoumány.

### 3.4.1 Od MEP po ent-kauren

Biosyntetická cesta GA ve vyšších rostlinách se odehrává ve třech částech rostlinné buňky plastid, endoplasmatické retikulum (ER) a cytosol.<sup>1</sup> Jak již bylo řečeno biosyntéza GA ve vyšších rostlinách probíhá převážně přes MEP, která funguje v cytosolu. Hlavními produkty jsou isopentenylidifosfát (IDP) a dimethylallyldifosfát (DMADP). Mezi IDP a DMADP dochází k vzájemné isomeraci, díky enzymu isopentenylidifosfát isomerázy (IDI).<sup>25</sup> Produkty MEP jsou transportovány do plastidu, kde dojde k biosyntéze geranylgeranylidifosfátu (GGDP) pomocí geranylgeranylidifosfát syntázy (GGDPS). Tím je zahájena hlavní biosyntetická cesta GA. Skrze protonaci je odstartována dvoukroková cyklizace GGDP, jdoucí přes ent-kopalyldifosfát (CDP), která je zakončena tvorbou ent-kaurenu. Cyklizace probíhá za účasti dvou enzymů ent-kopalyldifosfát syntázy (CDPS) a ent-kauren syntázy (KS).<sup>26</sup>

### 3.4.2 První giberelin

Mezi prvně nasyntetizovaný giberelin v rostliném systému patří inaktivní C 20 GA<sub>12</sub>, kterého je dosaženo pomocí katalýzy dvěma Cytochrom P450 monooxygenásami, ent-kauren oxidásy (KO) a oxidásy ent-kaurenové kyseliny.<sup>26</sup> Díky pravděpodobné lokaci ent-kauren oxidásy na povrchu ER se předpokládá, že k oxidaci ent-kaurenu dochází při transportu z plastidu do ER přes potenciální membránový spoj, umožňující transport nepolárních metabolitů.<sup>26,27</sup> Během transportu do ER proběhně opakovaná hydroxylace ent-kaurenu na C-19 za vzniku ent-kaurenolu, posléze aldehydu ent-karenalu a nakonec ent-kaurenové kyseliny.<sup>26</sup> Dále je zapojena oxidása ent-kaurenové kyseliny, která umožňuje vzniku GA<sub>12</sub> skrze 3 krokovou oxidaci.<sup>9</sup> Nejprve je zahájena stereospecifická hydroxylace v poloze C-7β. Posléze na 6 uhlíkatém cyklu B dojde k migraci uhlíků mezi vazbou C-7 a C-8 za vzniku 5 uhlíkatého cyklu a postranního C-7 aldehydu. Finálním krokem k samotné GA<sub>12</sub> je oxidace vzniklého GA<sub>12</sub> aldehydu.<sup>26</sup>

### 3.4.3 Pár kroků k bioaktivitě

Vzhledem k různým bioaktivním GA strukturám se biosyntetická cesta rozděluje a nevede pouze k jednomu produktu. Pomocí enzymu GA-13 oxidásy z GA<sub>12</sub> vzniká GA<sub>53</sub>, který vede k bioaktivnímu GA<sub>1</sub> s hydroxy skupinou v poloze C-13. Druhou možností je cesta bez C-13 hydroxylace, což vede k bioaktivnímu GA<sub>4</sub>.<sup>28</sup> Vzhledem nepřítomnosti hydroxy skupiny v poloze C-13 má GA<sub>4</sub> vyšší afinitu ke GID1 receptoru a tím i vykazuje větší bioaktivitu oproti GA<sub>1</sub>.<sup>26</sup> Obě tyto cesty se dále odehrávají v cytosolu a v jádře<sup>9</sup>, kde se GA<sub>12</sub> a GA<sub>53</sub> specificky vážou na enzym GA 20 oxidásu a dojde k ireversibilní oxidaci za vzniku GA<sub>9</sub> a GA<sub>20</sub>.<sup>29</sup> Během oxidace je odstraněn uhlík C-20 za vzniku 19,10-γ-laktonového kruhu. Posledním enzymem je GA 3 oxidása, která pomocí více krokové oxidace převede GA<sub>9</sub> a GA<sub>20</sub> na finálně bioaktivní GA<sub>1</sub> a GA<sub>4</sub>. Za vedlejší produkty oxidace se poté mohou považovat bioaktivní GA<sub>3</sub> a GA<sub>7</sub>.<sup>26</sup>

### 3.5 Regulace bioaktivity GA

Bioaktivita, tím tedy i koncentrace bioaktivních GA v rostlinných buňkách, je regulována v závislosti na vývojovém stádiu rostlinného systému a samozřejmě i okolními vnějšími vlivy. Jako vnější vliv můžeme chápat např. abiotický stres, který je způsoben nedostatkem slunečního záření. Expres většiny genových sekvencí odpovídající za vznik enzymů, které se podílejí na biosyntéze bioaktivních GA, je ovlivněna vnějšími signály. Vzhledem k tomu se endogenní GA stávají velmi citlivými na změnu prostředí.<sup>30</sup>

#### 3.5.1 Volba mezi GA<sub>1</sub> a GA<sub>4</sub>

Jak již bylo naznačeno, upřednostnění biosyntézy bioaktivního GA<sub>1</sub> před GA<sub>4</sub> lze považovat za mírný způsob inaktivace. Bylo zjištěno, že k této regulaci dochází na základě exprese genových sekvencí CYP714B1 a CYP714B2, které vedou ke vzniku enzymu GA-13 oxidázy. Při vysoké exprese těchto genových sekvencí byl pozorován menší vzrůst u testovaných rostlin rýže a tím se dá i předpokládat, že enzym GA 13-oxidáza patří mezi regulační enzymy bioaktivity GA.<sup>31</sup>

#### 3.5.2 Inaktivace bioaktivních GA prostřednictvím GA 2-oxidázy

Další a nejlépe známou regulací aktivity bioaktivních GA je GA 2-oxidáza, která inaktivuje bioaktivní GA nebo jejich prekurzory prostřednictvím hydroxylace v místě C-2. Byly zaznamenány pokusy o navýšení exprese genové sekvence GA 20-oxidázy a tím by se i zajistilo větší množství bioaktivních GA skrze biosyntézu. Ovšem toto právě vedlo i ke zvýšení enzymu GA 2-oxidázy. Řešením tohoto problému se jeví umlčení GA 2-oxidázy pomocí harpin vector RNA, která interaguje s genetickou sekvencí GA 2-oxidázy a tím je zabráněna její exprese. Pokusy byly úspěšně provedeny na vzorcích tabákových rostlin, které vykazovaly kladné ovlivnění růstu.<sup>32</sup>



### 3.5.3 Epoxidace GA<sub>4</sub> v poloze C 16 a C17

U vzorků rýže s Elongated uppermost internode (EUI) mutantní genovou sekvencí byl oproti volnému druhu rýže pozorován nadměrně velký vzrůst stonku. Ovšem při overexpresi EUI mutantní genové sekvence testované vzorky naopak začaly projevoval zakrslou stavbu těla. To vedlo k předpokladům, že EUI genová sekvence ovlivňuje deaktivaci bioaktivních fytohormonů. Na základě těchto předpokladů byly provedeny testy a potvrdilo se, že EUI genová sekvence umožňuje expresi cytochromu P450 monooxygenázy (CYP714D1). Tím se projevuje enzymatická aktivita, která vede k deaktivaci bioaktivních GA. Deaktivace probíhá prostřednictvím epoxidace dvojné vazby v poloze C 16 a C 17 za vzniku epoxidového kruhu. Z testovaného souboru giberelinů in vitro byla výrazná epoxidace zaznamenána pouze u GA<sub>4</sub>, GA<sub>9</sub> a GA<sub>12</sub>. Z toho vyplývá závěr, že enzym CYP714D1 metabolizuje pouze GA s přítomností hydroxy skupiny v poloze C 13, ovšem tím je výrazně ovlivněna bioaktivita nejen u GA<sub>4</sub>, ale i u všech bioaktivních GA skrze biosyntézu (Schéma 1).<sup>33</sup>

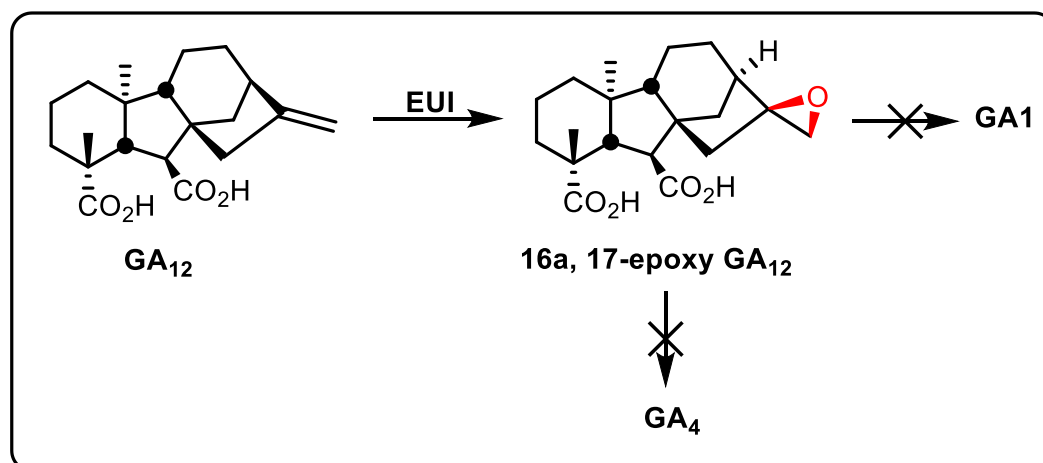


Schéma 1: Epoxidace GA<sub>12</sub>

### 3.5.4 Regulace GA v závislosti na koncentraci auxinů

Doposud byla řeč pouze o enzimech vedoucí k deaktivaci GA, jejichž enzymatická aktivita je ovlivněna skrze expresi konkrétních genových sekvencí. Ovšem tím pádem musí i existovat signální prostředník pro regulaci těchto genových sekvencí.

V předchozích kapitolách bylo zmíněno, že pro správné fungování celého rostlinného systému je důležitá souhra fytohormonů. Tato souhra se promítá i do regulace giberelinů, která je částečně ovlivňována i auxiny.

Příkladem může být provedený pokus u rostlin s odstraněnou špičkou kořene. U konkrétních mutantních druhů rostlin s deficitem endogenních GA bez spodní části kořene, byla při dodání exogenních bioaktivních GA zjištěna omezená schopnost odbourání specifického DELLA proteinu RGA. Ovšem po aplikaci exogenních auxinů na postižené místo, byla aktivita bioaktivních GA navracena a tím se obnovila schopnost deaktivace RGA. Při omezení transportu auxinů, bylo dosaženo podobného výsledku v podobě zpomalení deaktivace RGA.<sup>34</sup> Jedním z možných mechanismů tohoto působení je jejich schopnost navýšení exprese důležitých enzymů na úrovni transkripce. Předpokládá se tedy, že auxiny v tomto případě kontrolují genovou expresy skrze větvenou signální dráhu Aux/IAA ARF, která je zmíněna v první podkapitole této práce. Mezi důležité enzymy pro metabolismus GA, které mohou být tímto způsobem ovlivněny patří převážně GA 20-ox a GA 3-ox, ale i GA 2-ox.<sup>35</sup>

### 3.5.5 Vznik konjugátů GA jako prostředek deaktivace

Jednoduše řečeno vzhledem k malé bioaktivitě konjugátů GA se na vznik těchto skupin pohlíží, jako na jeden ze způsobů deaktivace. U GA aminokyselinových konjugátů nebyl potvrzen přirozený výskyt v rostlinách, a proto jsou všechny teorie čistě hypotetické. Ovšem u cukerných konjugátů se již ví, že jsou přirozeně se vyskytující rostlinnou látkou. Díky tomu se dá předpokládat jejich důležitá role při růstu a vývoji rostliny. Jednou z možných rolí je právě deaktivace bioaktivních GA skrze enzymatickou konjugaci a následné uložení vzniklých cukerných konjugátů. V tomto případě by cukerné konjugáty sloužily jako zásobní rezervoár a v případě nutnosti by byly chemicky nebo enzymatickou hydrolýzou opět přetransformovány na bioaktivní GA. Další možností je funkce cukerných konjugátů jako odpadní prostředek k odbourání ve vakuolách, či k usnadnění transportu do různých částí rostlin.<sup>36</sup>

## 3.6 Cukerné konjugáty GA

Cukerné konjugáty GA jsou řazeny mezi nejrozšířenější skupinu známých giberelinových konjugátů. První cukerný konjugát  $GA_8-2-O-\beta-D$ -glukopyranosyl ether byl izolován z lusků fazolu šarlatového (*Phaseolus coccineus*).<sup>37</sup>

Nápomocným předmětem v pochopení funkce konjugátů jsou fluorescenčně a radioaktivně značené molekuly. Po aplikaci radioaktivně značené kyseliny giberelové na sazenice a semena rostliny z rodu povijnice (*Pharbitis nil*) se podařilo zjistit, že větší část aplikované  $GA_3$  je metabolizována na cukerné konjugáty, které vykazovaly hojně zastoupení v děložních lístcích rostliny. Na základě těchto pozorování se předpokládá, že cukerné konjugáty mohou hrát důležitou roli při klíčení, ale i při dalších vývojových stádiích.<sup>38</sup>

### 3.6.1 Cukerné konjugáty v roli transportní jednotky

Pro transport živin a fytohormonů v rostlinném systému je klíčová celková polarita transportované molekuly. Na základě polaritativity se často odvíjí lokalizace transportu. U cévnatých rostlin probíhá delší transport molekul přes vaskulární systém xylém a floém. Xylém zajišťuje transport živin směrem od kořenů k horní části rostliny a je řízen hydrostatickým tlakem. Floém je důležitý pro cirkulaci živin a zprostředkovává signální dráhu z horní části ke kořenům.<sup>39</sup> U neutrálních látek byla pozorována lepší mobilita v xylému, kdežto u floému transport vyžadoval chemickou skupinu s lehce disociovatelným vodíkem. Proto se předpokládá, že GA glukopyranosyl estery mohou vykazovat větší mobilitu převážně v xylému, čemuž by nasvědčovala i potvrzená přítomnost těchto látek v míze ořešáků.<sup>40</sup>

Další případ příklánějící se k funkci cukerných GA konjugátů, jakožto transportní jednotka je aplikace řady bioaktivních GA na zrající plody jablek. Z aplikované řady  $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$  a  $GA_7$  byly metabolizovány na cukerné konjugáty pouze  $GA_3$  a  $GA_1$ , kdy vznikaly  $GA_3$  13-O-glukopyranosyl ether a  $GA_1$  13-O-glukopyranosyl ether. Právě tyto dva typy GA vykazovaly oproti  $GA_4$  a  $GA_7$  větší mobilitu, která může být způsobena přítomností hydroxy skupiny v poloze C13 nebo faktem, že docházelo k selektivní glykosylaci na 13-OH skupině za vzniku polárnějších GA glukopyranosyl etherů, které byly detekovány pomocí analytických metod LC-MS a GC-MS.<sup>41</sup>

### 3.6.2 Biosyntéza a hydrolýza GA cukerných konjugátů

Biosyntéza cukerných konjugátů u fytohormonů probíhá prostřednictvím specifické glukosylace za účasti specifického enzymu glukosyltransferázy, kdy jako cukerný substrát slouží UDP-Glukosa. Stejně je tomu tedy i u giberelinů (Schéma 2). Velká míra glukosylace GA byla zaznamenána u klíčících semen Fazolu šarlatového a bylo zjištěno, že specifický enzym glukosyltransferáza pro glukosylaci GA má mnohem větší afinitu ke GA<sub>3</sub> než k bioinaktivním GA<sub>7</sub> a GA<sub>30</sub>. Byly zaznamenány i případy intrakonverze, kdy značená molekula glukosy u GA cukerného konjugátu byla vyměněna mezi další volné GA molekuly.<sup>36</sup>

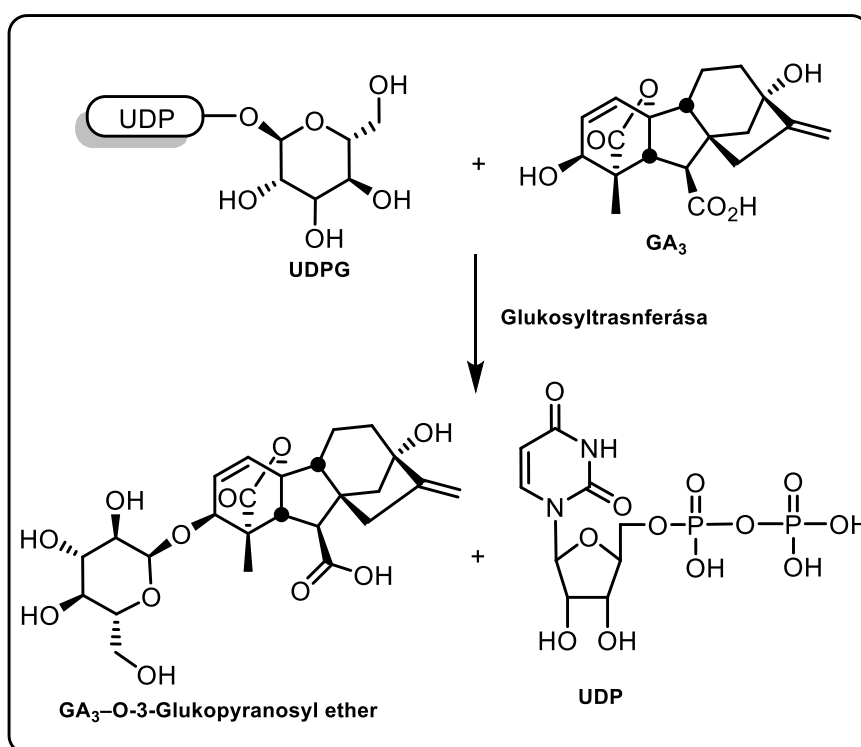


Schéma 2: Glukosylace GA<sub>3</sub> pomocí glukosyltransferázy

K bioaktivaci cukerných konjugátů za získání volných fytohormonů je potřeba enzymu β-glukosidázy. Po navázání molekuly cukerného konjugátu na specifické místo enzymu dojde k hydrolýze za uvolnění glukosy a volné molekuly fytohormonu. Prvním charakterizovaným enzymem β-glukosidázy je rýžový protein s označením Os4BGlu13, který specificky do aktivního místa dokáže vázat molekulu GA<sub>4</sub>-1-O-Glukosyl esteru.<sup>42</sup>

### 3.6.3 Purifikace a separace giberelinových konjugátů z rostlinného extraktu

Pro identifikaci a charakterizaci rostlinných konjugátů je důležitá kvalitní extrakce z rostlinného materiálu, kterou následuje separace a purifikace. Právě zde se setkáváme s řadou nevýhod různých technických metod pro separaci giberelinů. Mezi časté nevýhody se řadí časová náročnost, potřebná znalost rozdělovacích koeficientů molekul, citlivost labilních GA konjugátů na vysoké PH nebo přítomnost solí. Gibereliny a jejich konjugáty vykazují širokým překrývajícím se separačním rozmezím rozdělovacích koeficientů pro různé typy rozpouštědel, což vede k jednomu z hlavních problémů separace. Aby se těmto problémům u separace volných GA a cukerných konjugátů co nejvíce předcházelo, jeví se jako vhodná metoda využívající preparativních kolon s reverzní C<sub>18</sub> fází v kombinaci SiO<sub>2</sub> chromatografickou kolonou. Mobilní fáze se většinou skládá ze směsi MeOH a dalších vhodných rozpouštědel. Pro rychlou separaci směsi volných GA od cukerných konjugátů na malé chromatografické SiO<sub>2</sub> koloně s izokratickým elučním gradientem se osvědčila mobilní fáze hexan:ethylacetát a následně methanol pro vymytí zbylých cukerných konjugátů.<sup>43</sup>

### 3.6.4 Syntéza cukerných a aminokyselinových konjugátů

Konjugáty giberelinů se samozřejmě nezískají pouze jen extrakcí z rostlinných a živočišných materiálů, ale i samotnou syntézou. Zájem o objasnění mechanismu cukerných a aminokyselinových konjugátů vedlo k řadě pokusů o nasyntetizování těchto látek.

Částečné syntézy většinou vycházely z giberelinů, které již byly objeveny ve formě cukerných konjugátů a vědělo se, že jsou přirozeně se vyskytující látkou v říši rostlin a dalších organismů. Jednou z těchto provedených syntéz v minulosti je např. částečná syntéza GA<sub>8</sub>-2-O-β-D-glukopyranosyl etheru. Tehdy se vycházelo z GA<sub>8</sub> methyl esteru a cílem bylo nasyntetizování konstitučně isomerních GA<sub>8</sub>-O-β-D-glukopyranosyl ether konjugátů (Schéma 3). Glykosylace byla provedena pomocí Koenig Knor reakce, která využívá glukopyranosyl bromidu a Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Potřebné deacetylace byly provedeny Zamplenovou metodou za využití MeONa v MeOH.<sup>37</sup>

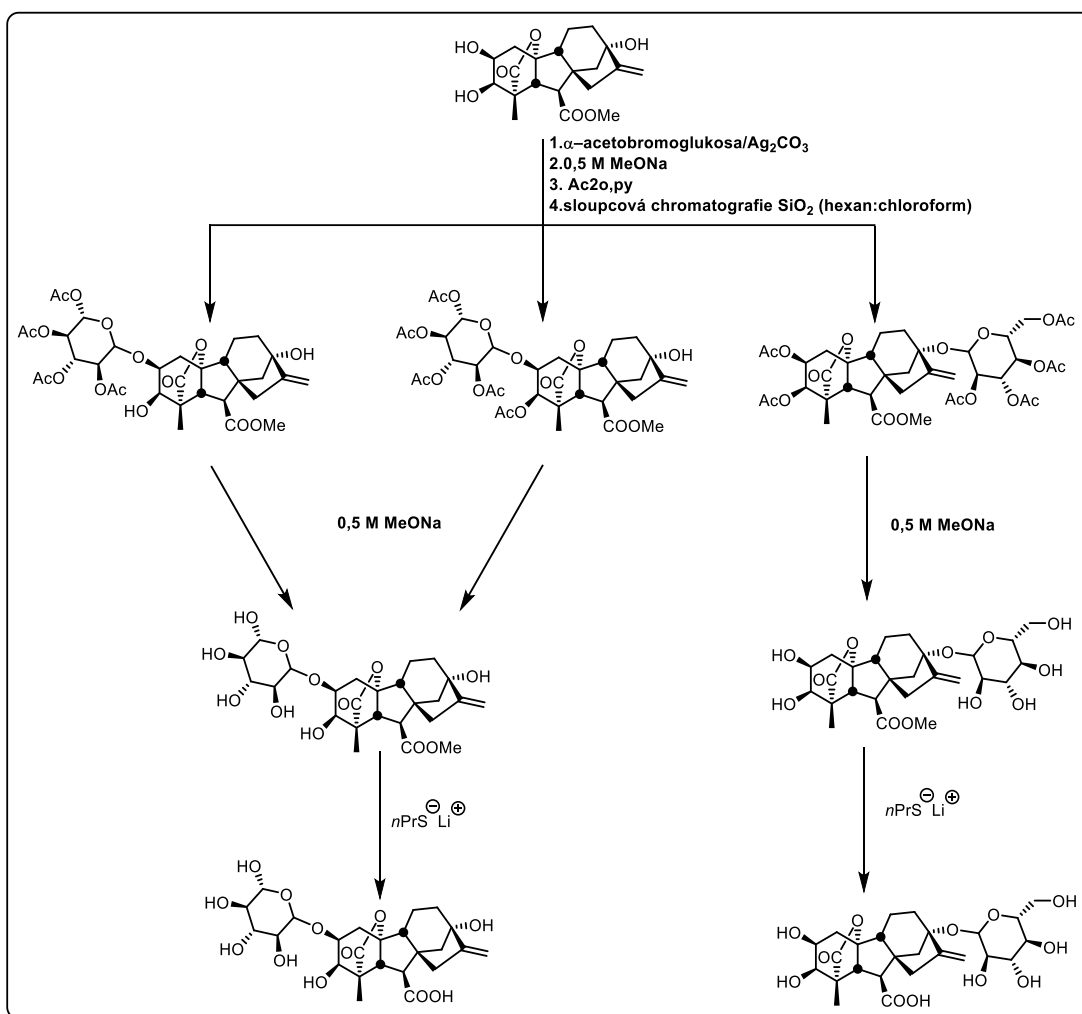


Schéma 3: Syntéza konstitučně isomerních GA<sub>8</sub>-O-β-D-glukopyranosyl ether konjugátů

Vzhledem malému množství publikací o GA aminokyselinových konjugátech je zřejmé, že se jim doposud nedostalo takového zájmu, jako tomu je u cukerných konjugátů. Důvodem menší pozornosti je nejspíše stále nepotvrzený přirozený výskyt v říši rostlin a dalších organismů. Ovšem to z těchto látek nedělá molekuly, které by si zasloužily menšího zájmu.

V 70. letech byla popsána syntéza nového typu konjugátů giberelinů obsahující peptidovou vazbu aminokyseliny místo karboxylové skupiny, která využívala následující 2 typy metod: Aminolýza anhydridu giberelinu s estery aminokyselin s následnou demetylací pomocí lithium-*n*-propyl-merkaptidu nebo přímé štěpení anhydridu s alkalickými solemi aminokyselin (Schéma 4). Ukázalo se, že vhodnější a praktičtější metodou je příprava využívající anhydrid, který přímo reagoval se sodnou nebo lithnou solí aminokyselin nebo peptidem glycylglycin za pokojové teploty.<sup>44</sup>

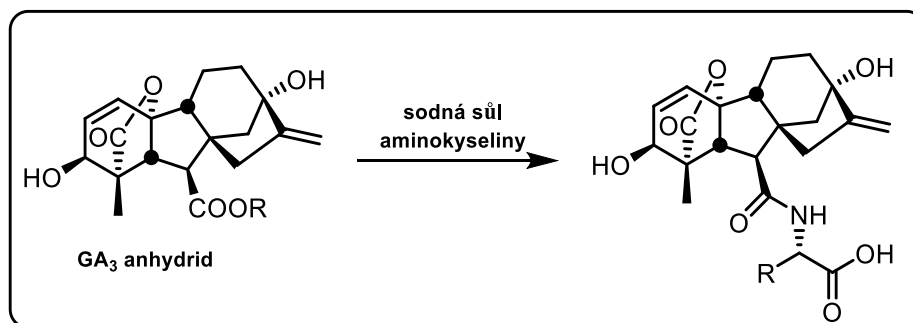


Schéma 4: Syntéza aminokyselinových konjugátů

---

# Experimentální část

## 4 Úvod do experimentální části

Experimentální část se zaměřuje na samotnou syntézu cukerných a aminokyselinových konjugátů giberelinů. Konkrétně je syntéza cílena na GA<sub>3</sub>-O-7-glukopyranosyl ester a aminokyselinové konjugáty GA<sub>4</sub>. U aminokyselinových konjugátů se vychází z molekuly giberelinu A<sub>4</sub> a z řady jednadvaceti bioaktivních molekul L-aminokyselin. Použité aminokyseliny byly vybrány dle dostupnosti a podle jejich vlastností. Popis syntéz zahrnuje detailní postup úspěšných syntéz, kdy bylo dosaženo adekvátního výsledku. V rámci experimentální části je i zahrnuta strukturní charakterizace nasyntetizovaných molekul pomocí analytických metod.

## 5 Organická syntéza

Kapitola Organická syntéza v praktické části se konkrétně zabývá semisyntézou cukerných a aminokyselinových konjugátů giberelinů GA<sub>3</sub> a GA<sub>4</sub>. V případě syntézy cukerných konjugátů se vychází z přírodní látky rostlinného růstového hormonu kyseliny giberelové, která je komerčně produkována fermentací z kultivačních kolonií houbového patogenu viz. kapitola 2.1 v teoretické části s názvem Produkce kyseliny giberelové. Snahou je získání GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru, u kterého se předpokládají zásobní a transportní vlastnosti v rostlinném systému. U syntézy aminokyselinových konjugátů se vychází z přírodní látky rostlinného růstového hormonu giberelinu A<sub>4</sub>, který byl v naší skupině získán separací ze směsi GA<sub>4</sub>/GA<sub>7</sub> pomocí terc-butyl dimethylsilyl chloridu (TBS). Zde si práce dává za cíl získání řady GA<sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů, kdy jsou aminokyseliny pro semisyntézu vybrány z jednadvaceti bioaktivních aminokyselin.

Získané meziprodukty a výsledné látky byly charakterizovány pomocí fyzikálně chemických metod a posléze byly i testovány na biologických živočišných systémech.



## 5.1 Seznam použitých chemikálií, rozpouštědel a vizualizačních činidel

### Použité látky při syntéze

- 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glukopyranosyl bromid
- 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP)
- Acetanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ )
- Benzyl alkohol
- Benzylbromid (BnBr)
- Di-tert-butyl-dikarbonát ( $\text{Boc}_2\text{O}$ )
- Ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC)
- Giberelin  $A_4$  ( $\text{GA}_4$ )
- Hydroxid sodný (NaOH)
- Hydroxybenzotriazol (HOBt)
- Chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3$ )
- Kyselina giberelová ( $\text{GA}_3$ )
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- *L*-alanin
- *L*-fenylalanin
- *L*-leucin
- *L*-prolin
- N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC)
- Palladium na aktivovaném uhlí (Pd/C)
- Prenyl alkohol
- p-Toluensulfonová kyselina monohydrát (p-TsOH)
- Síran hořečnatý ( $\text{MgSO}_4$ )
- Síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- Sodík (Na)
- Uhličitan cesnatý ( $\text{CsCO}_3$ )
- Uhličitan draselný ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )
- Vodík ( $\text{H}_2$ )

### Rozpouštědla

- Diethylether (Et<sub>2</sub>O)
- Dichlormethan (DCM)
- Dimethylformamid (DMF)
- Ethylacetát (EtOAc)
- Methanol (MeOH)
- Petroléter (PE)
- Pyridin (Py)
- Tetrahydrofuran (THF)
- Toluén

### Vizualizační roztoky pro TLC

- Manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>)
- Kyselina sírová (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Ninhydrin
- Fosfomolybdenová kyselina (PMA)
- Vanilin

## 5.2 Použité metody, postupy a materiály

### 5.2.1 Organická syntéza

Veškeré organické syntézy byly provedeny na Katedře Chemické Biologie PřF UP v kampusu Holice v Olomouci pod dozorem docenta Jiřího Pospíšila. Na základě potřeby byly poskytnuty veškeré materiály a aparatury pro provedení syntéz. 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 ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ) a následně byla využita detekce pomocí vizualizačních roztoků, a to pomocí Hannesianova roztoku anebo bazického  $\text{KMnO}_4$ . Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie (CC) na silikagelu 34 od firmy Sigma Aldrich (velikost částic 230-400 mesh; velikost pórů 60 Å). Postupy byly provedeny na základě dosavadně získaných zkušeností, informací z dohledané literatury a rad po konzultacích s vedoucím práce.

### 5.2.2 Analytické metody

Nasyntetizované látky byly podrobeny analytickým metodám pro ověření a získání informací o struktuře či vlastnostech. Analýza vzorků převážně vycházela z proton nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR), uhlík nukleární magnetická rezonance ( $^{13}\text{C}$  NMR) a z vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS, HRMS). Dále byla do analýzy zahrnuta i optická otáčivost, která byla měřena pomocí automatického polarimetru polAAR 3001. Získaná spektra a data analyzovaných látek byla vyhodnocena a zaznamenána.

$^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL 500 JNM-ECA pracující při frekvenci 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) v rozpouštědlech  $\text{CDCl}_3$  nebo  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  při laboratorní teplotě. Chemické posuny ( $\delta$ , ppm) a štěpící konstanty (Hz)  $^1\text{H}$  NMR spekter jsou uvedeny standardním způsobem vzhledem ke zbývajícím  $\text{CHCl}_3$  přítomnému v  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta\text{H} = 7,27$  ppm) a prostřednímu signálu v  $\text{CHD}_2\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$  přítomném v acetonu- $d_6$  ( $\delta\text{H} = 2,05$  ppm).  $^{13}\text{C}$  NMR chemické posuny ( $\delta$ , ppm) jsou uváděny vzhledem k  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta\text{C} = 77,23$  ppm, prostřední signál) a  $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$  ( $\delta\text{C} = 29,84$  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).

Spektra hmotnostní spektrometrie syntetizovaných látek byla měřena s využitím HPLC-PDA-MS metody. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu ( $10 \mu\text{l } 3 \times 10^{-5} \text{M}$  v 1% methanolu) a nanoseny na reverzní kolonu (Symmetry C18, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 2,1 mm; Waters, Milford, MA, USA) při 40 °C. Rozpouštědlo A obsahovalo 15mM mravenčnan amoný ( $\text{HCOONH}_4$ ) 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 ES. Napětí bylo nastaveno na 15 V, iontový zdroj byl zahřán na 120 °C a měření bylo prováděno v pozitivním ( $\text{ES}^+$ ) a negativním módu ( $\text{ES}^-$ ), kdy byly analyzované látky zaznamenány jako kvazimolekulární ionty  $[\text{M}+\text{nX}]^{\text{n}+}$  a  $[\text{M}-\text{nX}]^{\text{n}-}$ .

Podmínky pro analýzu vzorků byly dány dle níže uvedených informací.

- Mobilní fáze: A – voda, B – methanol
- Průtok: 20 ml/min
- Gradient:
  - 0 min . . . 10 % MeOH
  - 10 min . . . 90 % MeOH
  - 12 min . . . 90 % MeOH
  - 12,5 min . . . 10 % MeOH
  - 13 min . . . 10 % MeOH
- Příprava vzorků: 10 mg/1 ml MeOH
- Kolona: Agilent 5Prep–C18 10×21.2 mm
- Quartérní pumpa: 0,5 ml/ min; mobilní fáze 15 mM mravenčnan amoný: MeOH (50 % MeOH)

### 5.3 Postup organické syntézy cukerných konjugátů

Nejdříve výchozí látka kyseliny giberelové musela být selektivně ochráněna, aby se cukerná jednotka navázala do požadovaného místa. Pro ochránění hydroxy skupin byla zvolena acetylace pomocí acetanhydridu. Další kroky se zabývají odchráněním chránících skupin za získání cílené molekuly GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru. Při postupu syntézy se vyskytl problém s menší stabilitou látky po navázání glukopyranosy a s celkovým odchráněním chránících skupin.

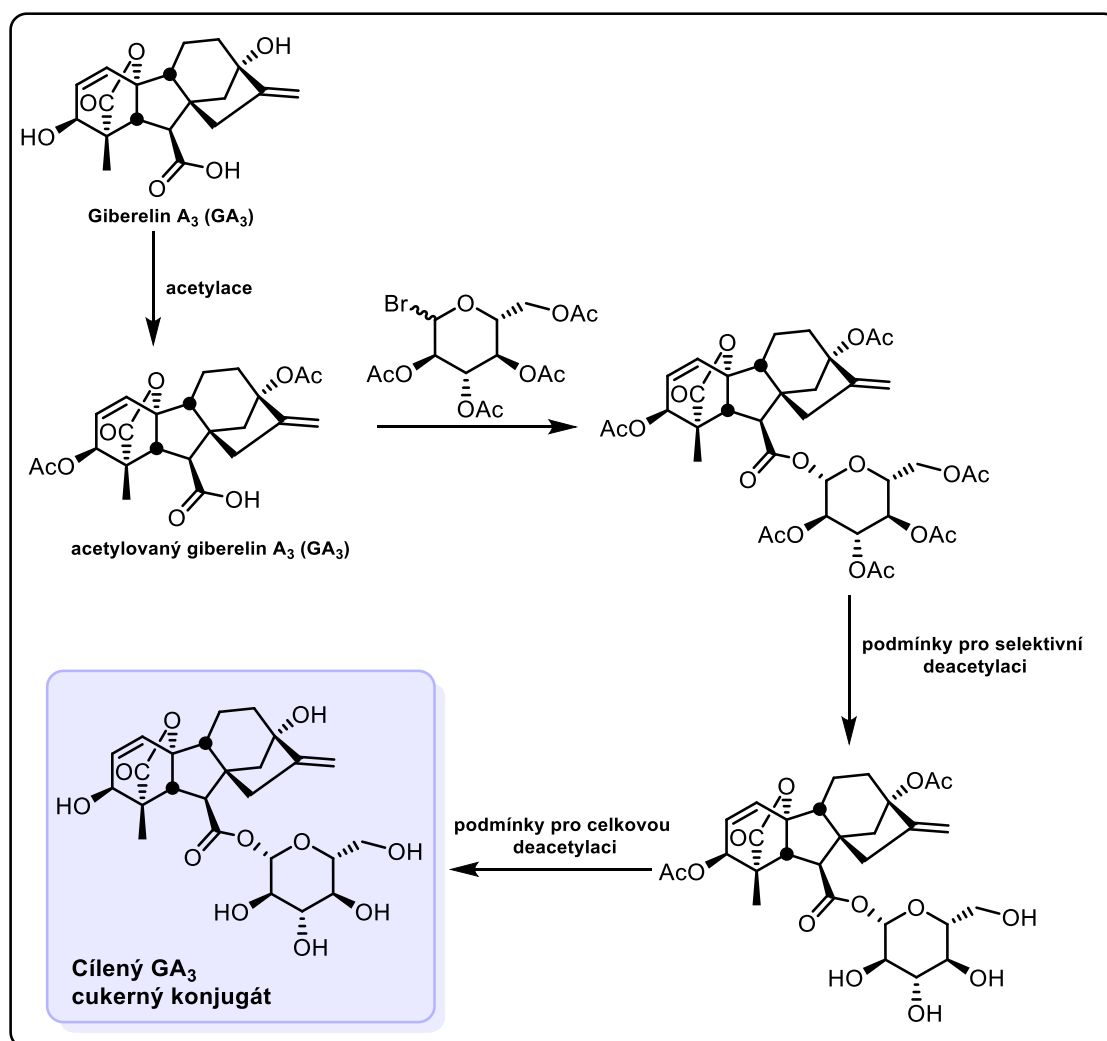
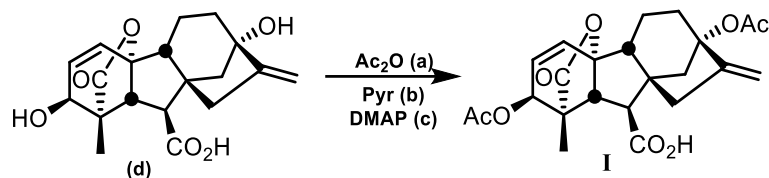


Schéma 5: Postup organické syntézy cukerných konjugátů (experimentální část)

### 5.3.1 Acetylace kyseliny giberelové–vznik látky I



Kyselina giberelová (**d**) (5,77 mmol, 2 g, 1 ekviv.) byla rozpuštěna v suchém pyridinu (**b**) (19,2 ml) a roztok byl ochlazen v ledové lázni. Po 35 minutách byl přidán acetanhydrid (**a**) (86,6 mmol, 8,13 ml, 15 ekviv.) a hned posléze DMAP (**c**) (0,289 mmol, 36 mg, 0,05 ekviv.). Reakční směs byla míchána po dobu 12 h. Poté byla reakční směs ochlazena v ledové lázni (voda/led = 1:1 (V/V)) a k reakční směsi bylo přilito 200 ml MeOH. Směs byla 20 minut míchána za laboratorní teploty a po ukončení reakce byly veškeré těkavé látky odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO). Ke zbylé směsi bylo přilito 100 ml vody a po rozpuštění byla směs okyselena 4M aq. HCl (40 ml). Okyselená směs byla extrahována pomocí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x200 mL). Po extrakci byla organická fáze promyta 2M aq HCl (3x100 ml), solankou (2x100 ml) a sušena nad MgSO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědla na RVO byl získán surový produkt **I**, který byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; PE–EtOAc = 1:1→1:3). Takto byl získán čistý produkt **I** ve formě bílé krystalické látky (2,38 g, 96 %).

#### Látka I

$\alpha_D^{21,4} = 133,9$  ( $c = 1,0$ , CHCl<sub>3</sub>)

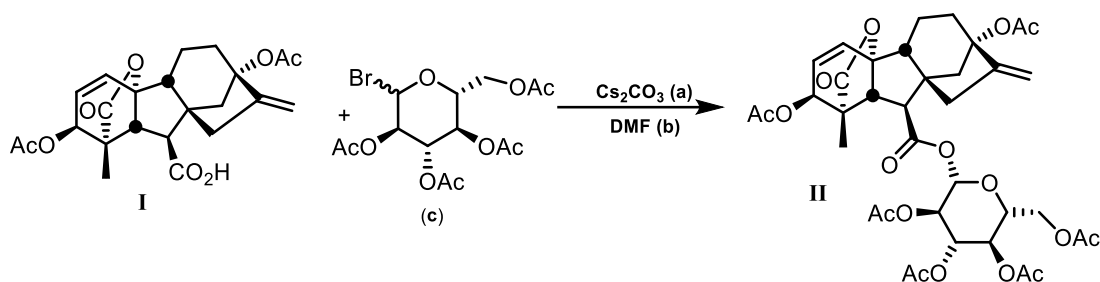
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 10.80 (s, 1H), 6.38 (dd,  $J = 9.3, 1.0$  Hz, 1H), 5.89 (ddd,  $J = 9.3, 3.8, 1.0$  Hz, 1H), 5.35 (dd,  $J = 2.9, 2.0$  Hz, 1H), 5.19 (dd,  $J = 2.9, 1.5$  Hz, 1H), 5.08 – 4.97 (m, 1H), 3.29 (dd,  $J = 11.0, 0.9$  Hz, 1H), 2.83 (dd,  $J = 11.0, 1.0$  Hz, 1H), 2.50 – 2.36 (m, 3H), 2.32 (dd,  $J = 10.9, 2.6$  Hz, 1H), 2.25 – 2.18 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.04 (d,  $J = 1.0$  Hz, 3H), 1.97 (ddd,  $J = 17.3, 12.1, 4.0$  Hz, 1H), 1.81 (td,  $J = 11.7, 8.0$  Hz, 1H), 1.77 – 1.67 (m, 1H), 1.21 (d,  $J = 1.0$  Hz, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 177.13, 176.59, 170.31, 170.29, 153.28, 134.25, 129.21, 108.52, 90.08, 84.21, 70.28, 53.15, 52.19, 51.02, 50.89, 50.24, 42.40, 39.67, 36.37, 22.10, 20.92, 20.89, 16.86, 14.48 ppm.

MS (ESI<sup>-</sup>),  $m/z$ : 429 [M-H]<sup>-</sup>.

HRMS vypočítáno pro C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> ([M-H]<sup>-</sup>): 429,1549, nalezeno 429,1552.

### 5.3.2 Glykosylace acetylované kyseliny gibberelové–vznik látky II



Acetylovaná kyselina gibberelová **I** (0,232 mmol, 100mg, 1 ekviv.) byla společně s  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (**a**) (0,279 mmol, 91,7 mg, 1,2 ekviv.) a O-acetyl-glukopyranosyl bromidem (**c**) (0,279 mmol, 115 mg, 1,2 ekviv.) přidána za laboratorní teploty do DMF (**b**) (11.32 ml). Reakční směs byla míchána po dobu 24 h za RT. Poté byla směs zředěna vodou (30 ml), extrahována pomocí EtOAc (50 ml×3) a spojené organické vrstvy byly promyty 1.0M aq. NaOH (25 ml×2), vodou (30 ml), solankou (25 ml×3) a následně sušeny nad  $\text{MgSO}_4$ . Rozpouštědla pak byla odpařena na RVO a surový produkt **II** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; PE–EtOAc = 2:1→1:2). Po sloupcové chromatografii byl získán produkt **II** ve formě bílé krystalické látky (61 mg, 34 %).

#### Látka II

$\alpha_D^{20,1} = 90,1$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 6.38 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 5.89 (dd,  $J = 9.3, 3.8$  Hz, 1H), 5.81 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.34 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 5.25 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 5.21 – 5.18 (m, 1H), 5.18 – 5.10 (m, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.24 (dd,  $J = 12.4, 5.0$  Hz, 1H), 4.17 – 4.09 (m, 2H), 3.85 (ddd,  $J = 9.9, 4.9, 2.4$  Hz, 1H), 3.32 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 2.79 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 2.20 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 2.18 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 2.13 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 2.10 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.96 – 1.91 (m, 1H), 1.81 – 1.73 (m, 1H), 1.70 (dd,  $J = 13.4, 6.0$  Hz, 1H), 1.11 (s, 3H), 0.93 – 0.77 (m, 4H) ppm.

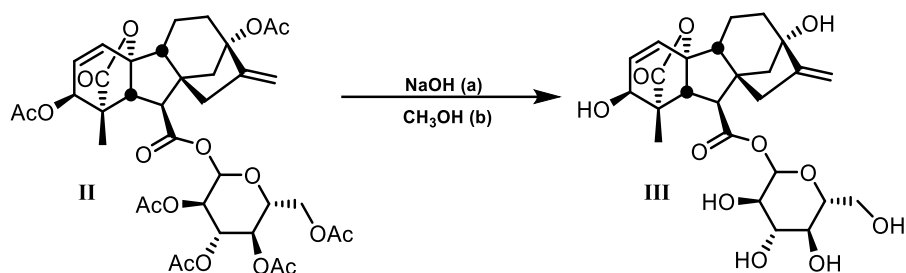
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  176.78, 170.57, 170.24, 170.21, 170.04, 169.74, 169.46, 169.10, 153.46, 134.30, 129.22, 108.40, 92.00, 89.86, 83.78, 72.85, 72.73, 70.13, 70.07, 68.01, 61.67, 53.40, 52.17, 51.32, 51.26, 50.21, 42.07, 36.07, 22.08, 20.87, 20.71, 20.67, 20.62, 16.95, 14.20 ppm.

MS ( $\text{ES}^+$ ),  $m/z$ : 778  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 799  $[\text{M}+\text{K}]^+$

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{KO}_{17}^+$  ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ): 799,2210, nalezeno 779,2218.



### 5.3.3 Deacetylace chráněného GA<sub>3</sub> β-D-glucopyranosyl esteru pomocí CH<sub>3</sub>ONa/NaOH v metanolu–příprava látky III



Látka **II** (0,0263 mmol, 20 mg, 1 ekviv.) byla rozpuštěna v CH<sub>3</sub>OH (**b**) (0,53 ml), ochlazena na 0 °C (voda/led) a míchána po dobu 5 min. 1,0M aq. NaOH (**a**) (26,3 μl, 1 ekviv.) byl přidán a výsledná reakční směs byla ponechána ohřát na RT a míchána po dobu 24 h. Reakce byla ukončena přidáním ionexu (Amberlite IRC 86). Výsledná reakční směs byla rozředěna pomocí CH<sub>3</sub>OH (3 ml), přefiltrována přes fritu a filtrát byl odpařen na RVO a poskytl 12 mg (90 %) látky **III**.

#### Látka **III**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.96 (broad s, 1H), 6.38 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.89 (ddd, *J* = 9.3, 3.7, 2.5 Hz, 1H), 5.24 – 5.13 (m, 1H), 5.00 – 4.95 (m, 1H), 4.87 (tq, *J* = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 4.71 (dd, *J* = 9.0, 6.8 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J* = 6.8, 3.7 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.31 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 10.9, 7.6 Hz, 1H), 2.84 – 2.77 (m, 2H), 2.72 (dd, *J* = 15.8, 10.8 Hz, 1H), 2.40 – 2.31 (m, 1H), 2.25 – 2.08 (m, 3H), 2.01 – 1.94 (m, 3H), 1.94 – 1.88 (m, 1H), 1.86 – 1.80 (m, 1H), 1.79 – 1.67 (m, 3H), 1.16 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ = 179.04, 178.89, 173.13, 172.89, 170.06, 158.79, 155.07, 134.06, 134.01, 132.80, 132.69, 108.01, 106.91, 91.11, 90.94, 84.66, 78.07, 70.13, 70.05, 54.24, 54.20, 53.46, 53.40, 52.26, 52.17, 51.83, 51.80, 51.63, 51.09, 45.48, 43.87, 43.07, 40.86, 39.85, 37.05, 21.86, 17.63, 17.48, 14.94 ppm.

MS (ES<sup>+</sup>), *m/z*: 509 [M+H]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>KO<sub>11</sub><sup>+</sup> ([M+K]<sup>+</sup>): 547,1576, nalezeno 547,1572.

## 5.4 Postup organické syntézy aminokyselinových konjugátů

Aby došlo k selektivnímu navázání aminokyseliny na molekulu GA<sub>4</sub> za vzniku peptidové vazby (přes atom dusíku), musela být zvolená aminokyselina nejdříve ochráněna vhodnou protektivní skupinou na atomu dusíku, následně ochráněna její karboxylová část, aby nakonec N-chránicí skupina byla odstraněna. Pak mohl být připraven odpovídající amid s GA<sub>4</sub>. Celková syntéza pak měla být zakončena selektivním odchráněním karboxylové funkční skupiny.

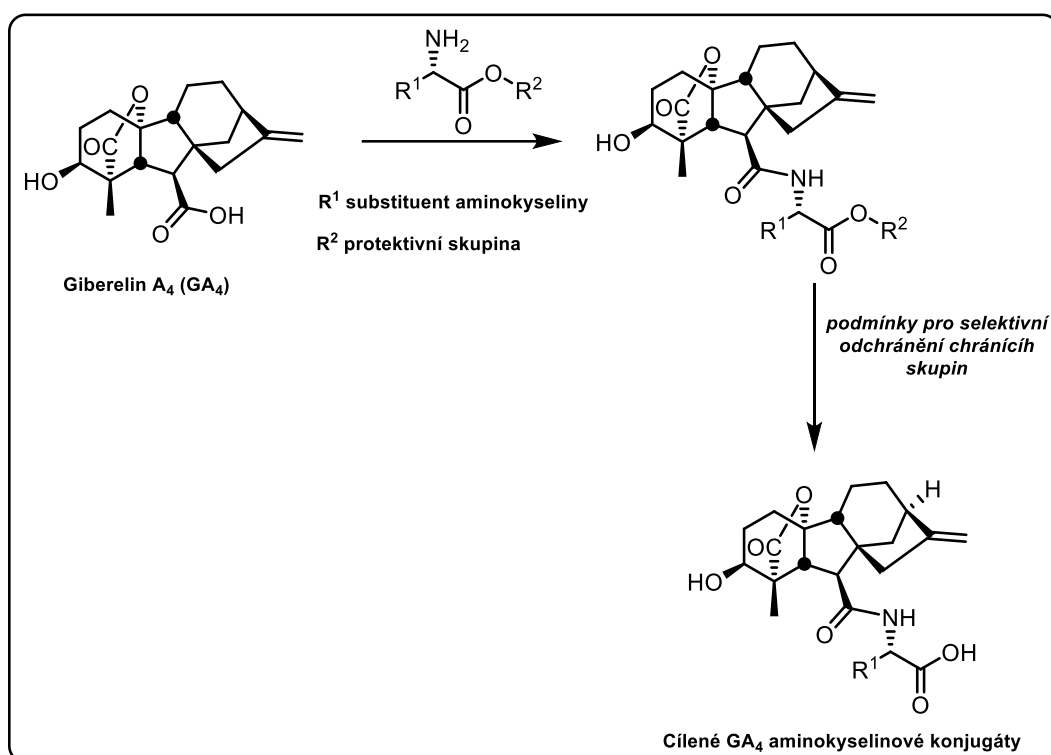
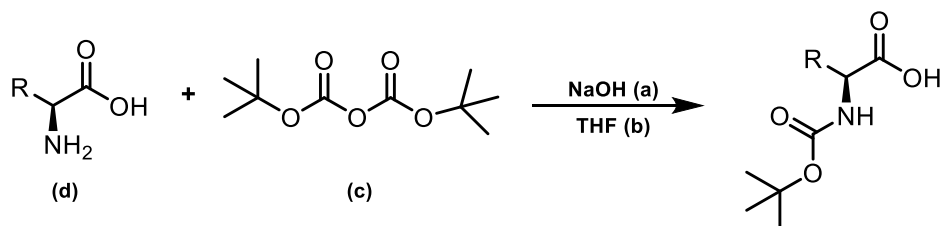


Schéma 6: Postup organické syntézy aminokyselinových konjugátů (experimentální část)

### 5.4.1 Ochránění aminokyseliny pomocí Di-tert-butyl dikarbonátu



Výchozí látka (d)	R	Podmínky	Produkt
L-Alanin (1 g, 10.2 mmol, 1 ekvív.)		a. (673 mg, 16.8 mmol, 1.5 ekvív. ) b. (5.01 ml, 61.2 mmol, 5.45 ekvív.) c. (3.185 g, 14.6 mmol, 1.3 ekvív.)	Boc-L-Ala-OH <b>IV</b> (1,93 g, 91 %)
L-Leucin (1 g, 7.62 mmol, 1 ekvív.)		a. (457 mg, 11.4 mmol, 1.5 ekvív.) b. (3.4 ml, 41.5 mmol, 5.45 ekvív.) c. (2.163 g, 9.91 mmol, 1.3 ekvív.)	Boc-L-Leu-OH <b>V</b> (1,57 g, 90 %)
L-Fenylalanin (1 g, 6.05 mmol, 1 ekvív.)		a. (331 mg, 8.28 mmol, 1.5 ekvív.) b. (2.46 ml, 30.1 mmol, 5.45 ekvív.) c. (1.57 g, 7.17 mmol, 1.3 ekvív.)	Boc-L-Phe-OH <b>VI</b> (1,59 g, 99 %)
L-Prolin (1 g, 8.51 mmol, 1 ekvív.)		a. (511 mg, 12.8 mmol, 1.45 ekvív.) b. (3.8 ml, 46.4 mmol, 5.45 ekvív.) c. (2.42 g, 11.1 mmol, 1.3 ekvív.)	Boc-L-Pro-OH <b>VII</b> (1,33 g, 73 %)

#### Standardní protokol

Výchozí aminokyselina (**d**) byla nasypána do vyžíhané baňky, do které bylo poté přidáno 5,6 ml destilované H<sub>2</sub>O. Následně byl roztok ochlazen v ledové lázni na 0 °C NaOH (**a**) bylo přidáno. Po 10 minutách při 0 °C byl po kapkách přikapáván roztok di-*tert*-butyl-dikarbonátu (**c**) v THF (**b**). Po ukončení přidávání byla chladicí lázeň odstraněna a reakce byla ponechána přes noc (8-10 h) pod inertní atmosférou. Poté byla reakční směs promyta pomocí petroletheru (10 ml×2). Vodná fáze byla okyselena 1.0M vodným roztokem HCl na pH = 1 (určeno pomocí pH papírku) a následně extrahována pomocí (50 ml×3). Spojené EtOAc fáze byly sušeny nad NaSO<sub>4</sub>, zfiltrovány a zkoncentrované na RVO. Surové produkty **IV–VII** byly dostatečně čisté (bílá krystalická látka, čistota >90 % dle <sup>1</sup>H NMR; látky nestabilní na HPLC) a mohly být bez dalšího dodatečného čištění využity v dalším kroku syntézy. Jednotlivé detaily naleznete v tabulce viz výše.

#### Látka IV

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 12.40 (s, 1H), 7.12 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 3.91 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.21 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  = 174.75, 155.31, 77.97, 48.84, 28.25, 17.07 ppm.

#### Látka V

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 12.39 (s, 1H), 7.04 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 3.89 (ddd,  $J$  = 10.6, 8.2, 4.6 Hz, 1H), 1.62 (td,  $J$  = 13.3, 6.3 Hz, 1H), 1.54 – 1.40 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.86 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H), 0.83 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 174.79, 155.68, 77.96, 51.82, 28.27, 24.40, 22.95, 21.26 ppm.

#### Látka VI

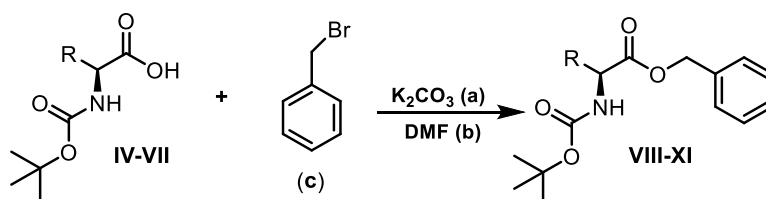
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 12.60 (s, 1H), 7.32 – 7.01 (m, 5H), 4.08 (ddd,  $J$  = 10.3, 8.3, 4.5 Hz, 1H), 3.01 (dd,  $J$  = 13.8, 4.5 Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J$  = 13.8, 10.4 Hz, 1H), 1.31 (s, 9H) ppm.

#### Látka VII

Z důvodu prolinového skeletu byly v reakční směsi přítomny dva konformery látky **VIII**. Kde to bylo možné, jednotlivé konformery jsou od sebe odlišeny (minor vs. major). Poměr Minor:Major = 1:1,3.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  = 11.03 (s, 4H), 4.36 (dd,  $J$  = 8.6, 2.9 Hz, 1H *major*), 4.25 (dd,  $J$  = 8.8, 4.5 Hz, 1H *minor*), 3.63 – 3.27 (m, 4H), 2.29 (dt,  $J$  = 13.0, 7.8 Hz, 2H), 2.01 – 1.84 (m, 4H), 1.49 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 9H *major*), 1.43 (s, 9H *minor*) ppm.

## 5.4.2 Ochránění Boc-aminokyselin IV-VII pomocí benzylobromidu. Příprava dichráněných aminokyselin VIII-XI



Výchozí látka	R	Podmínky	Produkt
IV Boc-L-Ala-OH (1,93 g, 10,2 mmol, 1 ekvív.)		a. (5.64 g, 44.8 mmol, 4 ekvív.) b. (102 ml) c. (2.44 ml, 20.4 mmol, 2 ekvív.)	Boc-L-Alanin benzyl ester VIII (2,49 g, 88 %)
V Boc-L-Leu-OH (1,57 g, 6,79 mmol, 1 ekvív.)		a. (3.75, 27.2 mmol, 4 ekvív.) b. (67.9 ml) c. (1.62 ml, 13.6 mmol, 2 ekvív.)	Boc-L-Leucin benzyl ester IX (1,74 g, 80 %)
VI Boc-L-Phe-OH (1,56 g, 5,86 mmol, 1 ekvív.)		a. (3.23 g, 23.4 mmol, 4 ekvív.) b. (58.4 ml) c. (1.4 ml, 11.7 mmol, 2 ekvív.)	Boc-L-Fenylalanin benzyl ester X (1,61 g, 77 %)
VII Boc-L-Pro-OH (1,33 g, 6,17 mmol, 1 ekvív.)		a. (3.41 g, 24.7 mmol, 4 ekvív.) b. (61.7 ml) c. (1.48 ml, 12,3 mmol, 2 ekvív.)	Boc-L-Prolin benzyl ester XI (1,28 g, 68 %)

### Standardní protokol

Výchozí látka **IV–VII** (množství viz tabulka) byla rozpuštěna v DMF (**b**) a  $K_2CO_3$  (**a**) byl přidán za RT. Po 5 minutách, BnBr (**c**) byl přidán a výsledná reakční směs byla ponechána reagovat při RT po dobu 12 h. Reakce byla ukončena přidávkem  $H_2O$  (ekvivalent objemu DMF) a výsledná směs byla extrahována pomocí EtOAc (3x 100 ml). Organické fáze byly zkombinovány, sušeny nad  $Na_2SO_4$ , zfiltrovány a zahuštěny nad RVO. Výsledný surový produkt **VIII–XI** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie ( $SiO_2$ ; PE–EtOAc = 20:1→5:1) a poskytl čistý produkt **VIII–XI** ve formě nažloutlých krystalických látek.

### Látka VIII

$$\alpha_D^{22,2} = -1,24 \quad (c = 1,0, CHCl_3)$$

$^1H$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.41 – 7.30 (m, 5H), 5.21 (d,  $J$  = 12.5 Hz, 1H), 5.15 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 1H), 5.06 (broad d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 4.38 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.40 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H) ppm.

$^{13}C$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 173.29, 155.18, 135.52, 128.64, 128.41, 128.18, 79.84, 67.01, 49.33, 28.36, 18.60 ppm.

MS ( $ES^+$ ),  $m/z$ : 302  $[M+Na]^+$ , 318  $[M+K]^+$

HRMS vypočítáno pro  $C_{15}H_{21}KNO_4^+$   $[M+K]^+$ : 318,1102, nalezeno 318,1107.

### Látka IX

$$\alpha_D^{23,3} = -11,3 \quad (c = 1,0, CHCl_3)$$

$^1H$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.43 – 7.31 (m, 5H), 5.20 (d,  $J$  = 12.5 Hz, 1H), 5.14 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 1H), 4.91 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 4.37 (td,  $J$  = 9.0, 5.2 Hz, 1H), 1.75 – 1.58 (m, 2H), 1.50 (ddd,  $J$  = 13.5, 9.3, 5.6 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 0.94 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 3H), 0.92 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 3H) ppm.

$^{13}C$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 173.50, 155.54, 135.62, 128.68, 128.44, 128.29, 79.94, 67.00, 52.29, 41.81, 28.43, 24.87, 22.94, 21.99 ppm.

MS ( $ES^+$ ),  $m/z$ : 360  $[M+K]^+$

HRMS vypočítáno pro  $C_{18}H_{27}KNO_4^+$   $[M+K]^+$ : 360,1572, nalezeno 360,1580.

### Látka X

$$\alpha_D^{23,4} = +1,1 \quad (c = 1,0, CHCl_3)$$

$^1H$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.39 – 7.18 (m, 8H), 7.05 (dd,  $J$  = 6.9, 2.5 Hz, 2H), 5.18 (d,  $J$  = 12.3 Hz, 1H), 5.12 (d,  $J$  = 12.3 Hz, 1H), 4.99 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.65 (dt,  $J$  = 8.4, 5.9 Hz, 1H), 3.12 (dd,  $J$  = 13.9, 6.0 Hz, 1H), 3.08 (dd,  $J$  = 15.0, 7.1 Hz, 1H), 1.43 (s, 9H) ppm.

$^{13}C$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 171.86, 155.20, 135.97, 135.29, 129.48, 128.71, 128.68, 128.65, 128.59, 127.10, 80.04, 67.23, 54.54, 38.37, 28.41 ppm.

MS ( $ES^+$ ),  $m/z$ : 395  $[M+K]^+$

HRMS vypočítáno pro  $C_{21}H_{25}KNO_4^+$   $[M+K]^+$ : 394,1415, nalezeno 394,1418.

### Látka XI

Z důvodu prolinového skeletu byly v reakční směsi přítomny dva konformery látky **VIII**. Kde to bylo možné, jednotlivé konformery jsou od sebe odlišeny (minor vs. major). Poměr Minor:Major = 1:1,7.

$$\alpha_D^{23,4} = -45,3 \quad (c = 1,0, CHCl_3)$$

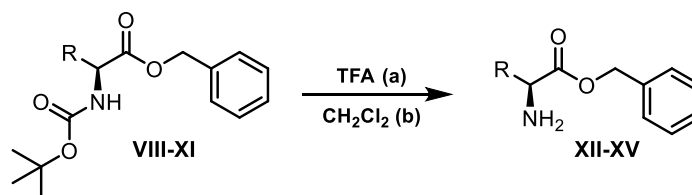
$^1H$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.60 – 7.30 (m, 5H), 5.26 (dd,  $J$  = 12.4, 1.9 Hz, 1H *minor*), 5.21 – 5.16 (m, 1H), 5.16 – 5.11 (m, 1H), 5.09 (dd,  $J$  = 12.5, 2.0 Hz, 1H *minor*), 4.39 (dd,  $J$  = 8.7, 3.3 Hz, 1H *minor*), 4.27 (ddd,  $J$  = 9.1, 4.2, 1.7 Hz, 1H), 3.65 – 3.34 (m, 2H), 2.30 – 2.13 (m, 1H), 2.04 – 1.80 (m, 3H), 1.47 (s, 9H *minor*), 1.35 (s, 9H) ppm.

$^{13}C$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 173.32, 173.07, 154.67, 154.06, 136.14, 135.92, 128.87, 128.75, 128.63, 128.59, 128.38, 128.26, 77.67, 77.42, 77.16, 66.87, 59.42, 59.16, 46.82, 46.59, 31.14, 30.16, 28.70, 28.49, 24.56, 23.87 ppm.

MS ( $ES^+$ ),  $m/z$ : 328  $[M+Na]^+$

HRMS vypočítáno pro  $C_{17}H_{23}KNO_4^+$   $[M+K]^+$ : 344,1259, nalezeno 344,1263.

### 5.4.3 Odchránění protektivní skupiny Boc z atomu dusíku derivátů VIII-XI



Výchozí látka	R	Podmínky	Produkt
VIII Boc-L-Alanin benzyl ester (2,49 g, 8,92 mmol, 1 ekviv.)		a. (29,7 ml) b. (29,7 ml)	<b>XII</b> L-Alanin benzyl ester (713 mg, 45 %)
IX Boc-L-Leucin benzyl ester (1,73 g, 5,37 mmol, 1 ekviv.)		a. (18 ml) b. (18 ml)	<b>XIII</b> L-Leucin benzyl ester (901 mg, 77 %)
X Boc-L-Fenylalanin benzyl ester (1,61 g, 4,53 mmol, 1 ekviv.)		a. (15,1 ml) b. (15,1 ml)	<b>XIV</b> L-Fenylalanin benzyl ester (905 mg, 78 %)
XI Boc-L-Prolin benzyl ester (1,28 g, 4,19 mmol, 1 ekviv.)		a. (14 ml) b. (14 ml)	<b>XV</b> L-Prolin benzyl ester (568 mg, 66 %)

#### Standardní protokol

Výchozí látka **VIII–XI** byla rozpuštěna v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (**b**) a výsledná směs byla ochlazena na  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . TFA (**a**) bylo přidáno a reakční směs byla nechána reagovat za  $0\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1,5 h. Reakční směs byla koncentrována na RVO z chladné ( $10\text{ }^\circ\text{C}$ ) lázně.

Poté byla směs naředěna pomocí  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) a výsledný roztok byl promyt nasyceným vodným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml), solankou (50 ml $\times$ 2), sušena nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zfiltrována a zahuštěna na RVO. Surové produkty **XII–XV** byly získány ve formě žlutých sirupovitých látek a byly použity v dalším kroku syntézy bez dalšího čištění. Látky byly čisté (>90 %) dle  $^1\text{H}$  NMR analýzy.

#### Látka XII

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 7.48 – 7.25 (m, 5H), 5.12 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 1H), 5.10 (s, 1H), 3.46 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 1.84 (s, 2H), 1.18 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 176.11, 136.31, 128.47, 128.01, 127.82, 65.47, 49.64, 20.59 ppm.

MS ( $\text{ES}^+$ ),  $m/z$ : 180  $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{KNO}_2^+$   $[\text{M}+\text{K}]^+$ : 218,0578, nalezeno 218,0577.

### Látka XIII

$$\alpha_{\text{D}}^{23,4} = -12,4 \quad (c = 1,0, \text{CHCl}_3)$$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 7.48 - 7.30$  (m, 5H), 5.16 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 3.52 (dd,  $J = 8.7, 5.6$  Hz, 1H), 1.78 (ddq,  $J = 13.1, 8.3, 6.6$  Hz, 1H), 1.59 (ddd,  $J = 13.8, 8.2, 5.6$  Hz, 1H), 1.45 (ddd,  $J = 13.6, 8.7, 6.1$  Hz, 1H), 0.94 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.92 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 176.61, 151.08, 135.86, 128.70, 128.40, 66.69, 53.05, 44.06, 24.86, 23.11, 21.98$  ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 222 [M+H]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{KNO}_2^+$  [M+K]<sup>+</sup>: 260,1047, nalezeno 260,1050.

### Látka XIV

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 7.42 - 7.21$  (m, 8H), 7.18 - 7.14 (m, 2H), 5.16 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 5.14 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 3.81 (dd,  $J = 7.6, 5.5$  Hz, 1H), 3.11 (dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz, 1H), 2.93 (dd,  $J = 13.6, 7.6$  Hz, 1H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 174.72, 136.96, 136.93, 135.52, 129.41, 128.80, 128.67, 128.65, 128.54, 128.49, 126.94, 66.89, 55.81, 55.78, 40.86, 40.80$  ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 256 [M+H]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{KNO}_2^+$  [M+K]<sup>+</sup>: 294,0891, nalezeno 294,0887.

### Látka XV

Z důvodu prolinového skeletu byly v reakční směsi přítomny dva konformery látky **VIII**. Kde to bylo možné, jednotlivé konformery jsou od sebe odlišeny (minor vs. major) pakliže je lze jednoznačně určit. Poměr *Minor:Major* = 1:1,9.

$$\alpha_{\text{D}}^{23,5} = -43,9 \quad (c = 1, \text{CHCl}_3)$$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 7.47 - 7.27$  (m, 5H), 5.24 - 5.07 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$  *minor*), 4.73 - 4.61 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$  *major*), 4.16 (dt,  $J = 16.1, 8.1$  Hz, 1H), 3.53 (dt,  $J = 11.3, 4.3$  Hz, 1H), 3.38 - 3.16 (m, 1H), 2.31 (ddh,  $J = 14.1, 7.0, 3.7$  Hz, 1H), 2.16 (dddd,  $J = 12.9, 10.7, 9.2, 7.2$  Hz, 1H), 2.02 (tqd,  $J = 11.0, 5.6, 2.7$  Hz, 1H), 1.90 (tddd,  $J = 15.9, 9.9, 8.0, 4.2$  Hz, 1H) ppm.

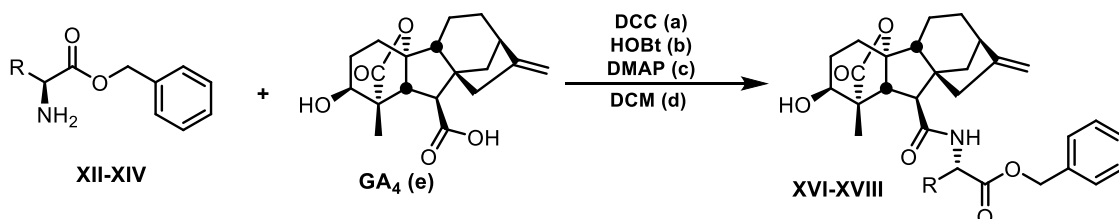
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 166.51, 141.15, 134.98, 128.79, 128.76, 128.61, 128.46, 127.65, 127.63, 127.08, 67.83, 65.30, 65.27, 60.62, 59.30, 46.21, 45.29, 29.43, 27.76, 24.42, 23.42$  ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 206 [M+H]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{KNO}_2^+$  [M+K]<sup>+</sup>: 244,0734, nalezeno 244,0730.



#### 5.4.4 Tvorba peptidu – reakce aminoesterů s GA<sub>4</sub>



Výchozí látka	R	Podmínky	Produkt
L-Alanin benzyl ester <b>XII</b> (100 mg, 0,558 mmol, 1 ekvív.)		a. (127 mg, 0,614 mmol, 1,1 ekvív.)	<b>GA<sub>4</sub> L-Alanin benzyl ester</b>  <b>XVI</b> (161 mg, 59 %)
		b. (75,4 mg, 0,558 mmol, 1 ekvív.)	
		c. (6,96 mg, 0,0558 mmol, 0,1 ekvív.)	
		d. (5,6 ml)	
		e. (189 mg, 0,558 mmol, 1 ekvív.)	
L-Leucin benzyl ester <b>XIII</b> (200 mg, 0,904 mmol, 1 ekvív.)		a. (205 mg, 0,994 mmol, 1,1 ekvív.)	<b>GA<sub>4</sub> L-Leucin benzyl ester</b>  <b>XVII</b> (169 mg, 35 %)
		b. (122 mg, 0,904 mmol, 1 ekvív.)	
		c. (11,3 mg, 0,0904 mmol, 0,1 ekvív.)	
		d. (9,4 ml)	
		e. (307 mg, 0,904 mmol, 1 ekvív.)	
L-Fenylalanin benzyl ester <b>XIV</b> (150 mg, 0,588 mmol, 1 ekvív.)		a. (133 mg, 0,648 mmol, 1,1 ekvív.)	<b>GA<sub>4</sub> L-Fenylalanin benzyl ester</b>  <b>XVIII</b> (148 mg, 44 %)
		b. (79,4 mg, 0,588 mmol, 1 ekvív.)	
		c. (7,32 mg, 0,0588 mmol, 0,1 ekvív.)	
		d. (5,9 ml)	
		e. (199 mg, 0,588 mmol, 1 ekvív.)	

#### Standardní protokol

Výchozí látka **XII–XV** byla rozpuštěna v bezvodém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**d**) a do této směsi byla postupně přidána za RT GA<sub>4</sub> (**e**), HOBt (**b**) a DMAP (**c**). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C (5 min, voda/led) a do tohoto roztoku bylo přidáno DCC (**a**) v bezvodém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml na 1 mmol). Reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 1 h a pak byla chladicí lázeň odstraněna a výsledná směs byla míchána při RT po dobu 24 h.

Reakce byla ukončena zkoncentrováním reakční směsi na RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; PE–EtOAc = 10:1→1:2) za vzniku jednotlivých produktů a to následovně:

**XVI**: Purifikace sloupcovou chromatografií byla dostačující a bylo dosaženo čistého produktu.

**XVII** a **XVIII** po sloupcové chromatografii museli být opět repurifikováni a to následovně: (1) nejprve neúspěšná purifikace pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; CHCl<sub>3</sub>–EtOAc 10:1→6:1) – vznik kontaminovaných produktů, takže (2) čištění pomocí semipreparativní kapalinové chromatografie.

Čisté produkty byly získány jako bílá krystalická látka.

### Látka XVI

$$\alpha_{\text{D}}^{23,6} = -14,5 \text{ (} c = 1,0, \text{CHCl}_3 \text{)}$$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.43 – 7.31 (m, 5H), 6.01 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 5.19 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 5.15 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 4.97 (dt,  $J$  = 2.9, 1.4 Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.68 (p,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 4.04 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 3.82 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1H), 3.56 – 3.43 (m, 1H), 3.27 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H), 2.63 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 2.42 (d,  $J$  = 10.7 Hz, 1H), 2.14 – 2.07 (m, 2H), 2.02 (ddt,  $J$  = 13.8, 7.8, 4.1 Hz, 2H), 1.94 (dd,  $J$  = 12.7, 3.8 Hz, 1H), 1.88 – 1.76 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 2H), 1.66 – 1.50 (m, 2H), 1.41 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.40 – 1.31 (m, 2H), 1.26 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 1.21 – 1.06 (m, 1H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 179.09, 172.57, 171.16, 157.24, 135.23, 128.76, 128.62, 128.35, 107.49, 94.47, 70.24, 67.40, 54.91, 53.77, 53.48, 51.38, 51.15, 48.16, 44.57, 38.98, 37.06, 34.02, 31.64, 28.09, 27.36, 25.70, 25.04, 18.43, 16.25, 14.70 ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 494 [M+H]<sup>+</sup>, 516 [M+Na]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{KNO}_6^+$  [M+K]<sup>+</sup>: 532,2096, nalezeno 532,2096.

### Látka XVII

$$\alpha_{\text{D}}^{24,1} = -25,0 \text{ (} c = 1,0, \text{CHCl}_3 \text{)}$$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.39 – 7.29 (m, 5H), 6.32 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 5.14 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 5.11 (d,  $J$  = 12.3 Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J$  = 3.1, 1.6 Hz, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.68 (td,  $J$  = 9.3, 4.2 Hz, 1H), 3.76 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 3.27 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H), 3.02 (s, 1H), 2.60 (dd,  $J$  = 8.0, 5.4 Hz, 1H), 2.49 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H), 2.06 (tdd,  $J$  = 15.4, 10.3, 5.2 Hz, 3H), 1.96 (dd,  $J$  = 12.1, 5.6 Hz, 1H), 1.89 – 1.74 (m, 3H), 1.72 (dd,  $J$  = 11.0, 2.3 Hz, 1H), 1.69 – 1.59 (m, 3H), 1.58 – 1.47 (m, 2H), 1.39 (td,  $J$  = 12.2, 7.8 Hz, 1H), 1.13 (s, 3H), 0.88 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 6H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 179.40, 179.35, 172.61, 171.83, 171.77, 157.29, 135.34, 128.69, 128.57, 128.50, 128.38, 107.43, 94.76, 94.72, 70.28, 67.22, 55.05, 55.02, 53.71, 53.22, 51.50, 51.02, 50.80, 44.55, 41.10, 41.07, 38.95, 37.05, 31.69, 28.13, 27.32, 24.81, 23.03, 21.47, 16.27, 14.57 ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 536 [M+H]<sup>+</sup>, 558 [M+Na]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{KNO}_6^+$  [M+K]<sup>+</sup>: 574.2565, nalezeno 574,2568.

## Látka XVIII

$$\alpha_D^{23,7} = -14,8 \quad (c = 1,0, \text{CHCl}_3)$$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 7.39 – 7.33 (m, 3H), 7.29 (dt,  $J$  = 6.4, 2.4 Hz, 2H), 7.22 (tdd,  $J$  = 4.7, 3.5, 1.4 Hz, 3H), 7.05 – 7.01 (m, 2H), 5.90 (dd,  $J$  = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 5.16 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H), 5.11 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H), 5.00 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.1, 5.6 Hz, 1H), 4.95 (dt,  $J$  = 2.7, 1.3 Hz, 1H), 4.87 – 4.82 (m, 1H), 3.78 (q,  $J$  = 1.3 Hz, 1H), 3.22 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H), 3.16 (dd,  $J$  = 14.1, 5.5 Hz, 1H), 3.04 (dd,  $J$  = 14.1, 7.2 Hz, 1H), 2.58 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 2.34 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H), 2.16 (d,  $J$  = 16.7 Hz, 1H), 2.05 (ddd,  $J$  = 13.2, 5.7, 2.3 Hz, 2H), 1.99 – 1.93 (m, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 4H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.56 – 1.44 (m, 2H), 1.37 (ddd,  $J$  = 13.0, 10.9, 7.7 Hz, 1H), 0.96 (s, 3H) ppm.

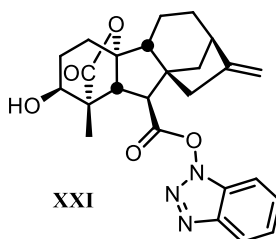
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 178.82, 171.38, 171.16, 157.05, 135.65, 134.97, 129.23, 128.83, 128.79, 128.76, 127.31, 107.52, 94.38, 70.37, 67.65, 54.66, 53.70, 53.38, 53.01, 51.50, 51.01, 44.55, 39.03, 38.16, 37.17, 31.61, 28.08, 27.43, 16.26, 14.68 ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 570 [M+H]<sup>+</sup>, 592 [M+Na]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro C<sub>35</sub>H<sub>39</sub>KNO<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+K]<sup>+</sup>: 608.2409, nalezeno 608,2411.

**U všech reakcí byly také izolovány a identifikovány vedlejší produkty XXI a XXII**

## Látka XXI



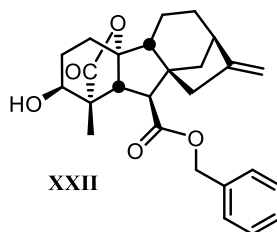
$$\alpha_D^{24} = +6,7 \quad (c = 1,0, \text{CHCl}_3)$$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 8.08 (dd,  $J$  = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 7.56 (ddd,  $J$  = 8.1, 7.0, 0.9 Hz, 1H), 7.44 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 7.33 (dt,  $J$  = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 5.09 (dq,  $J$  = 2.5, 1.3 Hz, 1H), 5.05 – 4.97 (m, 1H), 3.94 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 3.37 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 1H), 3.18 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 1H), 2.78 (dd,  $J$  = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 2.47 (dt,  $J$  = 15.0, 2.9 Hz, 1H), 2.31 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H), 2.23 – 2.12 (m, 2H), 2.11 – 2.03 (m, 1H), 2.00 – 1.73 (m, 8H), 1.72 – 1.55 (m, 3H), 1.50 – 1.43 (m, 1H), 1.37 (s, 3H), 1.19 – 1.04 (m, 2H) ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 450 [M+H]<sup>+</sup>, 488 [M+K]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>KN<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+K]<sup>+</sup>: 488,1582, nalezeno 488,1580.

## Látka XXII



$\alpha_D^{24,1} = -10,6$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

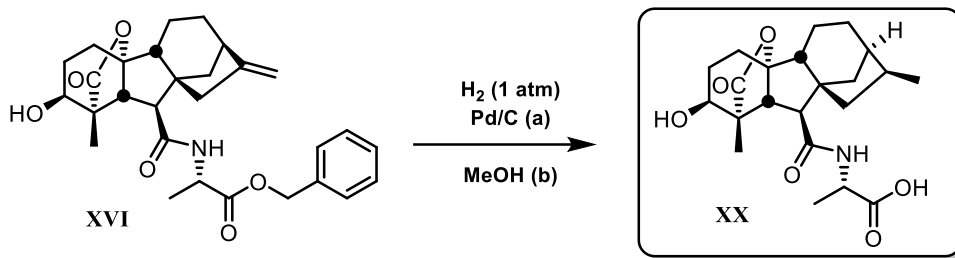
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 7.42 - 7.31$  (m, 5H), 5.19 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 5.10 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 4.95 (dt,  $J = 2.8, 1.4$  Hz, 1H), 4.80 (dt,  $J = 2.3, 1.2$  Hz, 1H), 3.83 (t,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 3.47 (tt,  $J = 10.5, 3.9$  Hz, 1H), 3.21 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H), 2.74 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 2.69 – 2.55 (m, 1H), 2.11 – 2.02 (m, 1H), 2.02 – 1.96 (m, 1H), 1.97 – 1.90 (m, 1H), 1.90 – 1.77 (m, 3H), 1.76 – 1.60 (m, 3H), 1.61 – 1.49 (m, 1H), 1.41 – 1.30 (m, 2H), 1.28 – 1.23 (m, 1H), 1.17 – 1.10 (m, 1H), 1.09 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta = 178.49, 172.68, 156.94, 135.67, 128.70, 128.51, 128.46, 107.49, 94.22, 70.26, 66.81, 54.59, 53.88, 51.67, 51.58, 51.26, 44.53, 38.89, 36.90, 33.96, 31.49, 28.16, 27.49, 25.68, 25.02, 16.22, 14.79$  ppm.

MS (ES<sup>+</sup>),  $m/z$ : 423 [M+H]<sup>+</sup>, 445 [M+Na]<sup>+</sup>, 461 [M+K]<sup>+</sup>

HRMS vypočítáno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{KO}_5^+$  [M+K]<sup>+</sup>: 461,1725, nalezeno 461,1728.

### 5.4.5 Odchránění benzylové skupiny



Látka **XVI** (50 mg, 0,101 mmol, 1 ekviv.) byla rozpuštěna v MeOH (6,5 ml, **b**) a ke vzniklému roztoku byl přidán 10 mol% Pd/C (5,39 mg, 0,00506 mmol, 0.05 ekviv.; **a**). Směs byla umístěna pod H<sub>2</sub> (1 atm) atmosféru a míchána 24h za RT. Reakce byla ukončena filtrací přes Celite<sup>®</sup> a filtrát byl odpařen na RVO za vzniku bílých krystalů (**XX**, 25 mg, 63 %). Látka **XX** byla izolována ve formě jediného diastereoizomeru na C16 (*d.r.* = >98:1 dle <sup>1</sup>H NMR).

#### Látka **XX**

$$\alpha_D^{24,2} = -0,4 \quad (c = 1, \text{CHCl}_3)$$

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 6.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.56 (dd, *J* = 9.0, 5.4 Hz, 1H), 3.80 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.37 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.20 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.56 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.01 – 1.83 (m, 5H), 1.83 – 1.65 (m, 4H), 1.60 (dtd, *J* = 18.7, 9.7, 8.9, 3.7 Hz, 2H), 1.55 – 1.46 (m, 2H), 1.42 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.37 – 1.28 (m, 2H), 1.14 (s, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.77 (dd, *J* = 11.7, 6.3 Hz, 1H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  = 179.69, 175.65, 171.95, 157.93, 94.80, 70.27, 55.02, 54.25, 53.26, 52.94, 50.88, 49.55, 48.25, 45.56, 40.80, 39.77, 34.49, 33.69, 30.89, 28.03, 27.46, 25.59, 24.89, 22.89, 18.40, 18.38, 16.51, 14.71 ppm.

MS (ES<sup>+</sup>), *m/z*: 406 [M+H]<sup>+</sup>, 428 [M+Na]<sup>+</sup>; MS (ES<sup>-</sup>), *m/z*: 404 [M-H]<sup>-</sup>

HRMS vypočítáno pro C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>KNO<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+K]<sup>+</sup>: 444,1788, nalezeno 444,1792.

---

# Výsledky

## 6 Organická syntéza cukerných a aminokyselinových konjugátů giberelinů A<sub>3</sub> a A<sub>4</sub>

Veškeré nově připravené látky byly podrobně charakterizovány a jejich postup přípravy byl řádně zaznamenán a popsán v kapitolách zabývajících se postupem organické syntézy cukerných a aminokyselinových konjugátů. Podařilo se získat řadu nových konjugátů, ovšem v některých případech naplánovaná syntéza neprobíhala dle daných představ a postup syntézy musí být v budoucích krocích pozměněn.

### 6.1 Syntéza GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru

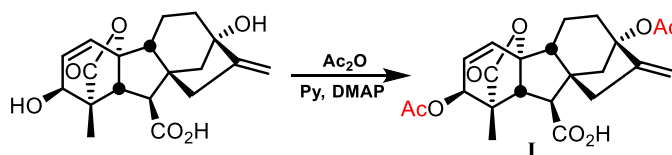


Schéma 7: Acetylace hydroxy skupin v poloze C3 a C13 (experimentální část)

U syntézy cukerných konjugátů byl hlavní cíl získání GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru. Výchozí látkou byla komerčně dostupná kyselina giberelová, která byla v prvním kroku ochráněna pomocí acetátových skupin. Acetylace hydroxy skupin v poloze C3 a C13 probíhala v adekvátním výtěžku, kdy bylo získáno 96 % látky I.

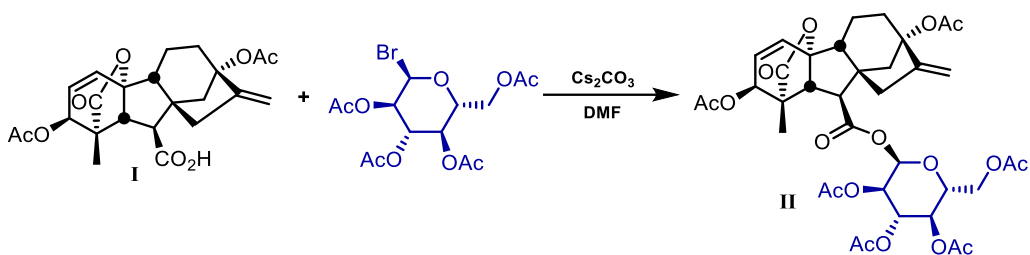


Schéma 8: Glykosylace (experimentální část)

Další krok zahrnoval glykosylaci komerčně dostupného 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glukopyranosyl bromidu na látku **I** přes karboxylovou skupinu za vzniku esteru **II**. Samotná reakce probíhala bez komplikací, ovšem problém se vyskytl ve stabilitě látky na sloupcové chromatografické koloně. V prvním případě po nasazení reakce byl surový produkt purifikován pomocí sloupcové chromatografie (stacionární fáze silikagel  $\text{SiO}_2$ ; mobilní fáze PE:EtOAc = 10:1  $\rightarrow$  1:2), kdy došlo k rozpadu látky na koloně. V druhém případě byla pozměněna eluce (PE:EtOAc = 2:1  $\rightarrow$  1:2), kdy se po purifikaci 136 mg surového produktu podařilo získat 60 mg čistého produktu **II** a to tedy 34 % z teoretického výtěžku reakce.

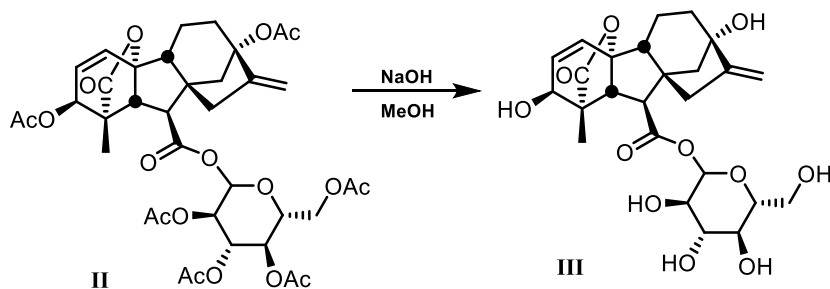
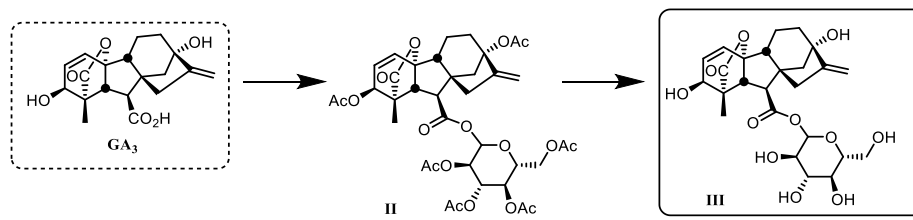


Schéma 9: Odchránění acetátových skupin (experimentální část)

Dalším cílem v postupu syntézy bylo selektivní ochránění acetátových skupin na glukóse u hexa-O-acetyl-GA<sub>3</sub>-glukopyranosyl esteru **II**. Pro ochránění acetátových skupin je známá Zamplenova metoda, kdy se používá metanol s metanolátem sodným. Ovšem z dohledané literatury bylo zjištěno, že není nezbytné využít jen metanolát sodný, ale může být adekvátně nahrazen hydroxidem sodným,<sup>45</sup> který se v našem případě po sérii provedených reakcí osvědčil nejlépe. Reakce s nejlepšími výsledky byla provedena s 1 ekvivalentem NaOH, 40 mg látky **II** a 1,05 ml MeOH. Reakce byla pro porovnání vlivu reakční doby na finální produkt rozdělena do 2 ekvivalentních částí. První polovina A byla nechána reagovat 96 hodin a druhá část B byla nechána reagovat 24 hodin. Dle LC-MS byla látka **III** přítomna v surové reakční směsi části B, kdy reakce probíhala 24 hodin.

U výsledného hrubého surového produktu **III** byla pozorována značně horší rozpustnost v chloroformu než u výchozí látky **II**. Výsledný produkt **III** z části B vážil 12 mg.



**Schéma 10: Přehled získaných zásadních molekul (experimentální část)**



## 6.2 Syntéza GA<sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů

Hlavní důvodem pro syntézu GA<sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů bylo získání GA<sub>4</sub> aminokyselinových biokonjugátů. Pro získání těchto látek byl navrhnut a probrán syntetický plán, jehož kroky jsou detailně popsány v kapitole o postupu organické syntézy aminokyselinových konjugátů. Pro syntézu byly vybrány čtyři aminokyseliny: *L*-alanin, *L*-leucin, *L*-fenylalanin a *L*-prolin.

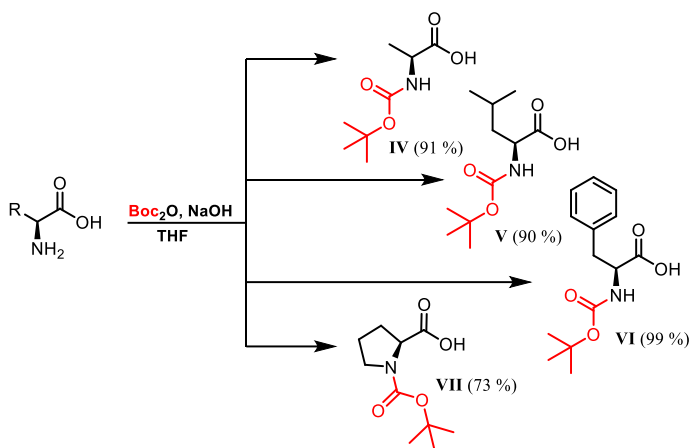


Schéma 11: Ochránění aminoskupiny pomocí Boc<sub>2</sub>O (experimentální část)

První reakcí v postupu syntézy bylo ochránění aminoskupiny u samotné aminokyseliny. Zde byl zvolen di-*tert*-butyl-dikarbonát jako reakční činidlo, které se běžně využívá v chemické syntéze peptidů. Reakce běžela s adekvátními výtěžky a nemusela být optimalizována. Tímto krokem bylo získáno 91 % látky **IV**, 90 % látky **V**, 99 % látky **VI** a 73 % látky **VII**.

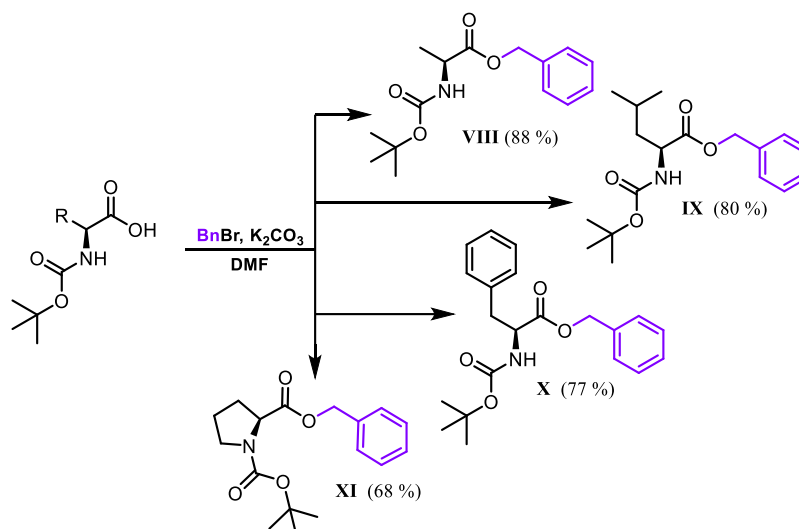


Schéma 12: Ochránění karboxylové skupiny s pomocí benzylbromidu (experimentální část)

Boc–aminokyseliny dále byly podrobeny ochráním karboxylové skupiny pomocí benzyl bromidu za vzniku boc–aminokyseliny benzyl esteru. Po purifikaci surových produktů přes sloupcovou chromatografickou kolonu bylo získáno 88 % látky **VIII**, 80 % **IX**, 77 % látky **X**, 68 % látky **XI**.

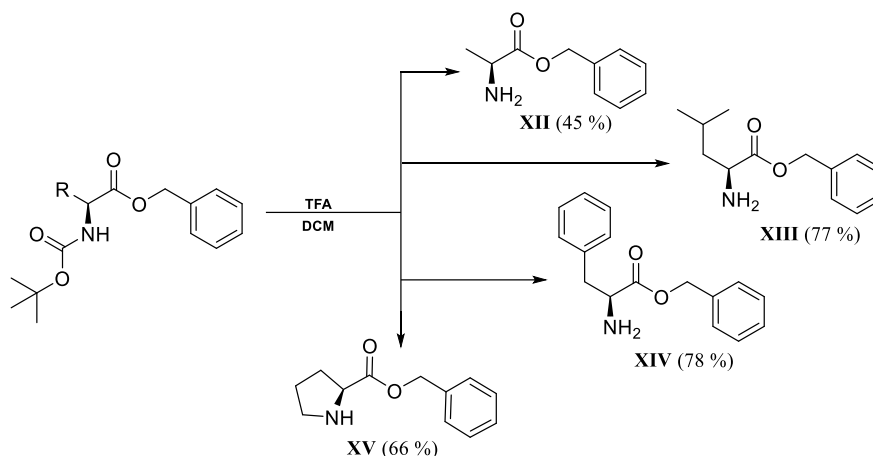


Schéma 13: Deprotekce boc skupiny (experimentální část)

U plně ochráněných aminokyseliny musela být ochráněna *N*-*tert*-butoxykarbonyl pro uvolnění aminové skupiny, což byl zásadní krok pro nadcházející kaplingovou reakci s GA<sub>4</sub>. Odchránění Boc skupiny bylo provedeno všeobecně známou reakcí s TFA a s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v poměru 1:1. Reakce vedla k získání relativně čistých produktů **XII** 45 %, **XIII** 77 %, **XIV** 78 % a **XV** 66 % které nepotřebovaly další dodatečnou purifikaci.

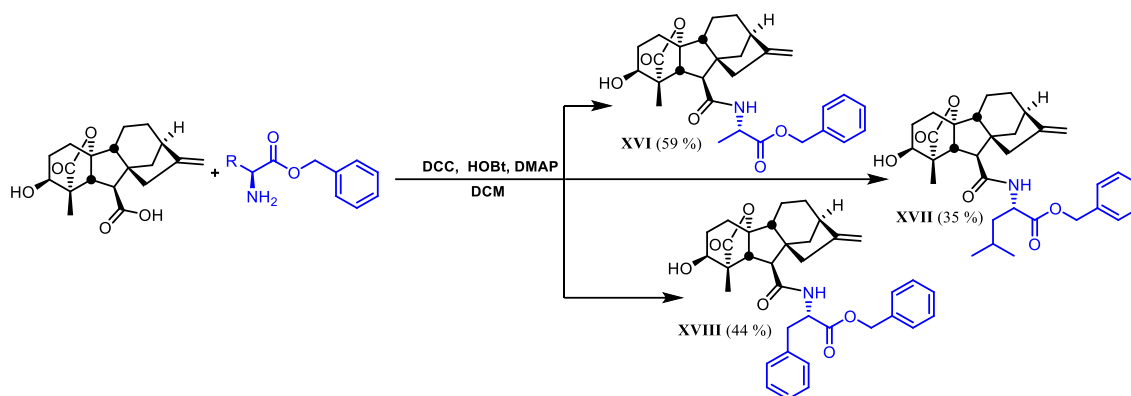


Schéma 14: Kaplingová reakce (experimentální část)

Připravené benzyl estery aminokyselin byly dále použity pro kaplingovou reakci s GA<sub>4</sub>, kdy byl použit reagent *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC). Po ukončení reakce vznikala směs dicyklohexylmočoviny (DCU), intermediátu a chtěného produktu. Posléze bylo zjištěno, že v reakční směsi vznikal i benzyl ester GA<sub>4</sub>. Purifikací na sloupcové chromatografické koloně se podařilo získat jednotlivé složky z hrubého produktu, ovšem čistý produkt se podařilo získat jen v případě látky **XVI** (59 %). Produkty **XVII** a **XVIII** musely být dodatečně purifikovány s využitím semipreparativní HPLC, kdy se podařilo získat 35 % čistého produktu **XVII** a 44 % čisté látky **XVIII**.

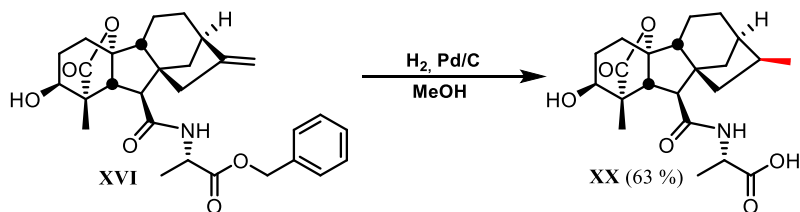


Schéma 15: Hydrogenace (experimentální část)

Posledním krokem bylo odchránění benzylové skupiny, kdy bylo finálním cílem získat GA<sub>4</sub> aminokyselinové konjugáty. Pro získání volné karboxylové skupiny byla zvolena hydrogenace s paládiem na aktivovaném uhlí. Bylo předpokládáno, že pro GA<sub>4</sub> to bude mít i nežádoucí redukcující účinek k vzhledem k přítomnosti dvojné vazby na D kruhu. Hydrogenací látky **XVI** bylo dosaženo čistého produktu **XX** o výtěžku 63 %. Pro získání GA<sub>4</sub> aminokyselinového konjugátu musel být tedy zvolen jiný způsob odchránění benzylové skupiny. Volba padla na použití FeCl<sub>3</sub> v suchém rozpouštědle DCM, kdy ovšem nebylo dosaženo našeho chtěného produktu a reakce bude podrobněji popsána v diskuzi.

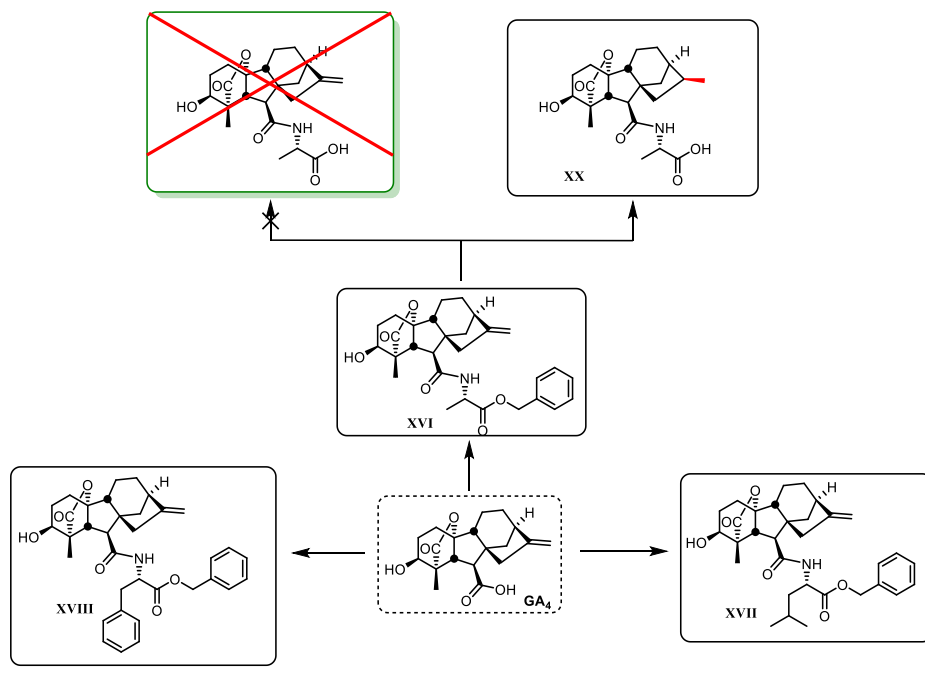


Schéma 16: Přehled zásadních získaných molekul (experimentální část)

---

# Diskuze

## 7 Organická syntéza

Práce se převážně zabývá potenciální rolí cukerných a aminokyselinových derivátů rostlinných růstových hormonů giberelinů, jedná o velmi zajímavé látky, které by mohli hrát důležitou roli při vývoji rostliny a při testování na giberelinové receptory by mohli dosahovat zajímavých výsledků. Jedním z hlavních cílů práce se zaměřuje na přípravu cukerného konjugátu giberelinu A<sub>3</sub>, konkrétně nasyntetizování GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru, a přípravou aminokyselinových konjugátů giberelinu A<sub>4</sub>. Syntéza aminokyselinových konjugátů vycházela ze čtyř aminokyselin *L*-alaninu, *L*-fenylalaninu, *L*-leucinu a *L*-prolinu. Aminokyseliny byly zvoleny na základě rozdílného strukturního charakteru.

V postupu jsou zahrnuty syntézy, které dosahovaly nejlepších výsledků a jsou zde detailně popsány. Výsledky organických syntéz obsahují přehled úspěšně nasyntetizovaných molekul a přiložená analytická data, která byla získána charakterizací molekul pomocí analytických metod. Níže se kapitoly 7.1 a 7.2 zabývají kompletním pozorováním navržených a provedených syntéz, kdy nebylo dosaženo předpokládaného výsledku, či reakce vykazovaly nižších výtěžků.

## 7.1 Syntéza GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru

Cílem bylo získání molekuly GA<sub>3</sub> glukopyranosyl esteru, který se některých vyšších rostlin přirozeně vyskytuje a předpokládá se, že zastupuje zásobní funkci giberelinů. Největším problémem, se kterým během syntézy bylo čeleno, byla samotná nestabilita GA<sub>3</sub>-glukopyranosyl esteru na chromatografických materiálech a šetrná deacetylace, aniž by reakce měla vliv na glykoesterovou vazbu látky.

Pro odchránění acetátových skupin chráněného GA<sub>3</sub> β-D-glucopyranosyl esteru byla zprvu zvolena Zemlenova metoda, která využívá CH<sub>3</sub>ONa v metanolu. Ovšem dle dohledané literatury je NaOH v MeOH stejně efektivní. Proto byla provedena série reakcí pro porovnání efektivity deacetylace.

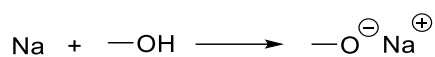
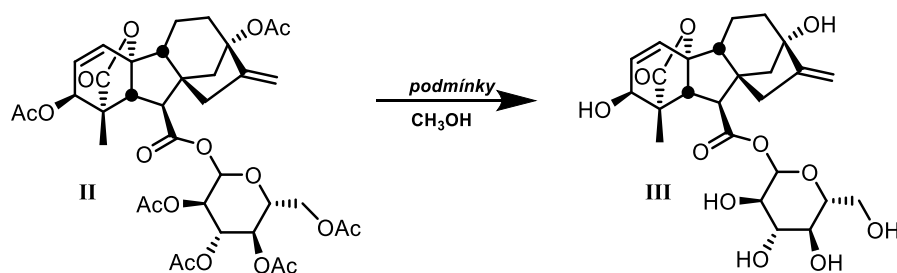


Schéma 17: Methoxid sodný (experimentální část)

Pro provedení Zemlenovy metody musel být použit roztok MeONa, který byl připraven následovně: Na vyžíhanou 100 ml trojhrdlou baňku byl napojen chladič a přikapávací nálevka s límečkem. Dále byl na baňku přiveden dusík a baňka byla vložena do ledové lázně. Do baňky byl přidán sodík (19.6 mmol, 450 mg, 1 ekviv.) a velice pomalu byl přikapáván MeOH (19,6 ml). Po rozpuštění Na (cca 40 min) byla reakce ukončena. Výsledný roztok CH<sub>3</sub>ONa byl o koncentraci  $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .



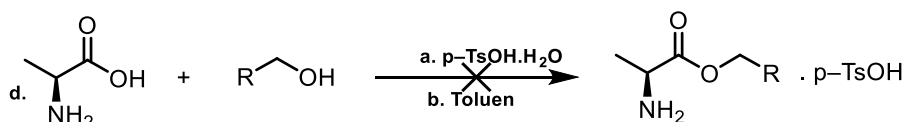
Výchozí látka II	podmínky	CH <sub>3</sub> OH	Produkt III
(0,0394 mmol, 30 mg, 1 ekviv.)	CH <sub>3</sub> ONa (0.00592 mmol, 5,92 μl, 0,15 ekviv.), 1h	(0,394 ml)	Nepotvrzen
(0,0394 mmol, 30 mg, 1 ekviv.)	CH <sub>3</sub> ONa (0.00592 mmol, 5,92 μl, 0,15 ekviv.), 24h	(0,789 ml)	Nepotvrzen
(0,0394 mmol, 30 mg, 1 ekviv.)	CH <sub>3</sub> ONa (0.0118 mmol, 11,8 μl, 0,3 ekviv.), 3h	(0,789 ml)	Přítomen
(0,0263 mmol, 20 mg, 1 ekviv.)	NaOH (0.00394 mmol, 1 M, 3,94 μl, 0,15 ekviv.), 24h	(0,526 ml)	Přítomen

Schéma 18: Deacetylace (experimentální část)

Nejprve byla série reakcí provedena s methoxidem sodným za různých podmínek. Ukázalo se, že u reakce s 0,3 ekvivalentem CH<sub>3</sub>ONa a reakční dobou 3 hodin, probíhá částečná deacetylace výchozí látky **II** a v malém zastoupení je přítomen i plně deacetylovaný produkt **III**. Posléze byla provedena reakce s vodným roztokem hydroxidu sodného 0,15 ekvivalentu o koncentraci  $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Po 24 hodinách byla reakce ukončena a výsledek reakce byl srovnatelný s reakcí CH<sub>3</sub>ONa. Další kroky vedly k nasazení reakce s 1 ekvivalentem NaOH, kdy byla reakce rozdělena do dvou částí reakční doby. Jedna část byla zpracována po 24 hodinách a druhá až po 96 hodinách. Plně deacetylovaný produkt **III** s adekvátním zastoupení byl přítomen u reakce, která probíhala 24 hodin. Reakce je tedy striktně závislá na reakční době, tedy rychlosti deacetylace za daných podmínek.

## 7.2 Syntéza GA<sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů

Dalším cílem bylo získání aminokyselinových konjugátů GA<sub>4</sub>. Hlavními body celkové syntézy byla kaplingová reakce a deprotektce chránících skupin. Zprvu bylo plánem ochránění karboxylové skupiny u aminokyselin pomocí esterifikace. Což by rovnou umožnilo poté přejít na kaplingovou reakci s GA<sub>4</sub>. Dle literatury by se mělo jednat o proveditelnou reakci se slušnými výtěžky<sup>46</sup>, ovšem v našem případě byl potvrzen opak.



Alkohol	R	Podmínky	Produkt
benzyl alkohol ( 36,4 ml, 337 mmol, 10 ekviv. )		a. ( 7,85 g, 40,4 mmol, 1,2 ekviv. ) b. ( 84 ml ) d. ( 3 g, 33,7 mmol, 1 ekviv. )	Aminokyselina ve formě p-toluensulfonové soli
prenyl alkohol ( 35,2 ml, 337 mmol, 10 ekviv. )		a. ( 7,85 g, 40,4 mmol, 1,2 ekviv. ) b. ( 84 ml ) d. ( 3 g, 33,7 mmol, 1 ekviv. )	Aminokyselina ve formě p-toluensulfonové soli

Schéma 19: Esterifikace aminokyselin (experimentální část)

Reakce byly provedeny následujícím postupem. Směs alkoholu, *L*-alaninu (**d**) a *p*TsOH.H<sub>2</sub>O byla rozpuštěna v toluenu (**b**) a následně refluxována 24 hodin za použití Dean Starkovy–aparatury. Po ochlazení byla vytvořená sůl odfiltrována, filtrační koláč byl promyt Et<sub>2</sub>O a poté byla sůl vysušena na fritě.

První reakce byly provedeny bez Dean Starkovy aparatury za využití pouze zpětného chladiče. Po neúspěšných pokusech, kdy bylo dosaženo pouze výchozího produktu ve formě *p*-toluensulfonové soli, bylo předpokládáno, že k esterifikaci nedochází, díky přítomnosti vody v reakční směsi. Další pokusy byly provedeny s Dean Starkovou aparaturou, která slouží k odstranění přítomné vody z reakční směsi a tím napomáhá průběhu esterifikace. Ovšem i přes využití Dean Starkovy aparatury, bylo opět dosaženo pouze výchozí látky a k našemu požadovanému produktu musela být zvolena jiná reakce.



Díky připojení *N*-Boc protektivní skupiny u aminokyselin pomocí di-*tert*-butyl-dikarbonátu, mohla být provedena benzylace karboxylové skupiny za účasti benzylbromidu v alkalickém prostředí, aniž by docházelo k bromaci aminoskupiny. Po odstranění Boc skupiny bylo dosaženo požadovaných benzylesterů aminokyselin **XII–XV**.

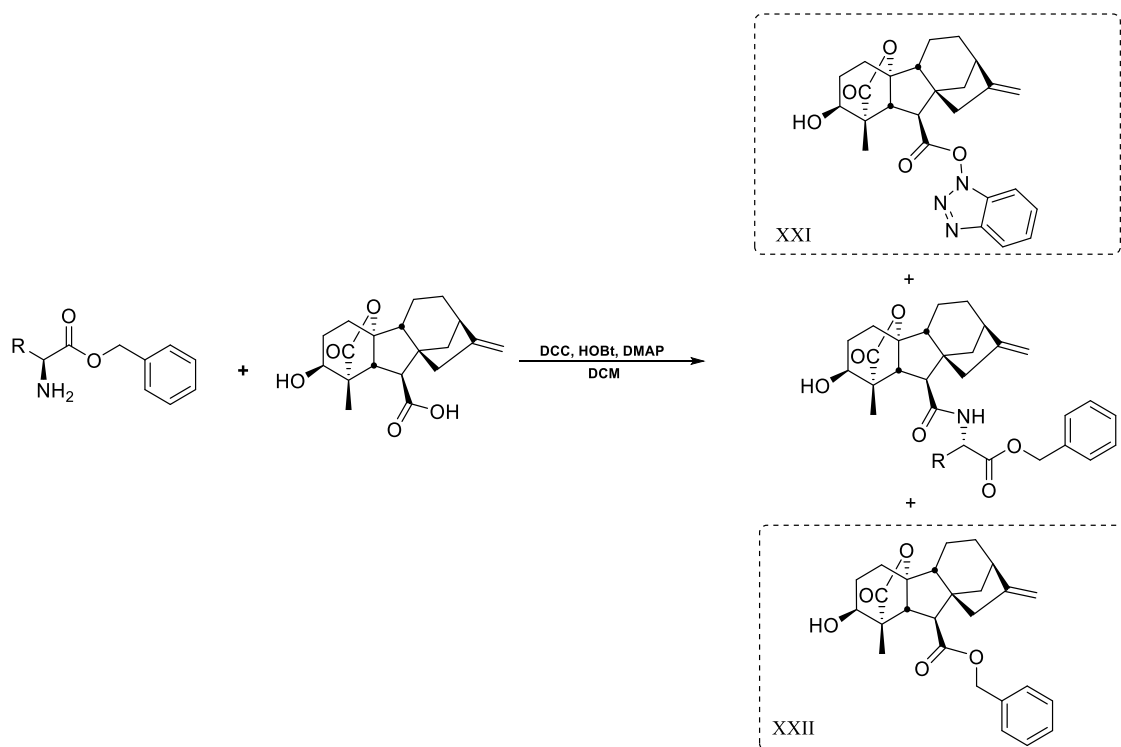


Schéma 20: Kaplingová reakce–vznik produktu, intermediátu a GA<sub>4</sub> benzylesteru (experimentální část)

Dalším krokem byla kaplingová reakce, kdy byl zprvu zvolen *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid. Po samotné syntéze musel být hrubý produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy se ukázalo, že v každém případě kaplingové reakce výchozích látek **XII–XV**, byl v hrubém produktu obsažen i GA<sub>4</sub> intermediát s HOBt **XXI** a GA<sub>4</sub> benzyl ester **XXII**. V našem případě izolovaný intermediát **XXI** během reakce vykazuje větší stabilitu, než by se předpokládalo a tím je značně ovlivněna reakční kinetika vzniku výsledného produktu. Ovšem překvapením pro nás byl vznik GA<sub>4</sub> benzyl esteru. Mohlo by se jednat o formu vedlejší reakce, kdy dochází k transesterifikaci mezi benzyl esterem aminokyseliny a molekulou GA<sub>4</sub>. Možnost, že by esterifikace GA<sub>4</sub> byla vedlejším produktem benzylace pomocí zbytkového benzyl alkoholu přítomného v reakční směsi lze vyloučit, protože tento nebyl pozorován v žádné výchozí látce.

Mezi vybranými aminokyselinami byl i *L*-prolin. Jedná se o jedinou aminokyselinu z 21 bioaktivních aminokyselin, která obsahuje sekundární amin. Pro svou charakteristickou strukturu bylo předpokládáno, že by vybrané reakce mohly probíhat s odlišnými výsledky, než tomu bylo doposud u ostatních aminokyselin. Jak je popsáno viz. kapitola 5.4 o postupu syntézy aminokyselinových konjugátů reakce s *L*-prolinem pro přípravu aminokyseliny probíhaly s přijatelnými výsledky. Problém se vyskytl teprve u samotné kaplingové reakce. Reakce byla provedena stejným postupem jako u ostatních aminokyselin, který je detailně popsán v kapitole 5.4.4.

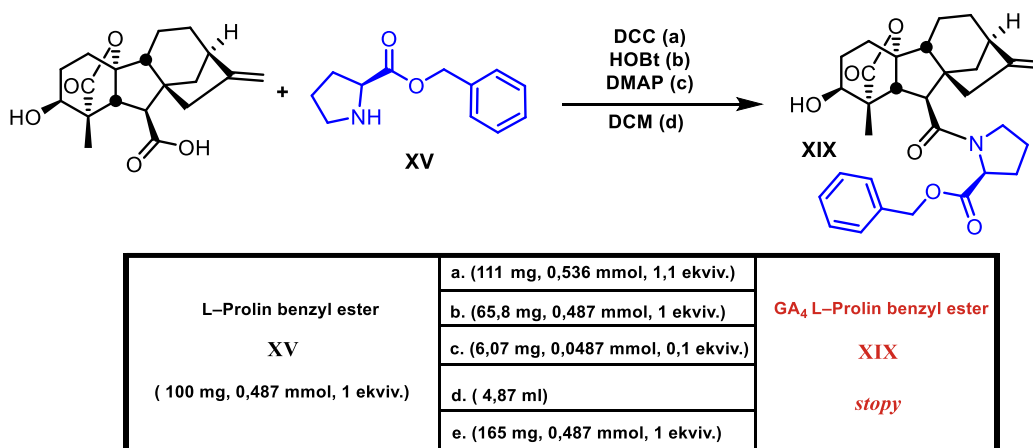


Schéma 21: Kaplingová reakce GA<sub>4</sub> a *L*-Prolin (experimentální část)

Po purifikaci hrubého produktu reakce pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; PE:EtOAc = 10:1 → 1:2), byly získány 3 frakce. Analýzou frakcí bylo zjištěno, že největší podíl produktu tvoří intermediát GA<sub>4</sub> s HOBt a to 139 mg. Další frakce odpovídá GA<sub>4</sub> benzyl esteru a poslední podíl z hrubého produktu o hmotnosti 73 mg dle NMR neodpovídal požadovanému produktu. Ovšem po analýze z HPLC–MS poslední frakce bylo zjištěno, že produkt **XIX** v reakční směsi přesto vzniká, ale velmi neochotně a je zastoupen pouze v minimálním množství. Aby reakce probíhala ve prospěch vzniku požadovaného produktu GA<sub>4</sub> *L*-prolin benzylesteru, musí být pro syntézu zvolen jiný postup.

### Látka XIX

MS (ES<sup>+</sup>), m/z: 520 [M+H]<sup>+</sup>, 558 [M+K]<sup>+</sup>

Pro porovnání efektivity kaplingových činidel pro syntézu GA<sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů, byla provedena i reakce s EDC.

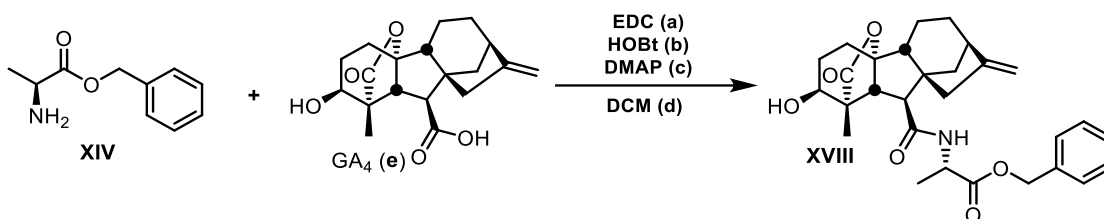


Schéma 22: Kaplingová reakce pomocí EDC (experimentální část)

Výchozí látka **XIV** rozpuštěna v suchém rozpouštědle DCM (**d**) (5,6 ml) byla přenesena do vyžíhané baňky pod inertní atmosférou. Dále byla přidána látka GA<sub>4</sub> (**e**) (189 mg, 0,558 mmol, 1 ekviv.), následně byl přidán HOBt (**b**) (75,4 mg, 0,558 mmol, 1 ekviv.) a DMAP (**c**) (6,96 mg, 0,0558 mmol, 0,1 ekviv.). Po ochlazení směsi na 0 °C byl přidán rozpuštěný EDC (**a**) (118 mg, 0,614 mmol, 1,1 ekviv.) v DCM (5 ml na 1 mmol). Chlazení reakční směsi bylo ukončeno po 1 hodině a dále byla směs ponechána reagovat přes noc za laboratorní teploty.

Po uplynutí 24 hodin byla reakční směs naředěna pomocí DCM (40 ml) a promyta 1.0M vodným roztokem HCl. Dále byla organická fáze promyta 10 % roztokem NaHCO<sub>3</sub> (15 ml) a solankou (10 ml×2). Organická fáze poté byla sušena nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Dle výsledku TLC (PE–EtOAc 2:1, vizualizace PMA a vanilin) byla provedena sloupcová chromatografie (SiO<sub>2</sub>; PE:EtOAc = 10:1→1:1), která poskytla produkt **XVI** o hmotnosti 32 mg (10 % výtěžek).

Porovnání bylo provedeno pouze u výchozí aminokyseliny *L*-alaninu, kdy bylo zjištěno, že syntéza s konjugačním činidlem DCC v našem případě poskytuje značně větší výtěžky a poměr zastoupení vedlejších produktů **XXI** a **XXII** je menší, než je tomu v případě EDC. Je možné, že v některých případech aminokyselin bude výtěžek srovnatelný či reakce s EDC bude probíhat lépe, ovšem u tohoto tvrzení je potřeba dalšího podrobného zkoumání.

Jelikož cílem bylo získání přirozeného GA<sub>4</sub> aminokyselinového konjugátu a hydrogenace za účasti paládia na aktivním uhlí ve finálním kroku syntézy redukuje i dvojnou vazbu na D kruhu, což se teoreticky i dalo předpokládat, musela být zvolena jiná metoda ochrání benzylové skupiny. Jako druhou variantou ochrání byla zvolena debenzylace pomocí lewisovy kyseliny FeCl<sub>3</sub> v bezvodém DCM.

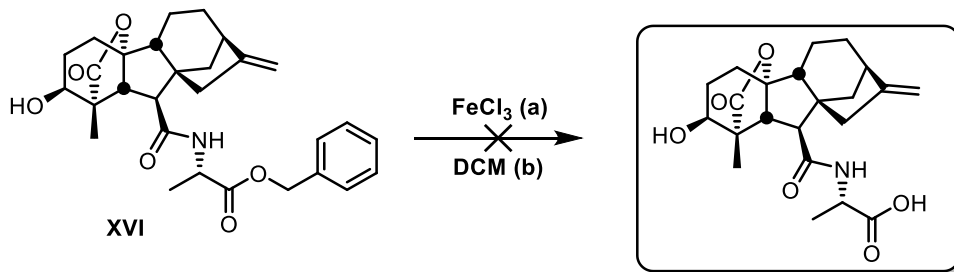


Schéma 23: Reakce s FeCl<sub>3</sub> (experimentální část)

Výchozí látka **XVI** byla rozpuštěna v suchém DCM a dále byl přidán FeCl<sub>3</sub> (1,1 ekviv., 18,1 mg, 0,111 mmol). Směs byla míchána za RT pod inertní atmosférou. Po 2 hodinách dle TLC byl stále přítomen výchozí produkt. Reakce nechána do druhého dne. Druhý den byl stále přítomen výchozí produkt, proto bylo do reakční směsi opět přidáno FeCl<sub>3</sub> (2,2 ekviv.). Po 30 minut od přidání zbylého FeCl<sub>3</sub> dle TLC výchozí produkt již nebyl přítomen. Po ukončení reakce byla směs 3x přefiltrována přes křemelinu pro maximální odstranění FeCl<sub>3</sub>. Přefiltrovaný produkt byl odpařena na RVO a analyzován pomocí <sup>1</sup>H NMR.

Po analýze bylo zjištěno, že reakce s FeCl<sub>3</sub> nevede k předpokládanému produktu a není tak vhodným reagentem pro ochrání benzylové skupiny. Bylo předpokládáno, že použití Lewisovy kyseliny bude vést k šetrné deprotekcí karboxylové skupiny, ale k našemu překvapení během reakce dochází k drastickým modifikacím finální molekuly. Modifikace jsou tak „divoké“, že nelze prozatím ani náznakem zjistit k jakým reakcím dochází. Analýza je neustále ve svém průběhu. Co je povzbudivé je fakt, že nedošlo za daných podmínek k destrukci výchozí látky, ale pouze k její transformaci.

---

## Závěr

Jak bylo v teoretické části ukázáno gibereliny jsou nedílnou součástí několika rostlinných organismů. Výskyt těchto látek v rostlinách vede k různým otázkám, ke kterým se snažíme postupem času nalézt správné odpovědi. Jedna z těchto otázek se právě týká přirozené přítomnosti biokonjugátů odvozených od struktury giberelinů v rostlinách. Zájem práce v experimentální části se soustředil na cukerné a aminokyselinové konjugáty a jejich možnou syntetickou přípravu pomocí novodobých postupů. U cukerných konjugátů bylo cílem získání GA<sub>3</sub>-glukopyranosyl esteru. Během postupu naplánované semisyntézy bylo zjištěno, že největší výzvou k finální molekule **III** je celková deacetylace a následná purifikace surového produktu. Bylo potvrzeno, že Zampfenova deacetyla využívající MeONa v metanolu, může být efektivně nahrazena NaOH v metanolu, kdy v případě použití NaOH bylo z části dosaženo kompletní deacetylace. Ovšem látka **III** byla získána pouze ve formě hrubého produktu, jelikož není dostatečně stabilní a při snaze chromatografické purifikace docházelo k rozložení látky.

V druhé polovině experimentální části se práce zabývá aminokyselinovými konjugáty GA<sub>4</sub>. Pro syntézu byly vybrány 4 aminokyseliny *L*-alanin, *L*-leucin, *L*-fenylalanin a *L*-prolin. Prvním a nezdařeným krokem syntézy byla esterifikace aminokyseliny za účasti *p*TsOH.H<sub>2</sub>O, kdy nebylo dosaženo chtěného esteru aminokyselin. Proto musela být zvolena 5 kroková syntéza, která nejprve zahrnovala protekci aminoskupiny pomocí Boc<sub>2</sub>O. Úspěšné kaplingové reakce benzyl esterů aminokyselin s GA<sub>4</sub> bylo dosaženo u 3 vybraných aminokyselin *L*-alaninu, *L*-leucinu a *L*-fenylalaninu, což vedlo k získání látek **XVI**, **XVII** a **XVIII**. U *L*-prolin benzyl esteru kaplingová reakce s DCC probíhala velmi neochotně, kdy v reakční směsi převládala tvorba intermediátu **XXI** GA<sub>4</sub> benzotriazol esteru a **XXII** GA<sub>4</sub> benzyl esteru. Ku překvapení během reakce pravděpodobně dochází k transesterifikaci mezi benzyl esterem aminokyseliny a molekulou GA<sub>4</sub>, neboť v každém případě reakce byl z reakční směsi izolován i právě zmiňovaný GA<sub>4</sub> benzyl ester **XXII**. Cílem bylo získání přirozených GA<sub>4</sub> aminokyselinových konjugátů, a proto byla látka **XVI** podrobena debenzylaci pomocí H<sub>2</sub>/Pd, což vedlo nejen odstranění benzylové skupiny, ale i k nežádoucí redukci dvojné vazby na D kruhu u struktury GA<sub>4</sub> a byla tak pouze získána látka **XX**.

---

## Seznam použité literatury

- (1) Gao, X.; Zhang, Y.; He, Z.; Fu, X. Gibberellins. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*; Jiayang Li, Chuanyou Li, S. M. S., Ed.; 2017; pp 107–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00004-9>.
- (2) Mander, L. N. Twenty Years of Gibberellin Research. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 49–69. <https://doi.org/10.1039/B007744P>.
- (3) 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>.
- (4) Schneider, G.; Schliemann, W. Gibberellin Conjugates: An Overview. *Plant Growth Regul.* **1994**, *15* (3), 247–260. <https://doi.org/10.1007/BF00029898>.
- (5) Roychoudhury, A.; Aftab, T. Phytohormones, Plant Growth Regulators and Signaling Molecules: Cross-Talk and Stress Responses. *Plant Cell Rep.* **2021**, *40* (8), 1301–1303. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02755-9>.
- (6) Ková, O. K. Ě.; Ure, V. E. T.; Ková, Ě. Nové Trendy v Analýze Fytohormonů. *Chem. List.* **2012**, *106*, 373–379.
- (7) Zhao, B.; Liu, Q.; Wang, B.; Yuan, F. Roles of Phytohormones and Their Signaling Pathways in Leaf Development and Stress Responses. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (12), 3566–3584. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07908>.
- (8) Leyser, O. Auxin Signaling. *Plant Physiol.* **2018**, *176* (1), 465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>.
- (9) Hedden, P. Gibberellins. *Encycl. Appl. Plant Sci.* **2016**, *1*, 411–420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00219-7>.
- (10) Sabarinathan Kuttalingam Gopalasubramaniam, Uthandi Sivakumar, M.; Govindarajan, G. and K. Screening and Development of Effective Mutants of *Fusarium Fujikuroi*. *Madras Agric. J.* **2020**, 1–4. <https://doi.org/10.29321/MAJ.S.000450>.
- (11) Camara, M. C.; Vandenberghe, L. P. S.; Sextos, G. C.; Tanobe, V. O. A.; Magalhães Junior, A. I.; Soccol, C. R. Alternative Methods for Gibberellic Acid Production, Recovery and Formulation: A Case Study for Product Cost Reduction. *Bioresour. Technol.* **2020**, *309* (January), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123295>.
- (12) Werle, L. B.; Abaide, E. R.; Felin, T. H.; Kuhn, K. R.; Tres, M. V.; Zabet, G. L.; Kuhn, R. C.; Jahn, S. L.; Mazutti, M. A. Gibberellic Acid Production from *Gibberella Fujikuroi* Using Agro-Industrial Residues. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *25* (March), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2020.101608>.
- (13) Camara, M. C.; Vandenberghe, L. P. S.; Rodrigues, C.; de Oliveira, J.; Faulds,

- C.; Bertrand, E.; Soccol, C. R. Current Advances in Gibberellic Acid (GA3) Production, Patented Technologies and Potential Applications. *Planta* **2018**, *248* (5), 1049–1062. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2959-x>.
- (14) Mander, L. N. The Chemistry of Gibberellins: An Overview. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (4), 573–612. <https://doi.org/10.1021/cr00012a005>.
- (15) Hanson, J. R. James R. Hanson. **1997**, *8* (17), 93–106. <https://doi.org/10.1039/NP9971400245>.
- (16) Yamaguchi, S. Gibberellin Metabolism and Its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>.
- (17) Sembdner, A. G.; Borgmann, E.; Schneider, G.; Liebisch, H. W.; Miersch, O.; Adam, G.; Lischewski, M.; Schreiber, K. Biological Activity of Some Conjugated Gibberellins. **1976**, *132* (3), 249–257. <https://doi.org/10.1007/BF00399724>.
- (18) Alferez, F.; de Carvalho, D. U.; Boakye, D. Interplay between Abscisic Acid and Gibberellins, as Related to Ethylene and Sugars, in Regulating Maturation of Non-Climacteric Fruit. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms22020669>.
- (19) Kou, E.; Huang, X.; Zhu, Y.; Su, W.; Liu, H.; Sun, G.; Chen, R.; Hao, Y.; Song, S. Crosstalk between Auxin and Gibberellin during Stalk Elongation in Flowering Chinese Cabbage. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83519-z>.
- (20) Sun, T. ping. Gibberellin-GID1-DELLA: A Pivotal Regulatory Module for Plant Growth and Development. *Plant Physiol.* **2010**, *154* (2), 567–570. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161554>.
- (21) Djakovic-Petrovic, T.; Wit, M. De; Voesenek, L. A. C. J.; Pierik, R. DELLA Protein Function in Growth Responses to Canopy Signals. *Plant J.* **2007**, *51* (1), 117–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03122.x>.
- (22) Gao, X. H.; Huang, X. Z.; Xiao, S. L.; Fu, X. D. Evolutionarily Conserved DELLA-Mediated Gibberellin Signaling in Plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2008**, *50* (7), 825–834. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00703.x>.
- (23) Schwechheimer, C. Gibberellin Signaling in Plants - The Extended Version. *Front. Plant Sci.* **2012**, *2* (JAN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00107>.
- (24) Kildegaard, K. R.; Arnesen, J. A.; Adiego-Pérez, B.; Rago, D.; Kristensen, M.; Klitgaard, A. K.; Hansen, E. H.; Hansen, J.; Borodina, I. Tailored Biosynthesis of Gibberellin Plant Hormones in Yeast. *Metab. Eng.* **2021**, *66* (February), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.03.010>.
- (25) Banerjee, A.; Sharkey, T. D. Methylerythritol 4-Phosphate (MEP) Pathway Metabolic Regulation. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (8), 1043–1055. <https://doi.org/10.1039/c3np70124g>.
- (26) 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>.
- (27) Helliwell, C. A.; Sullivan, J. A.; Mould, R. M.; Gray, J. C.; James Peacock, W.; Dennis, E. S. A Plastid Envelope Location of Arabidopsis Ent-Kaurene Oxidase Links the Plastid and Endoplasmic Reticulum Steps of the Gibberellin Biosynthesis Pathway. *Plant J.* **2001**, *28* (2), 201–208. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01150.x>.
- (28) Salazar-Cerezo, S.; Martínez-Montiel, N.; García-Sánchez, J.; Pérez-y-Terrón, R.; Martínez-Contreras, R. D. Gibberellin Biosynthesis and Metabolism: A Convergent Route for Plants, Fungi and Bacteria. *Microbiol. Res.* **2018**, *208* (January), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>.
- (29) Band, L. R.; Preston, S. P. Parameter Inference to Motivate Asymptotic Model Reduction: An Analysis of the Gibberellin Biosynthesis Pathway. *J. Theor. Biol.* **2018**, *457*, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.05.028>.
- (30) Kosakivska, I. V. Gibberellins in Regulation of Plant Growth and Development Under Abiotic Stresses. *Biotechnol. Acta* **2021**, *14* (2), 5–18. <https://doi.org/10.15407/biotech14.02.005>.
- (31) Magome, H.; Nomura, T.; Hanada, A.; Takeda-Kamiya, N.; Ohnishi, T.; Shinma, Y.; Katsumata, T.; Kawaide, H.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S. CYP714B1 and CYP714B2 Encode Gibberellin 13-Oxidases That Reduce Gibberellin Activity in Rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (5), 1947–1952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215788110>.
- (32) Dayan, J.; Schwarzkopf, M.; Avni, A.; Aloni, R. Enhancing Plant Growth and Fiber Production by Silencing GA 2-Oxidase. **2010**, 425–435. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00480.x>.
- (33) Zhu, Y.; Nomura, T.; Xu, Y.; Zhang, Y.; Peng, Y.; Mao, B. ELONGATED UPPERMOST INTERNODE Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. **2006**, *18* (February), 442–456. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038455.2>.
- (34) Fu, X.; Harberd, N. P. Auxin Promotes Arabidopsis Root Growth by Modulating Gibberellin Response. *Nature* **2003**, *421* (6924), 740–743. <https://doi.org/10.1038/nature01387>.
- (35) Frigerio, M.; Alabadí, D.; Pérez-Gómez, J.; García-Cárcel, L.; Phillips, A. L.; Hedden, P.; Blázquez, M. A. Transcriptional Regulation of Gibberellin Metabolism Genes by Auxin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2006**, *142* (2), 553–563. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084871>.
- (36) Piotrowska, A.; Bajguz, A. Conjugates of Abscisic Acid , Brassinosteroids , Ethylene , Gibberellins , and Jasmonates Q. *Phytochemistry* **2011**, *72* (17), 2097–2112. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.012>.
- (37) Schneider, G.; Sembner, K.; Schreiber, Bernard O., P. Partial Synthesis of Some Physiologically Relevant Gibberellin Glucosyl Conjugates. *Tetrahedron* **1989**, *45* (5), 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(89\)80134-6](https://doi.org/10.1016/0040-4020(89)80134-6).
- (38) Barendse, A. G. W. M.; Klerk, G. J. M. De; Planta, S. The Metabolism of



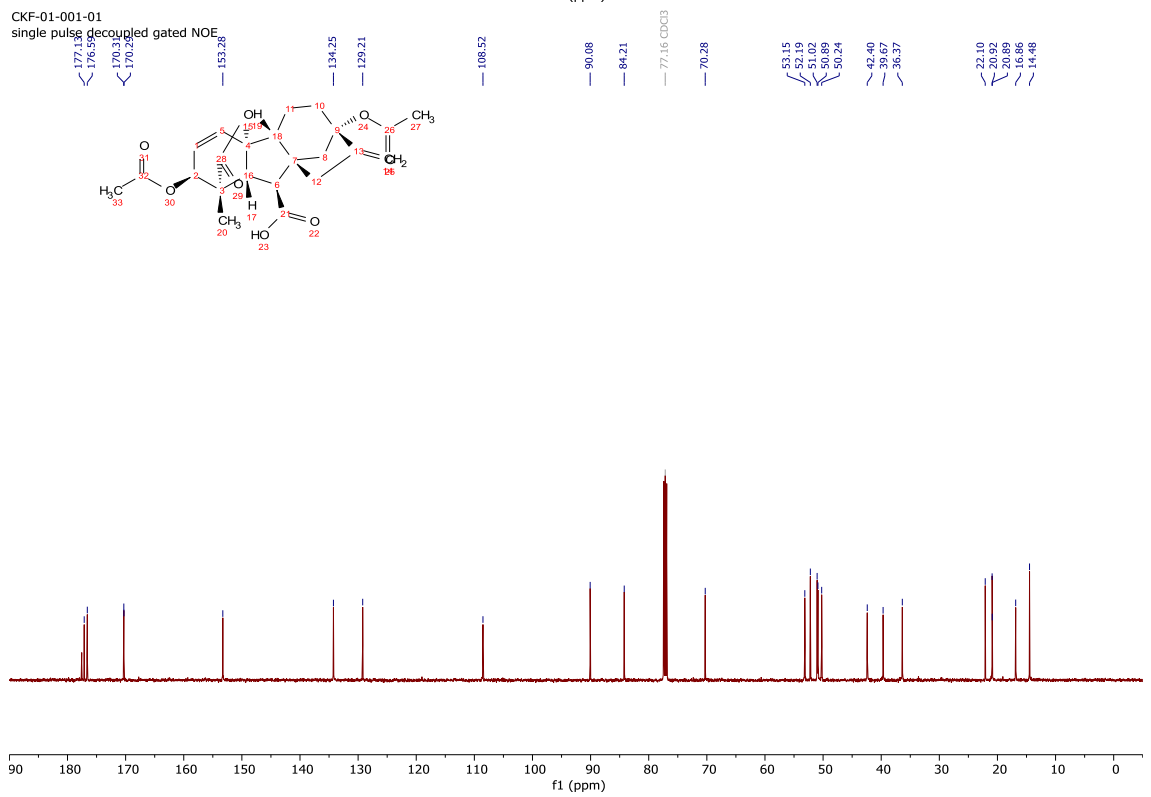
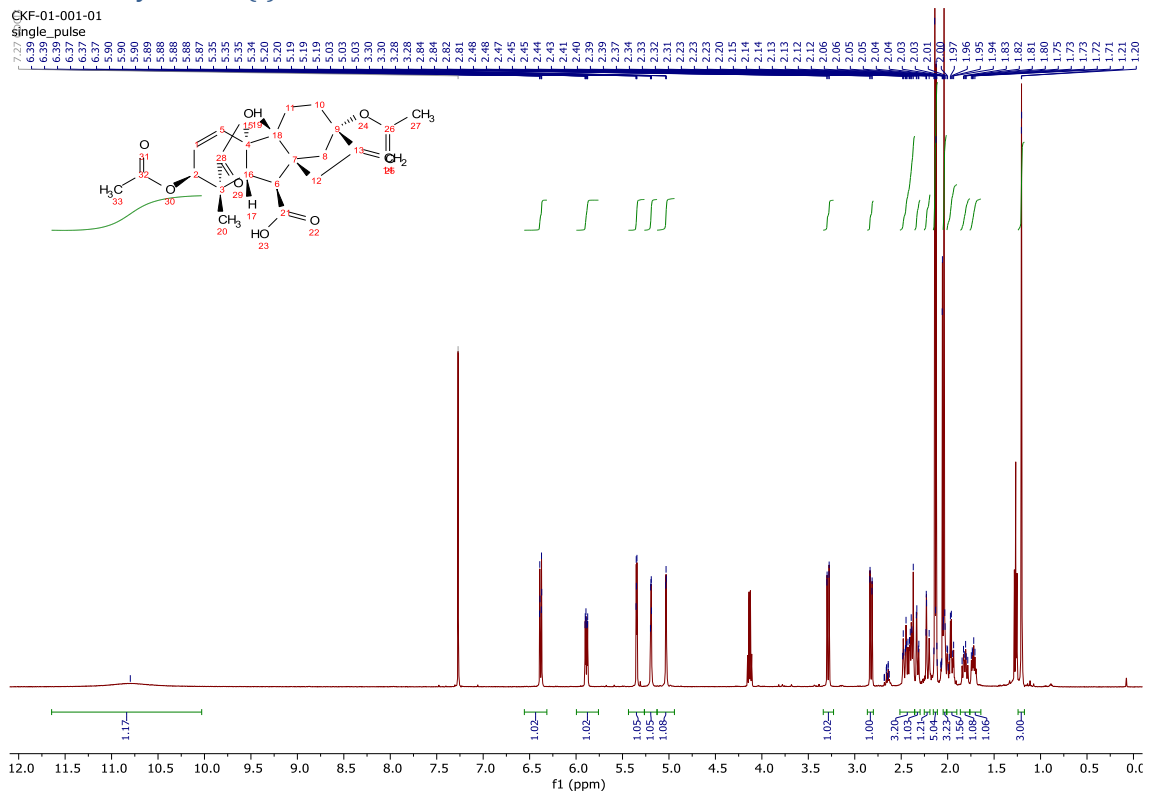
- Applied Gibberellic Acid in *Pharbitis Nil Choisy*: Tentative Identification of Its Sole Metabolite as Gibberellic Acid Glucoside and Some of Its Properties. *Planta* **1975**, *126* (1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/BF00389357>.
- (39) White, P. J. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*; Marschner, P., Ed.; 2012; pp 49–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00003-0>.
- (40) Dathe, W.; Sembdner, G.; Yamaguchi, I.; Takahashi, N. Gibberellins and Growth Inhibitors in Spring Bleeding Sap, Roots and Branches of *Juglans Regia* L. *Plant Cell Physiol.* **1982**, *23* (1), 115–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076319>.
- (41) Stephan, M.; Bangerth, F.; Schneider, G. Transport and Metabolism of Exogenously Applied Gibberellins to *Malus Domestica* Borkh. Cv. Jonagold. *Plant Growth Regul.* **2001**, *33* (2), 77–85. <https://doi.org/10.1023/A:1017589530354>.
- (42) Hua, Y.; Ekkhara, W.; Sansenya, S.; Srisomsap, C.; Roytrakul, S.; Saburi, W.; Takeda, R.; Matsuura, H.; Mori, H.; Ketudat Cairns, J. R. Identification of Rice Os4BGlu13 as a  $\beta$ -Glucosidase Which Hydrolyzes Gibberellin A4 1-O- $\beta$ -d-Glucosyl Ester, in Addition to Tuberonic Acid Glucoside and Salicylic Acid Derivative Glucosides. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *583*, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.021>.
- (43) Koshioka, M.; Takeno, K.; Beall, F. D.; Pharis, R. P. Purification and Separation of Plant Gibberellins from Their Precursors and Glucosyl Conjugates. *Plant Physiol.* **1983**, *73* (2), 398–406. <https://doi.org/10.1104/pp.73.2.398>.
- (44) Adam, G.; Lischewski, M.; Sych, F.-J.; Ulrich, A. GIBBERELLINE-XLVI' SYNTHESE VON GIBBERELLIN-AMINOSAURE-KONJUGATEN. *Tetraherdon* **1977**, *33*, 95–100. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)80438-9](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)80438-9).
- (45) Ren, B.; Wang, M.; Liu, J.; Ge, J.; Zhang, X.; Dong, H. Zemplén Transesterification: A Name Reaction That Has Misled Us for 90 Years. *Green Chem.* **2015**, *17* (3), 1390–1394. <https://doi.org/10.1039/c4gc02006e>.
- (46) Bolchi, C.; Bavo, F.; Pallavicini, M. One-Step Preparation of Enantiopure l- or d-Amino Acid Benzyl Esters Avoiding the Use of Banned Solvents. *Amino Acids* **2017**, *49* (5), 965–974. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2400-y>.

---

## Přílohy

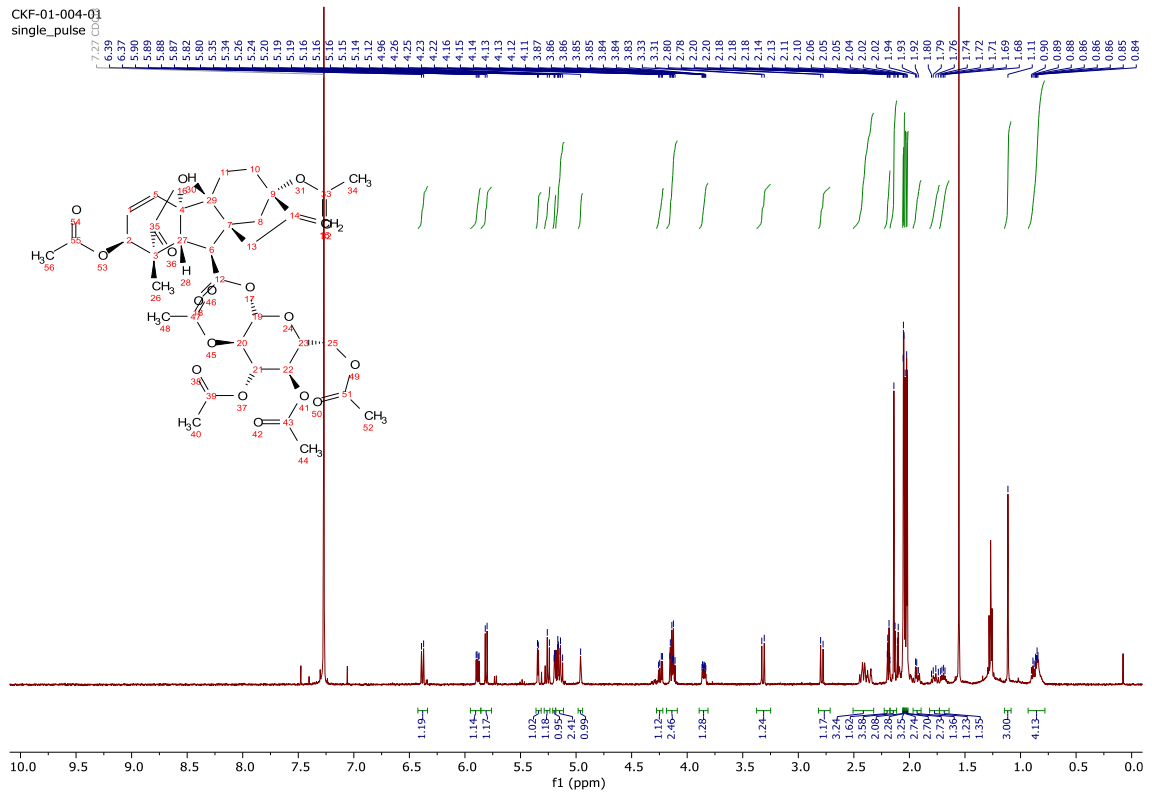
Kopie  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter

(1S,2S,4aR,4bR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-diacetoxy-1-methyl-8-methylene-13-oxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulene-10-carboxylic acid (I)

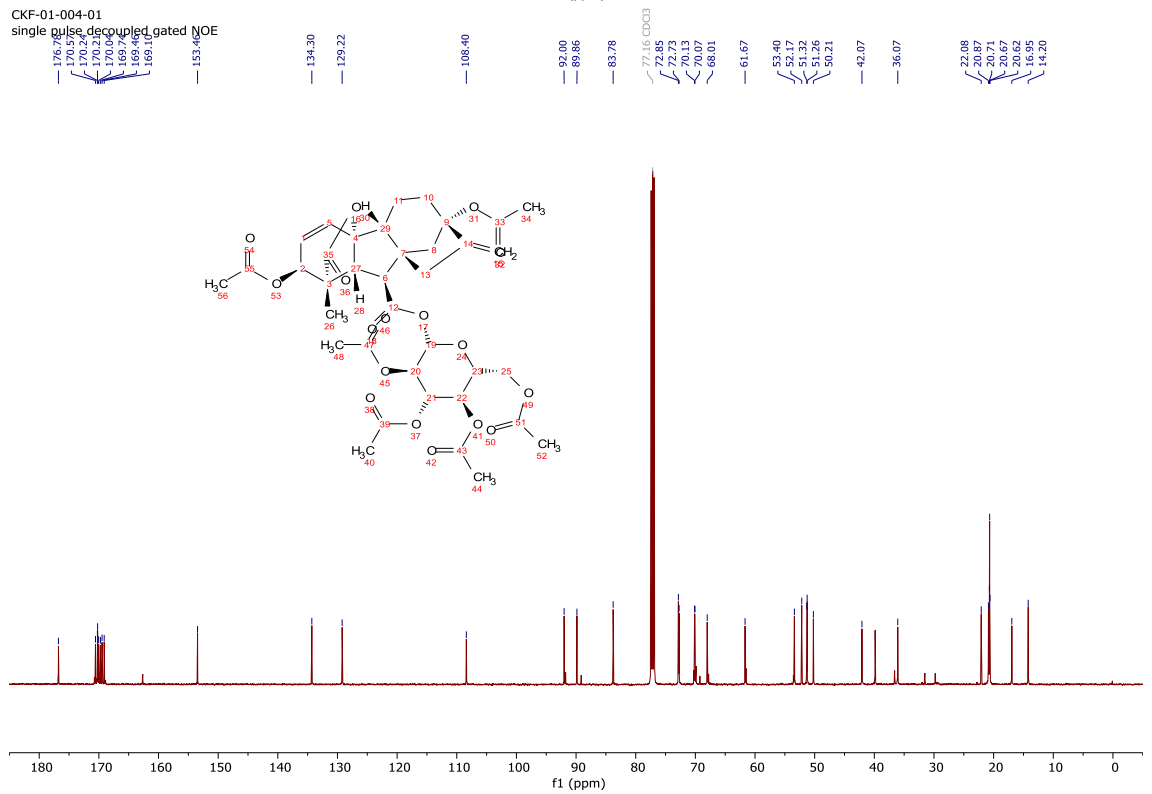


(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((1*S*,2*S*,4*aR*,4*bR*,7*S*,9*aS*,10*S*,10*aR*)-2,7-diacetoxy-1-methyl-8-methylene-13-oxo-1,2,4*b*,5,6,7,8,9,10,10*a*-decahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulene-10-carbonyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetát  
**(II)**

CKF-01-004-01  
 single\_pulse

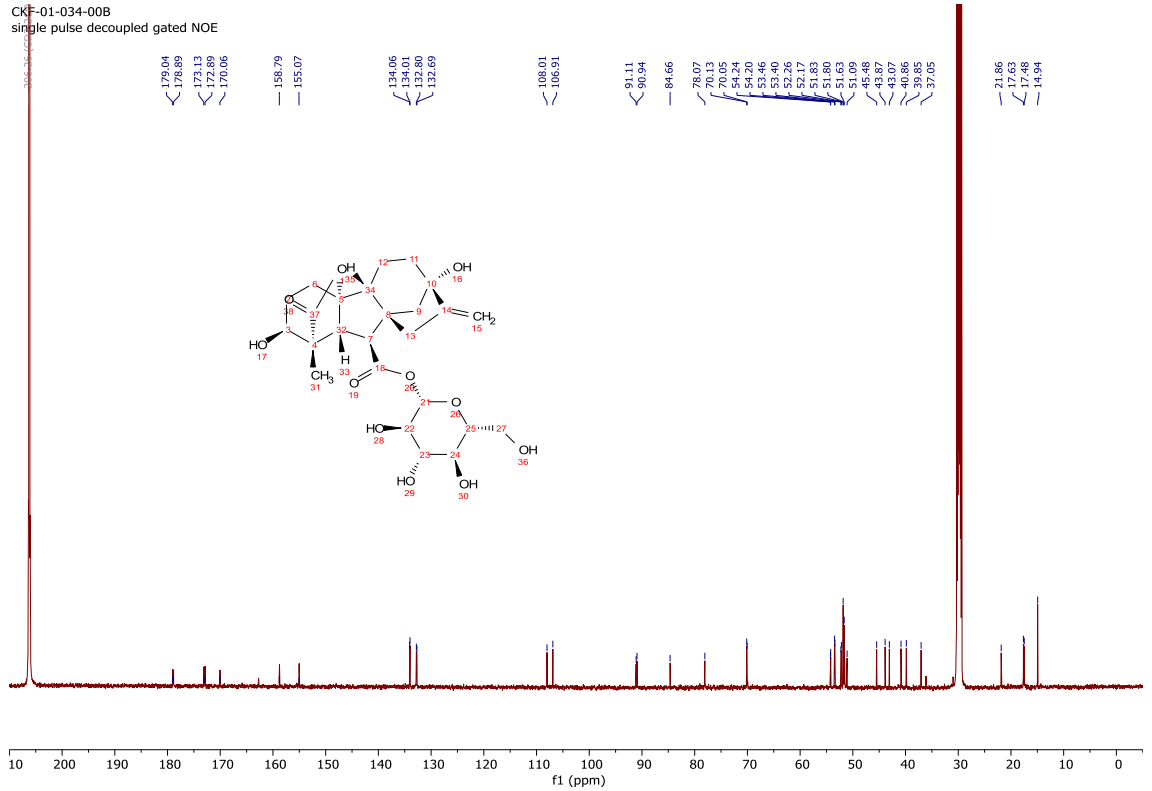
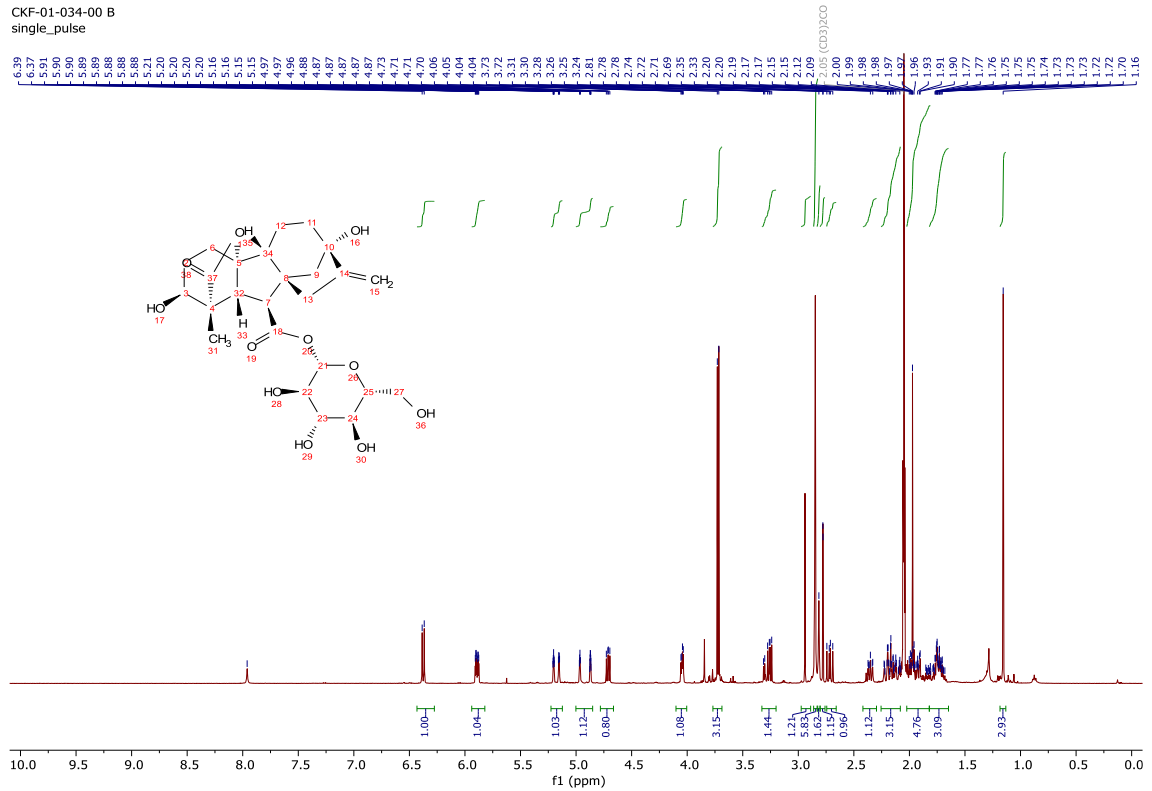


CKF-01-004-01  
 single\_pulse\_decoupled\_gated NOE



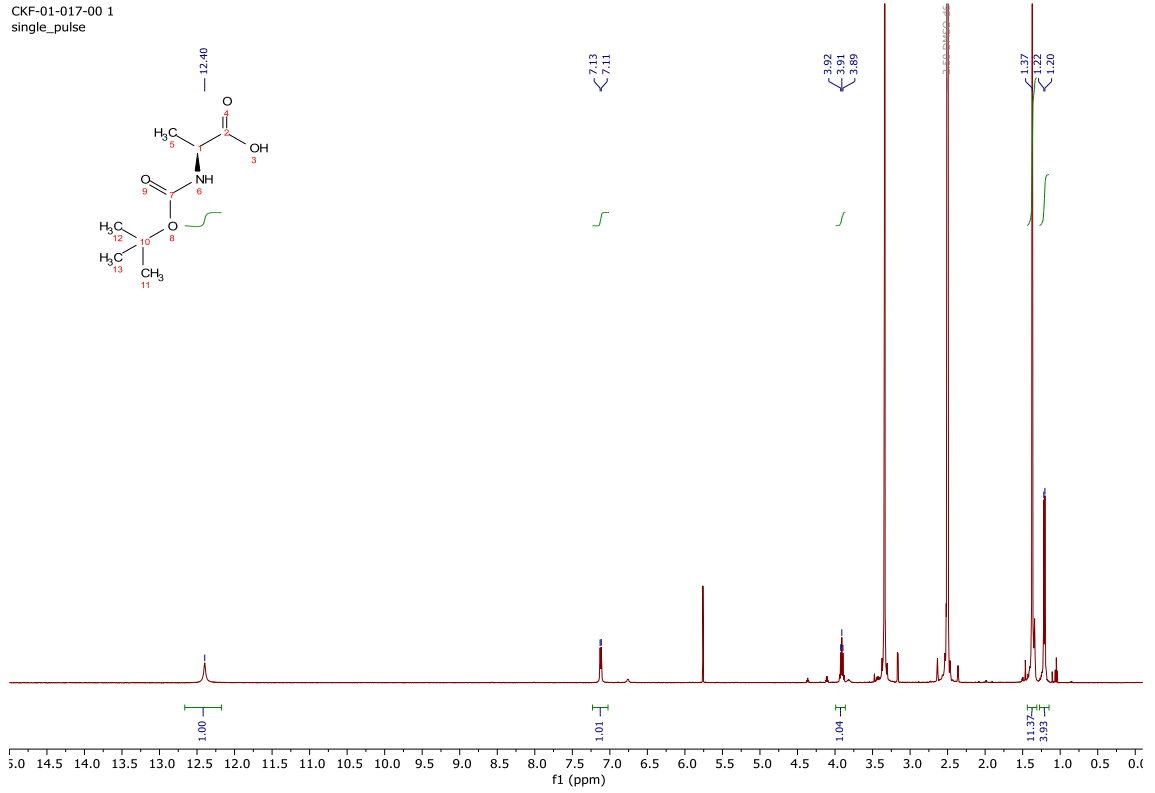
(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl  
 (1S,2S,4aR,4bR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-13-oxo-  
 1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulene-  
 10-carboxylate (III)

CKF-01-034-00 B  
 single\_pulse

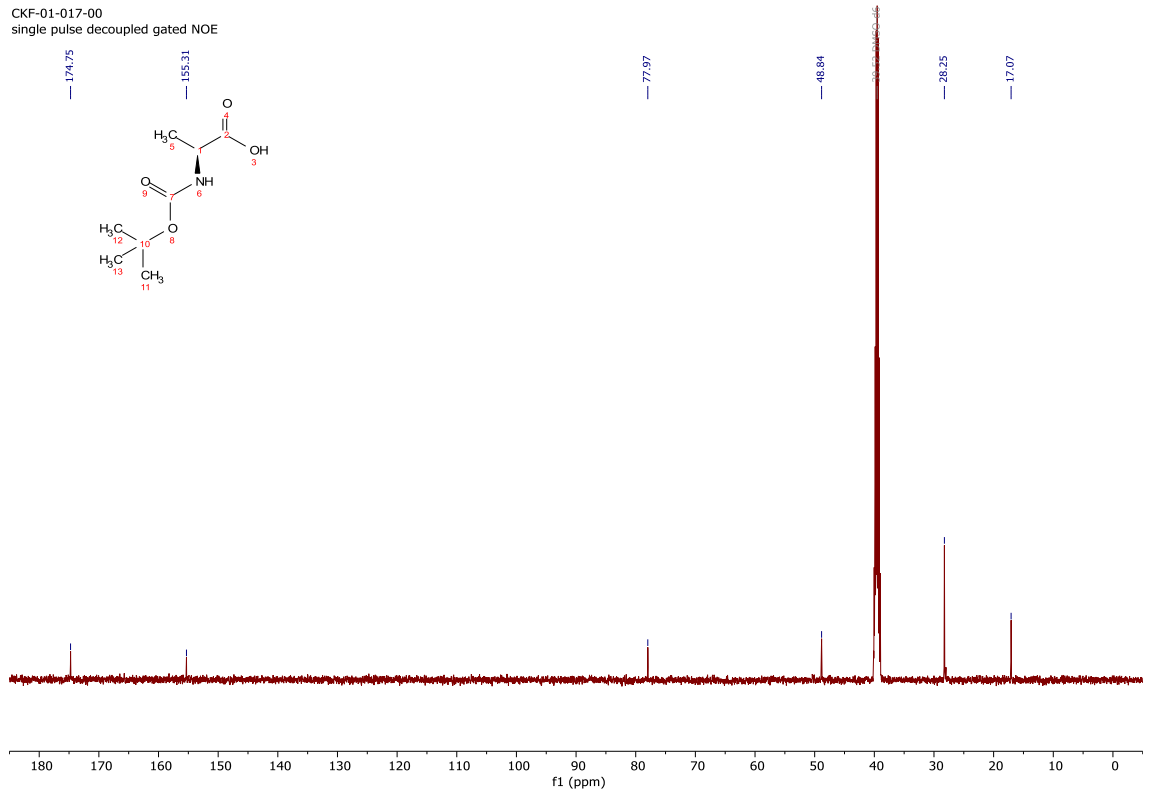


# (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alanine (IV)

CKF-01-017-00 1  
single\_pulse

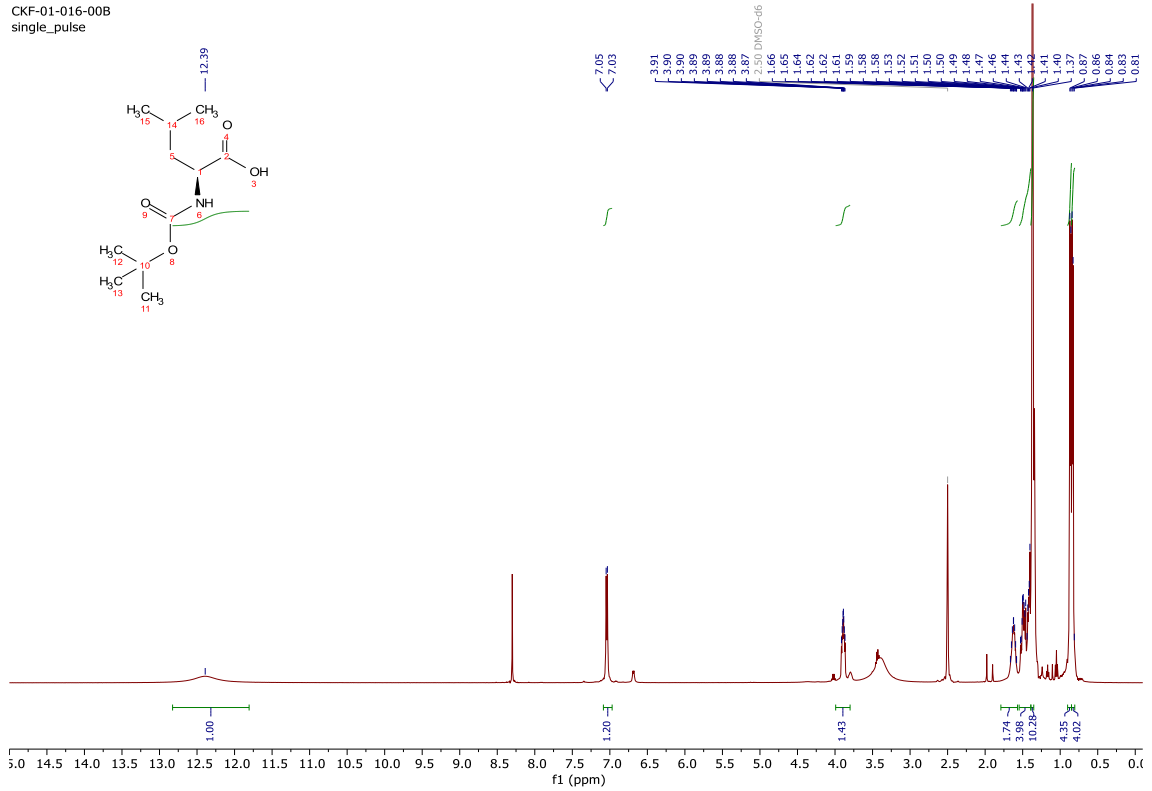


CKF-01-017-00  
single\_pulse decoupled gated NOE

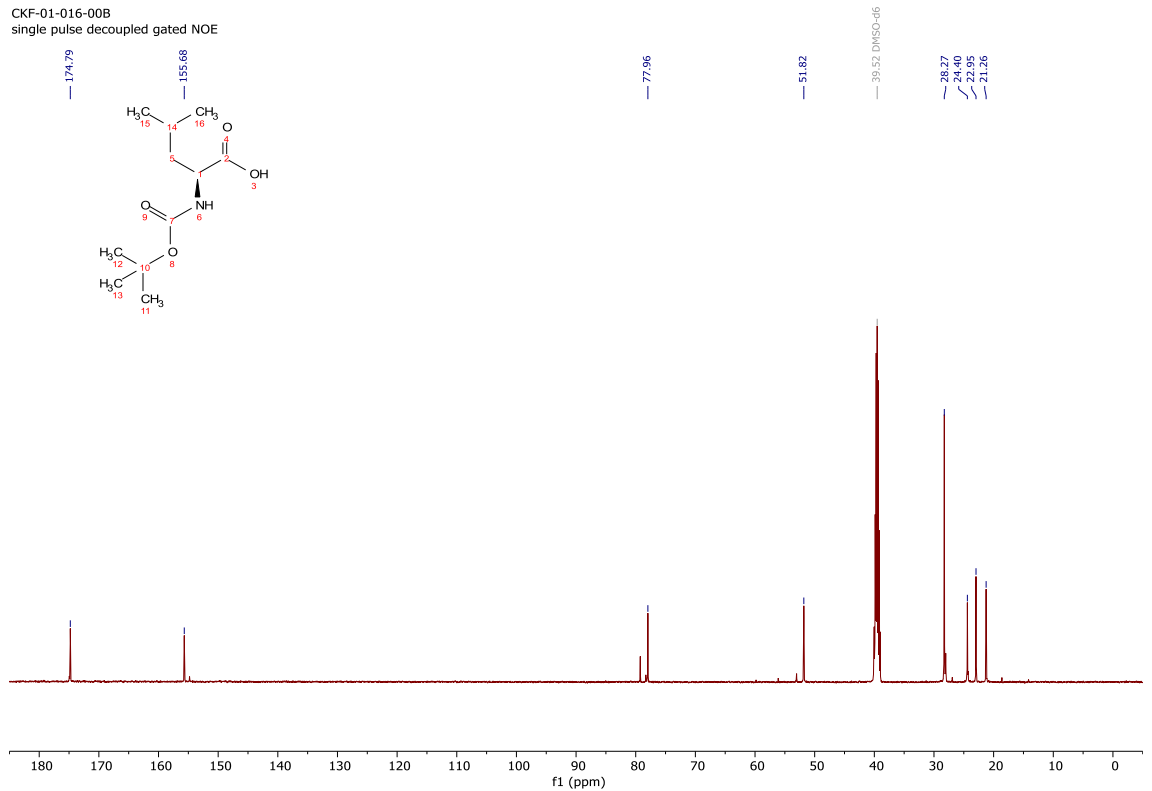


# (*tert*-butoxycarbonyl)-L-leucine (V)

CKF-01-016-00B  
single\_pulse

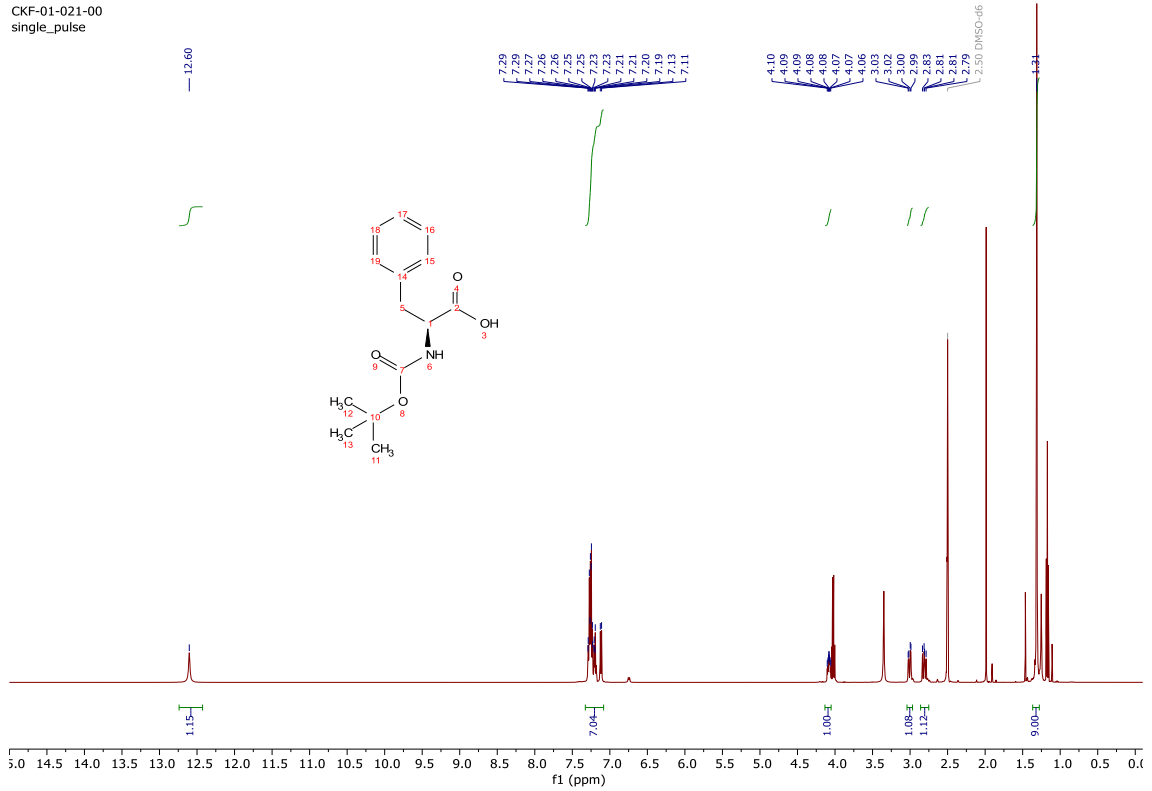


CKF-01-016-00B  
single\_pulse decoupled gated NOE



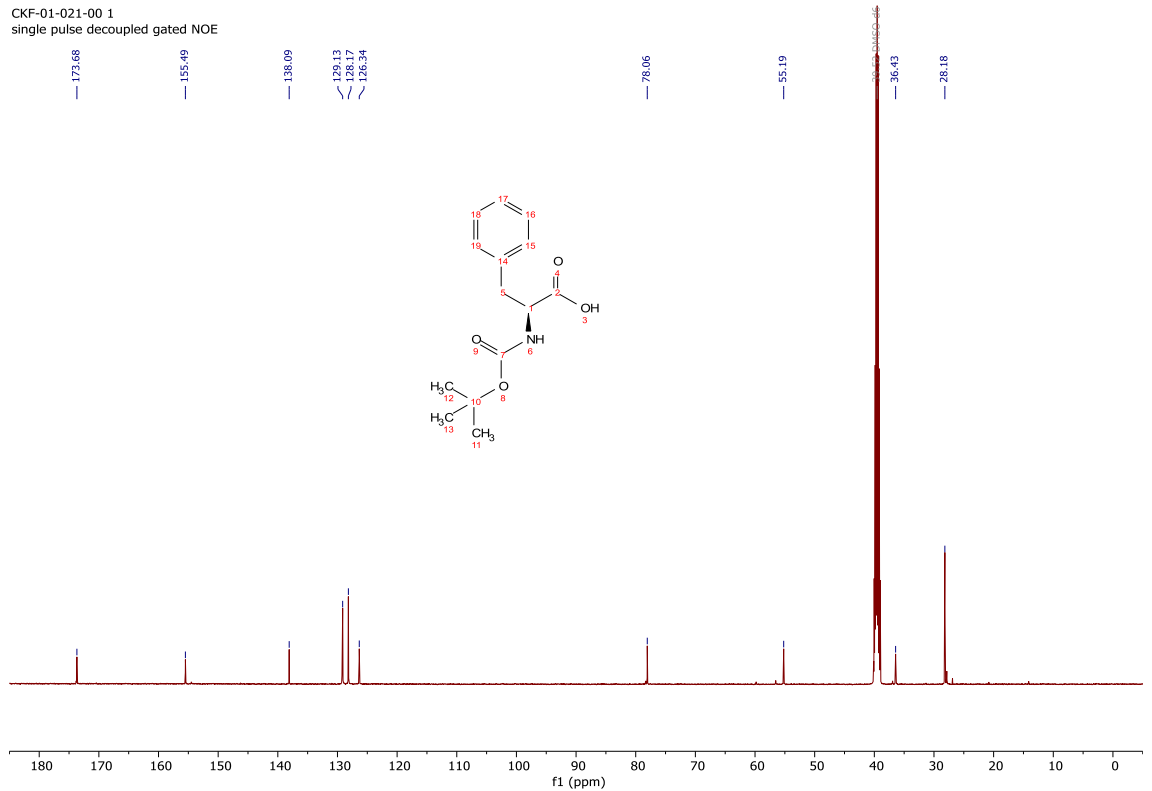
# (*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanine (VI)

CKF-01-021-00  
single\_pulse



CKF-01-021-00 1

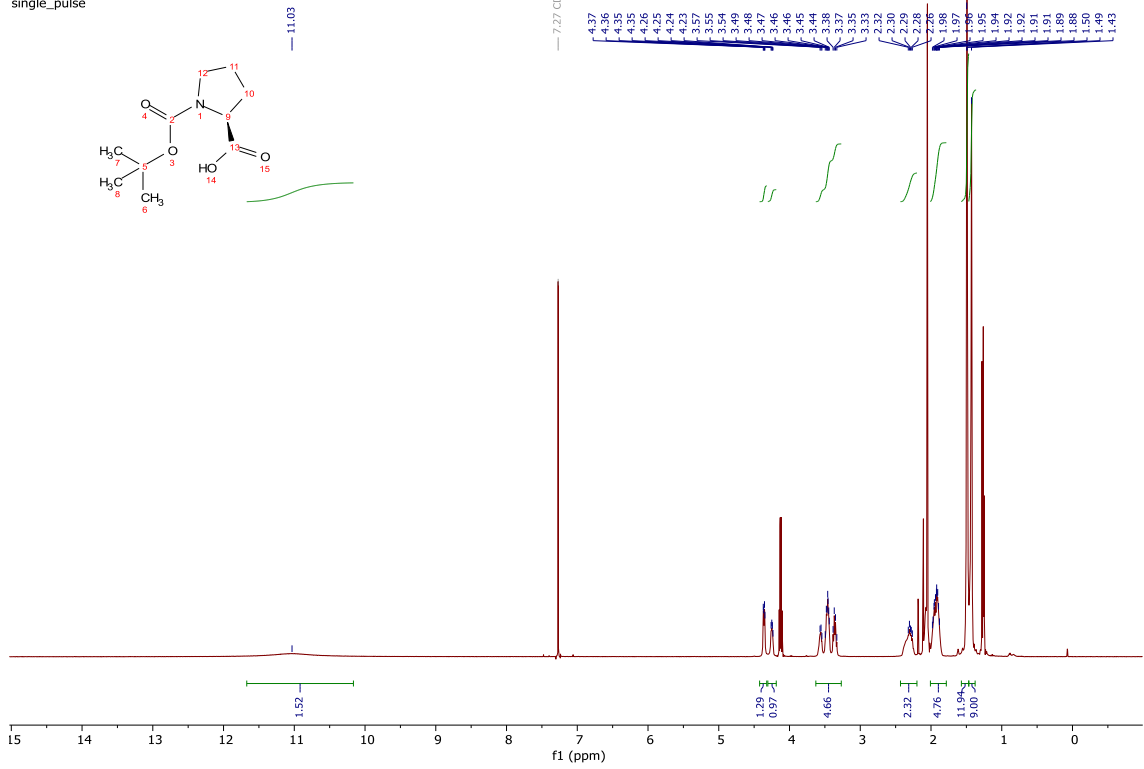
single pulse decoupled gated NOE





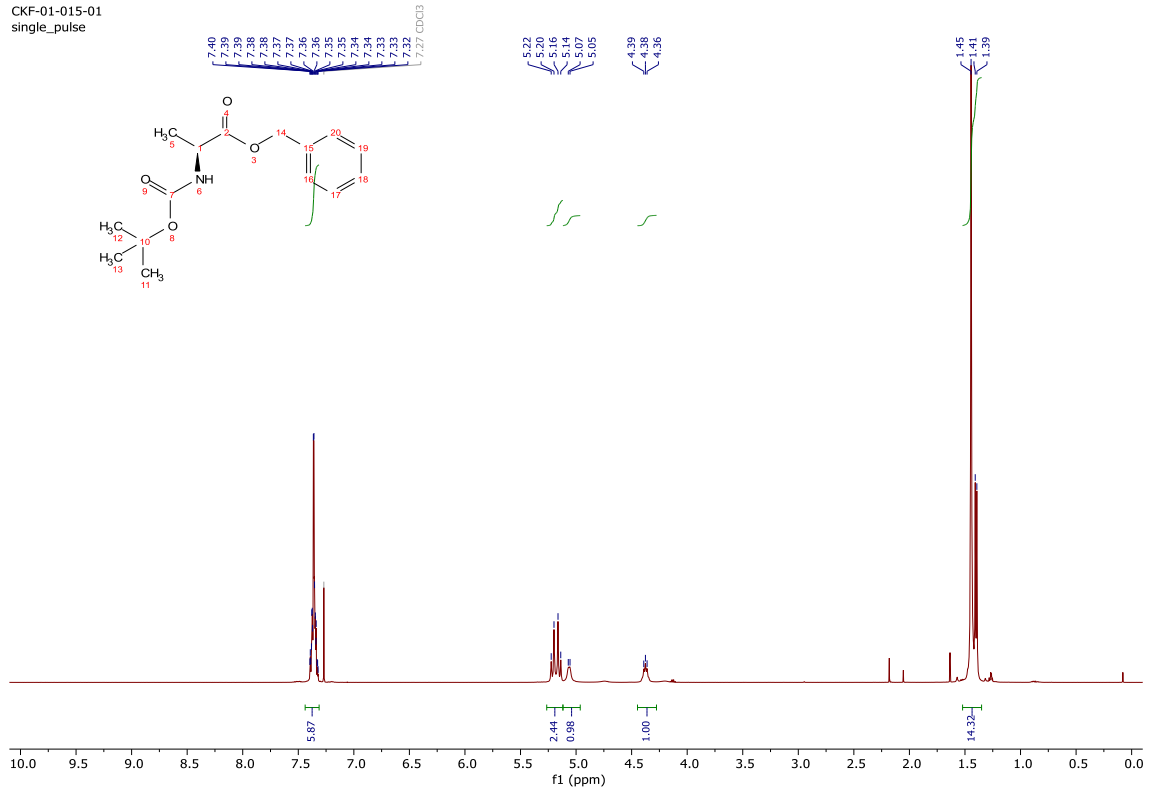
# (*tert*-butoxycarbonyl)-L-proline (VII)

CKF-01-024-00  
single\_pulse



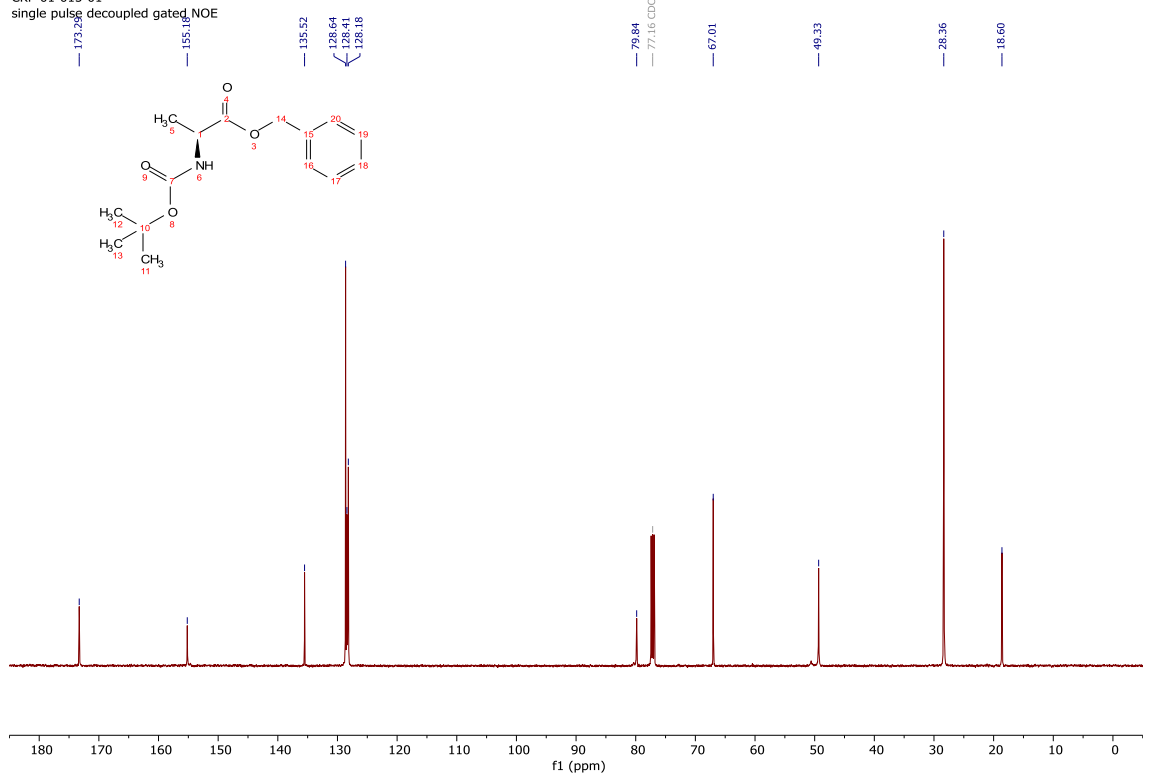
# Benzyl (*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-alaninát (VIII)

CKF-01-015-01  
single\_pulse



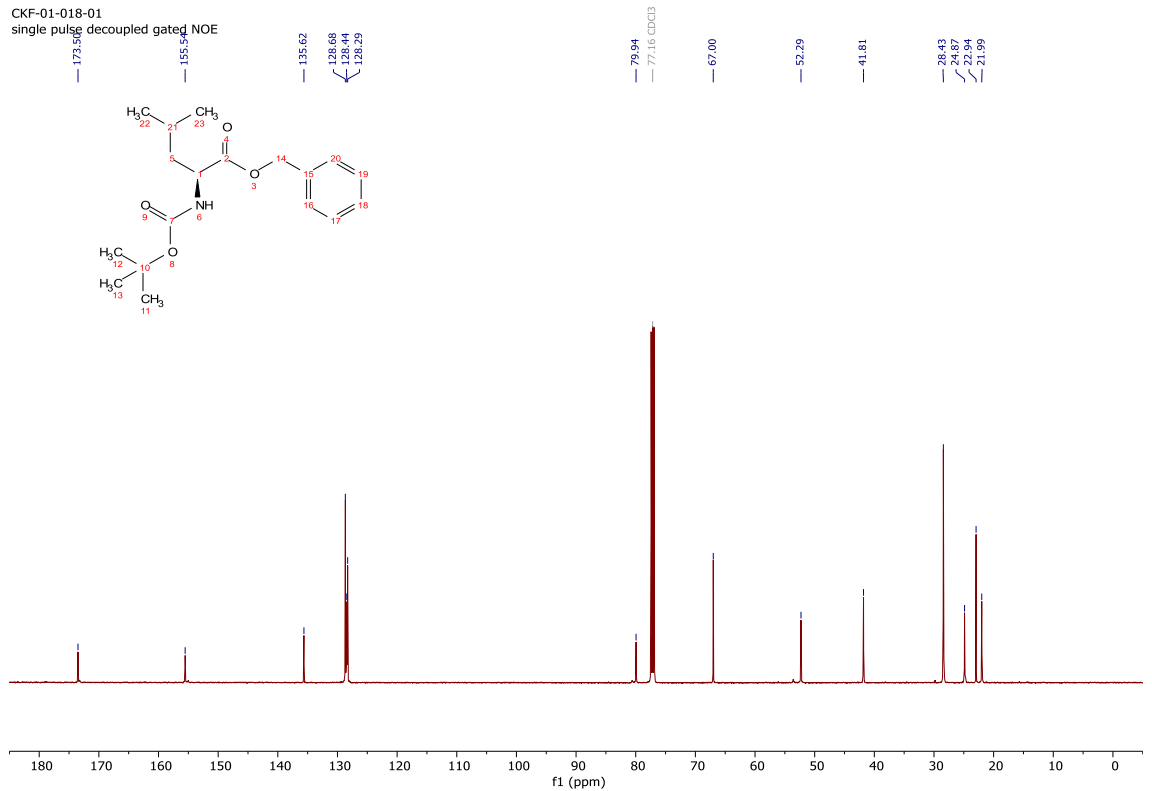
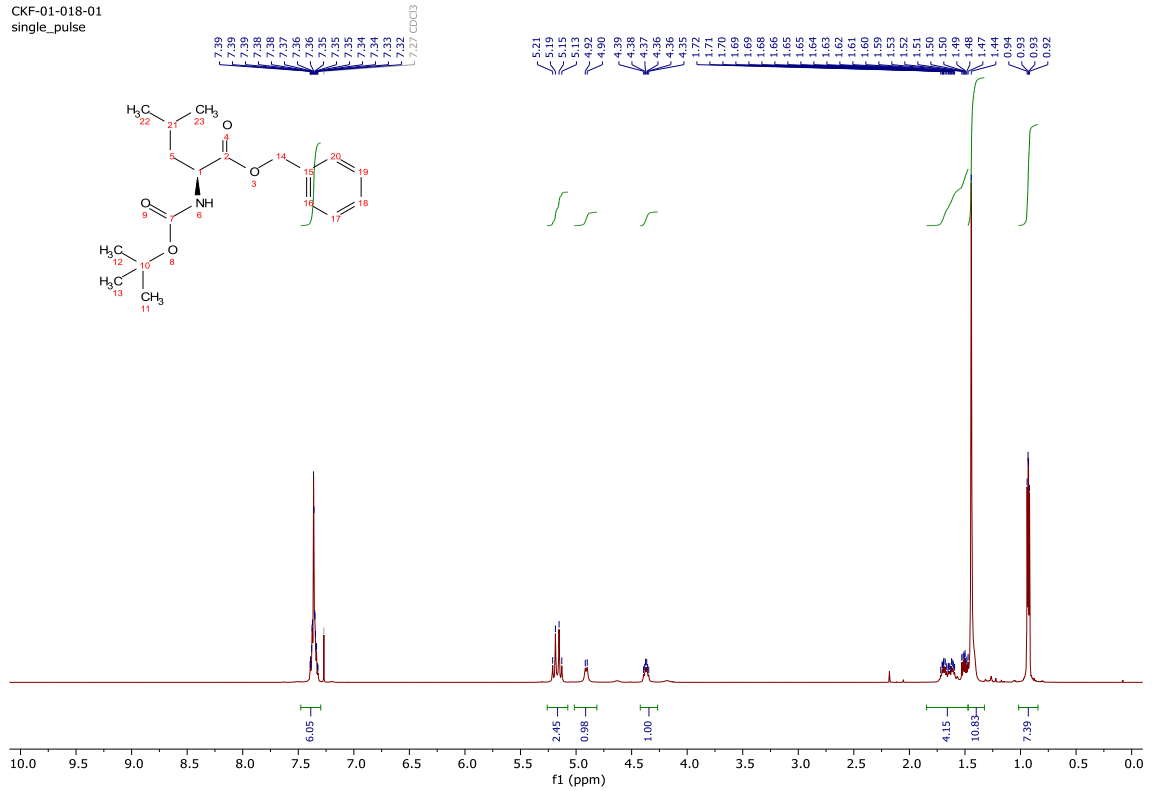
CKF-01-015-01

single\_pulse decoupled gated NOE



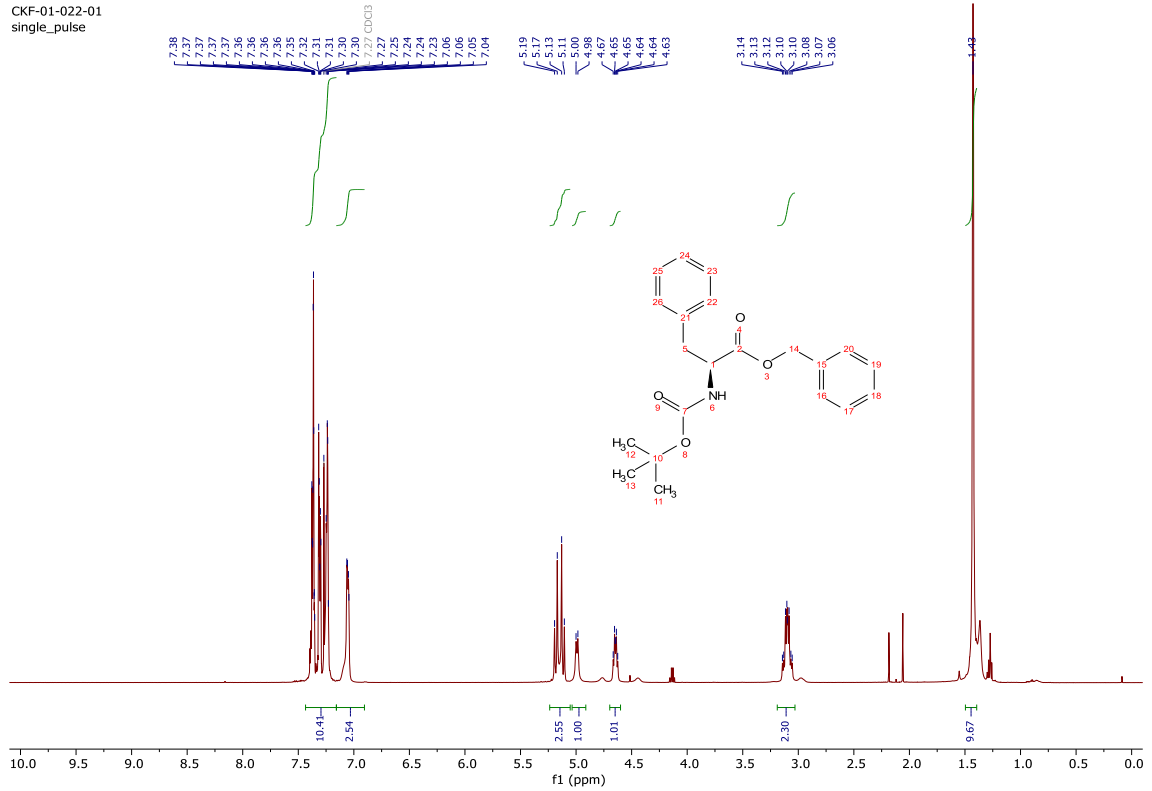
# Benzyl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-leucinát (IX)

CKF-01-018-01  
single\_pulse

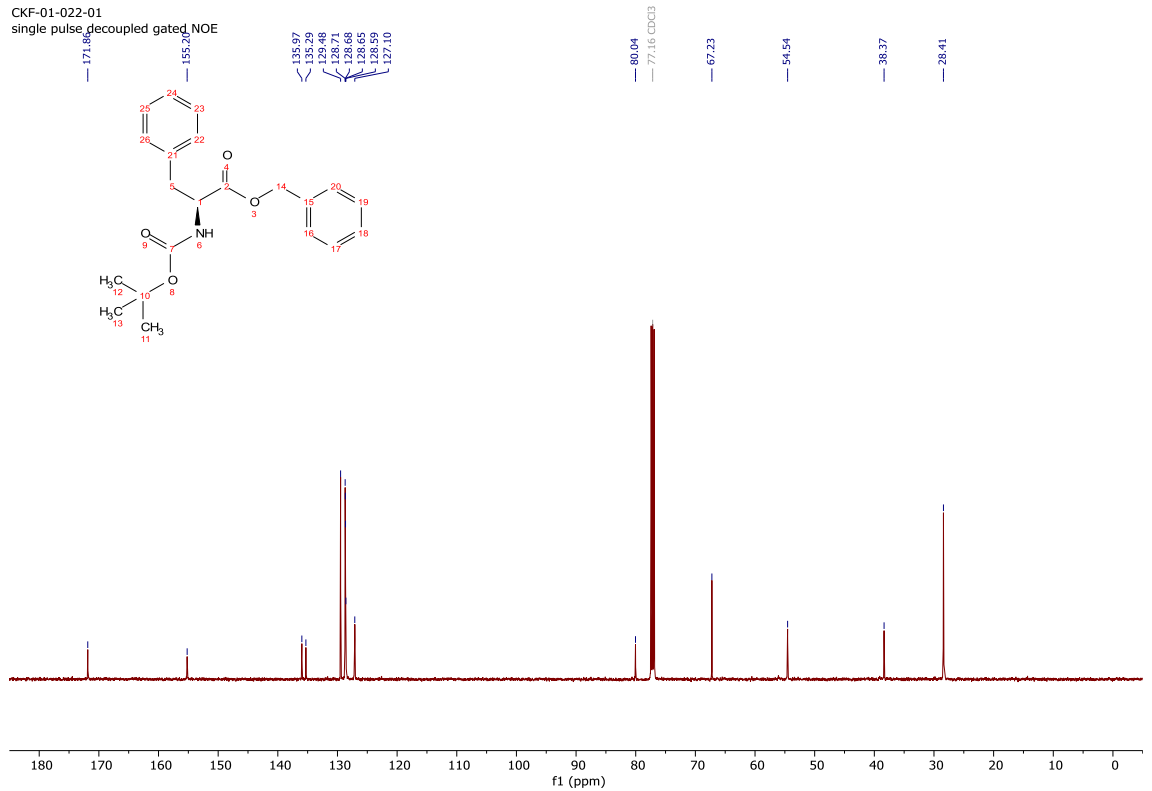


# Benzyl (*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-fenylalaninát (X)

CKF-01-022-01  
single\_pulse

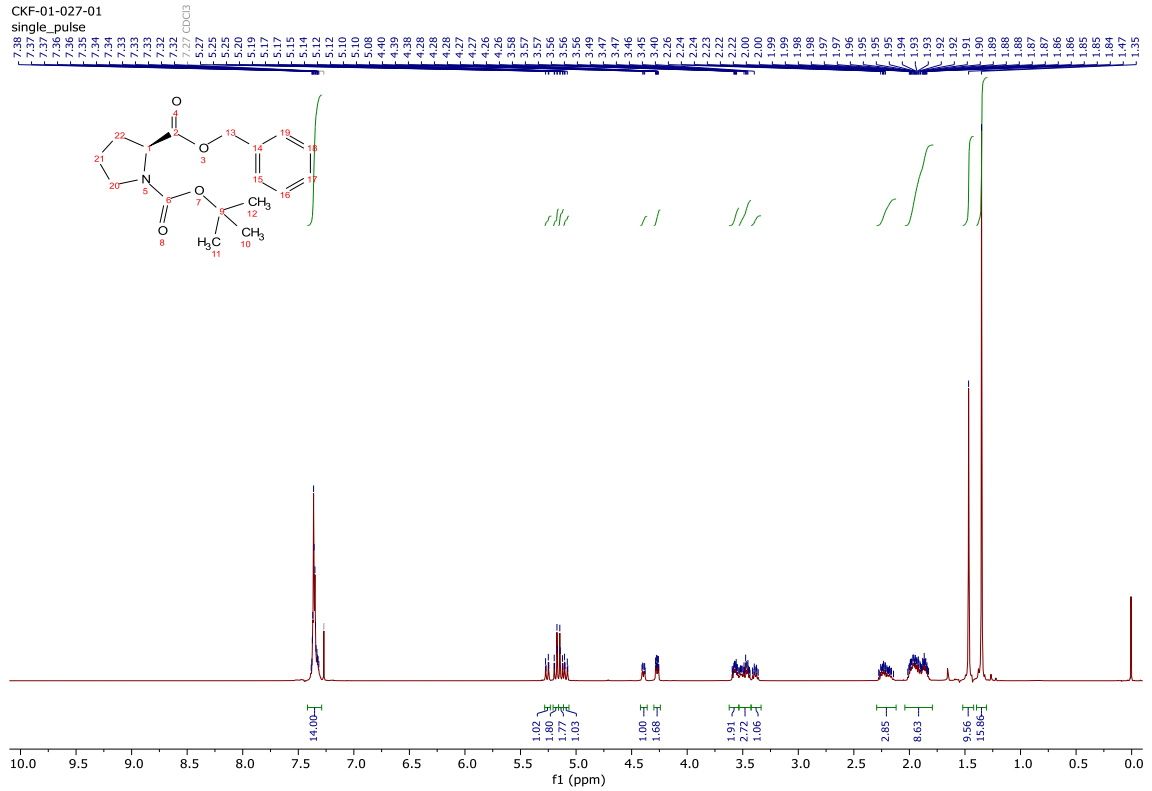


CKF-01-022-01  
single\_pulse decoupled gated NOE



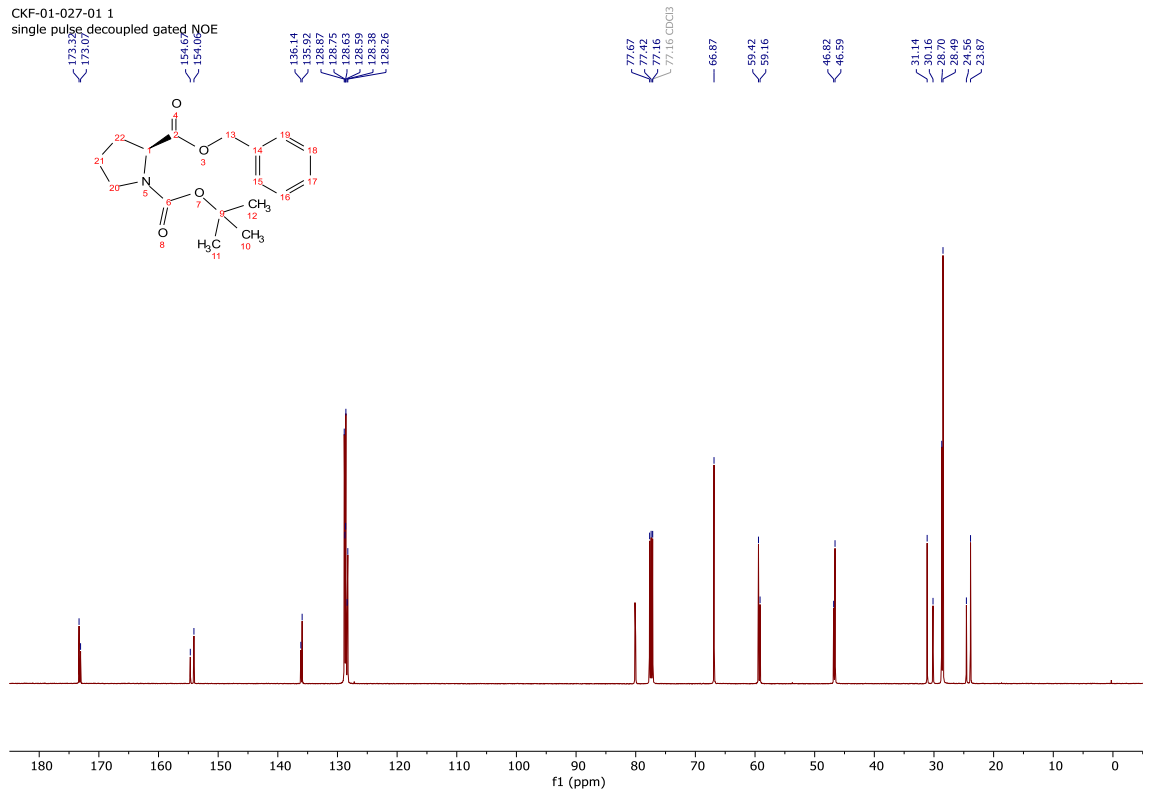
# 2-benzyl 1-(*tert*-butyl) (*S*)-pyrrolidine-1,2-dicarboxylát (XI)

CKF-01-027-01  
single\_pulse



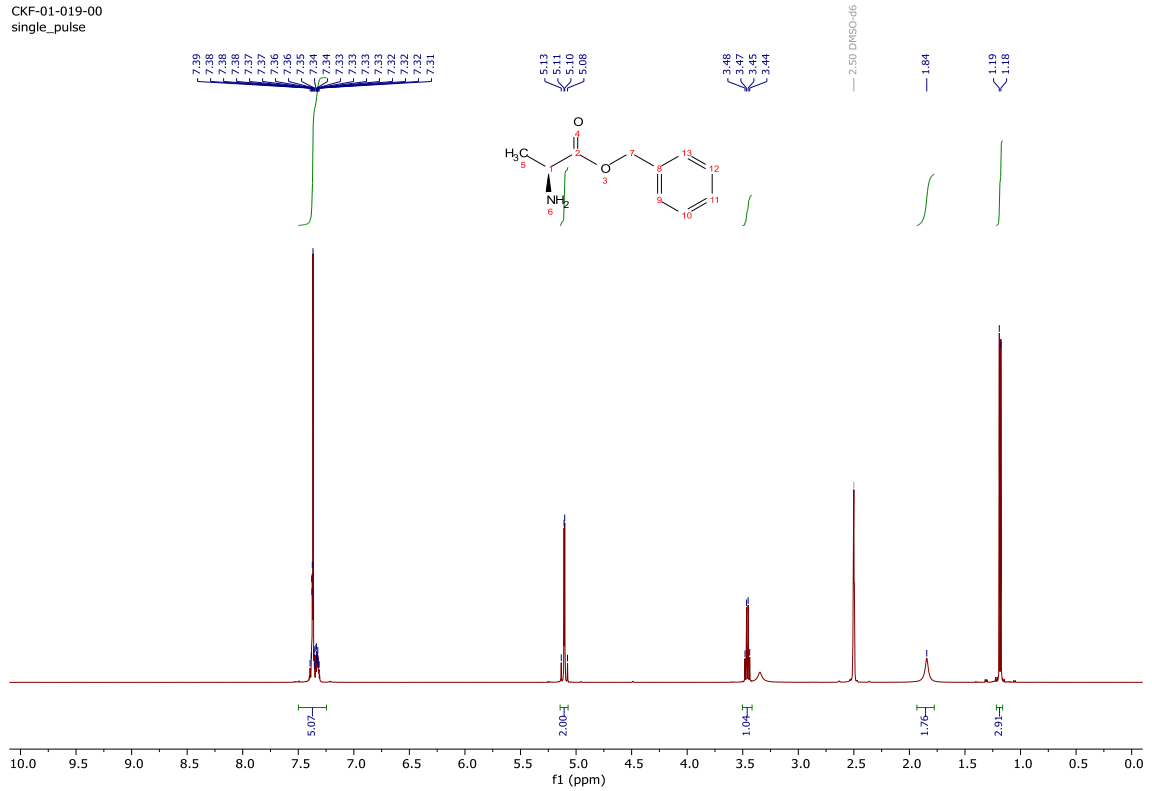
CKF-01-027-01 1

single\_pulse decoupled gated NOE

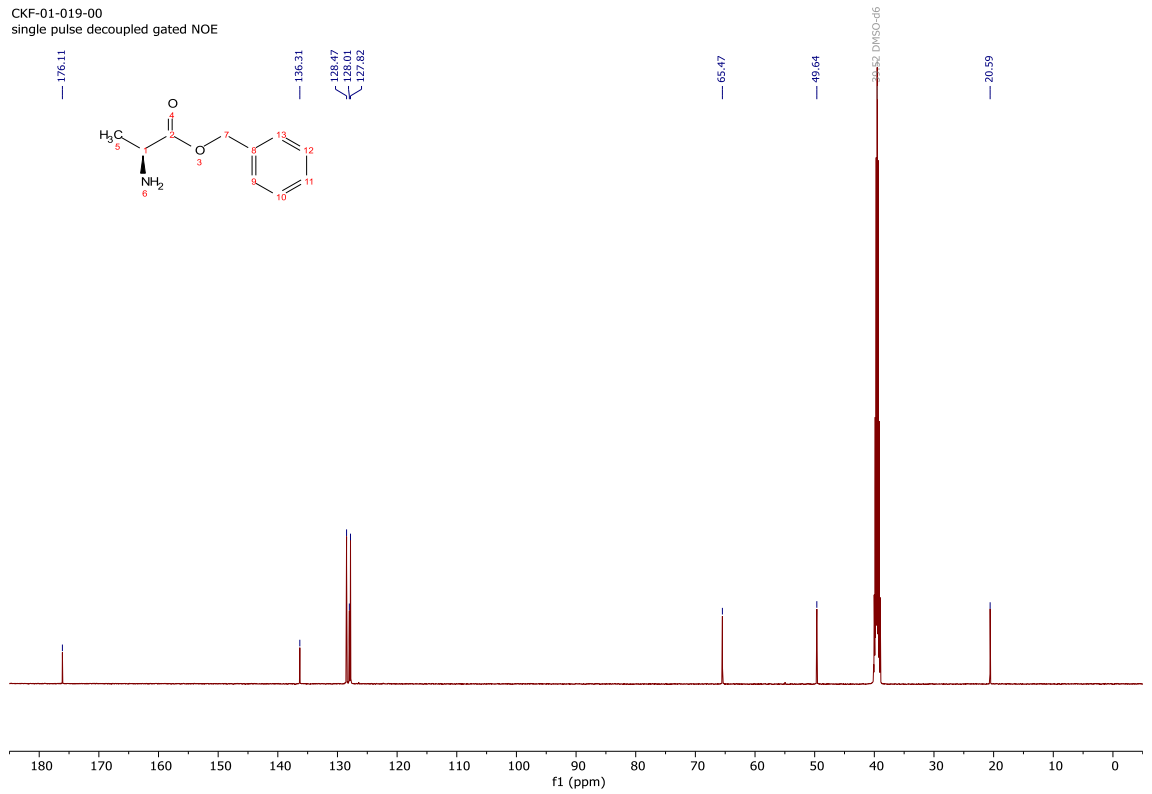


# Benzyl L-alaninát (XII)

CKF-01-019-00  
single\_pulse

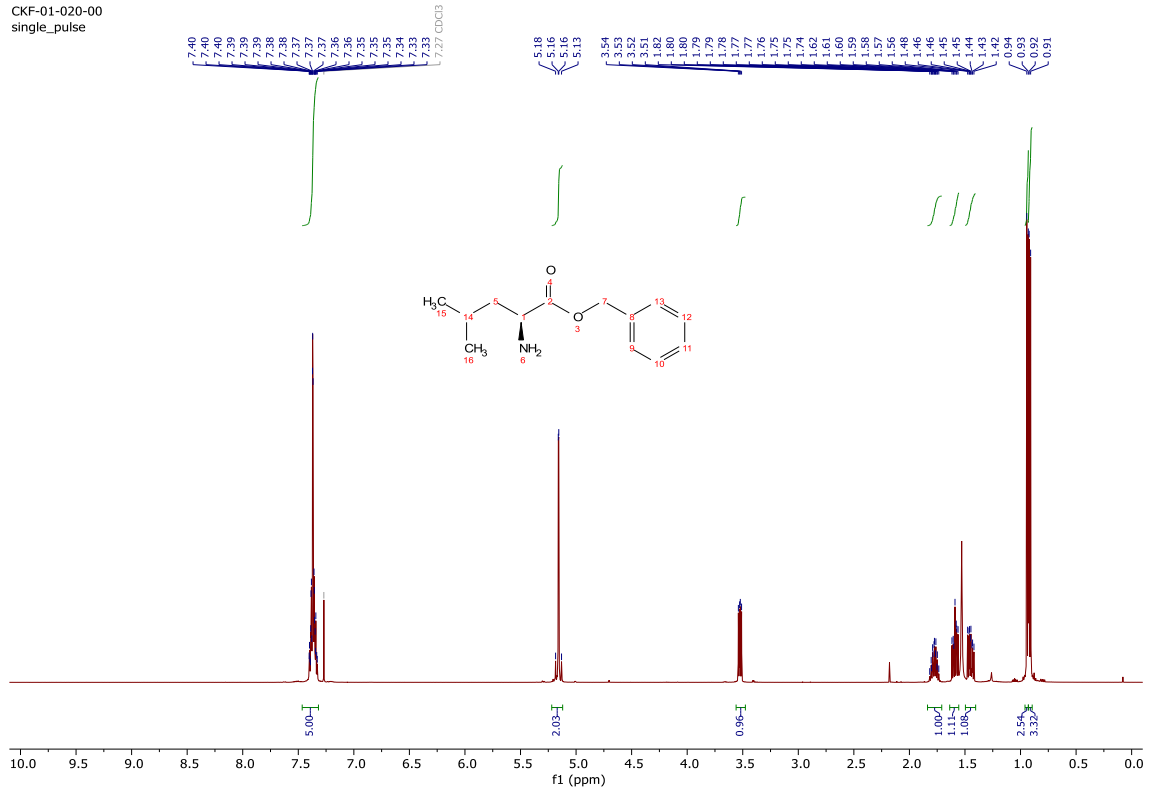


CKF-01-019-00  
single\_pulse decoupled gated NOE

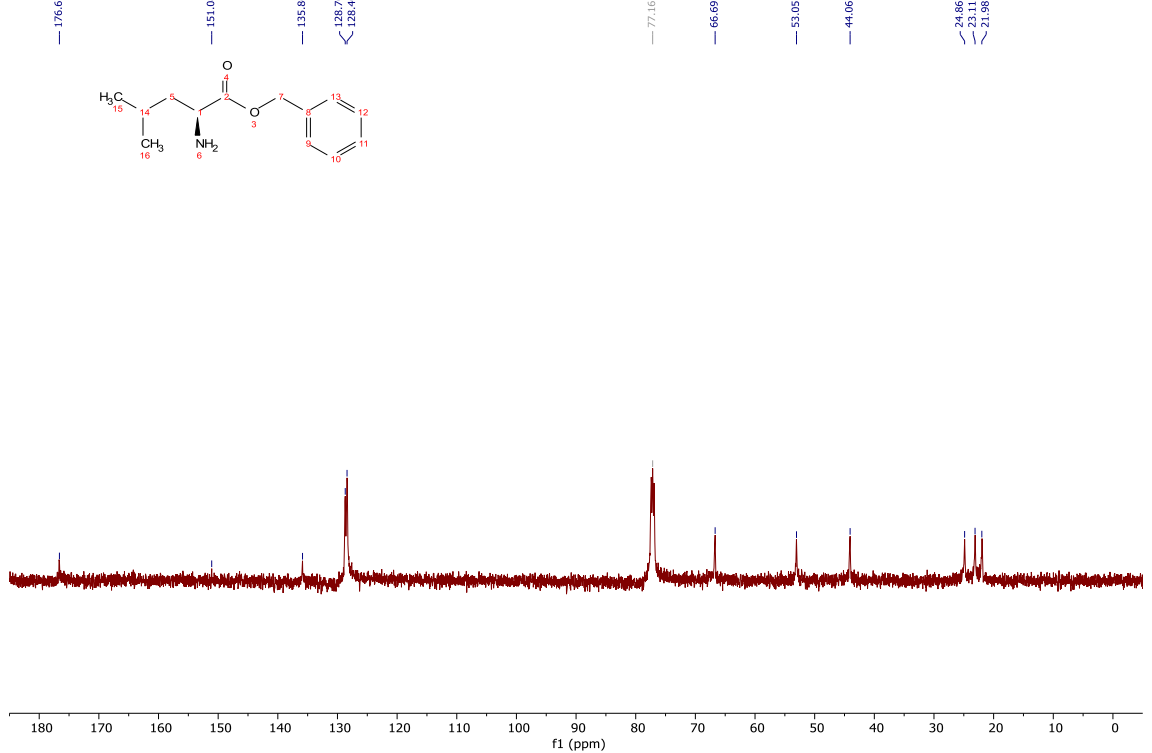


# benzyl *L*-leucinát (XIII)

CKF-01-020-00  
single\_pulse



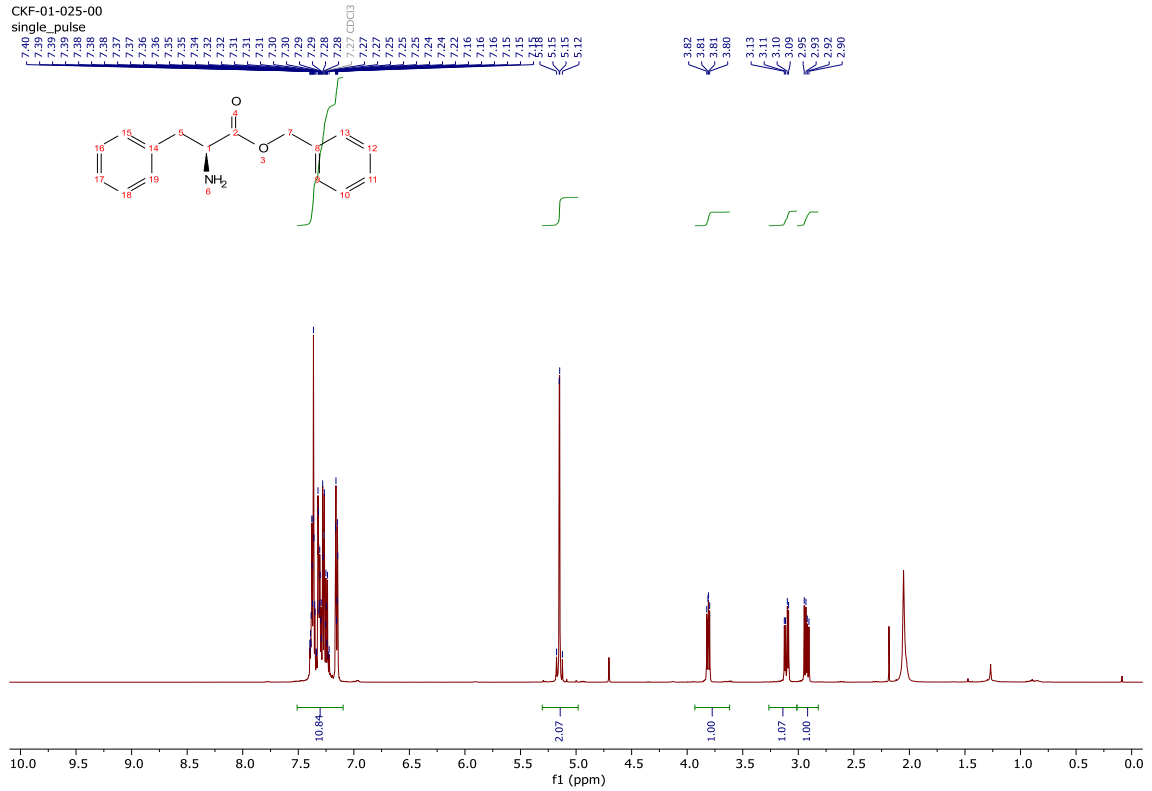
CKF-01-020-00  
single\_pulse decoupled gated NOE



# benzyl *L*-phenylalaninát (XIV)

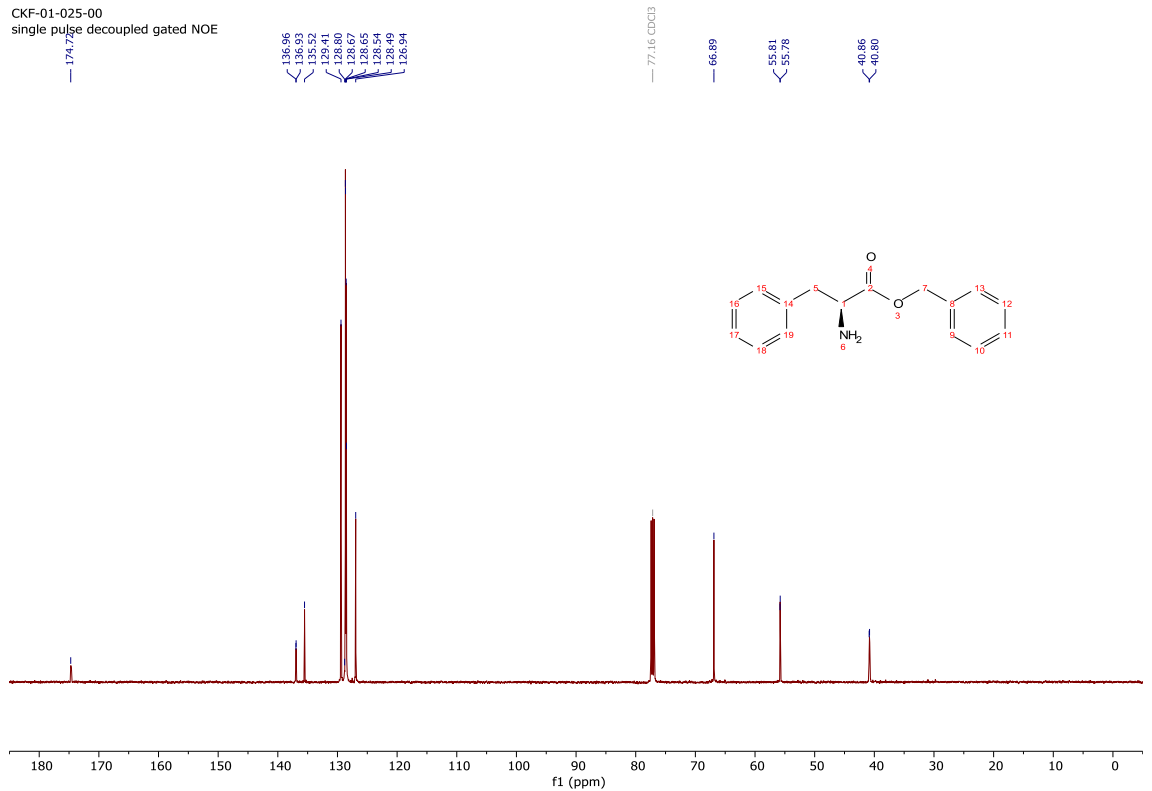
CKF-01-025-00

single\_pulse



CKF-01-025-00

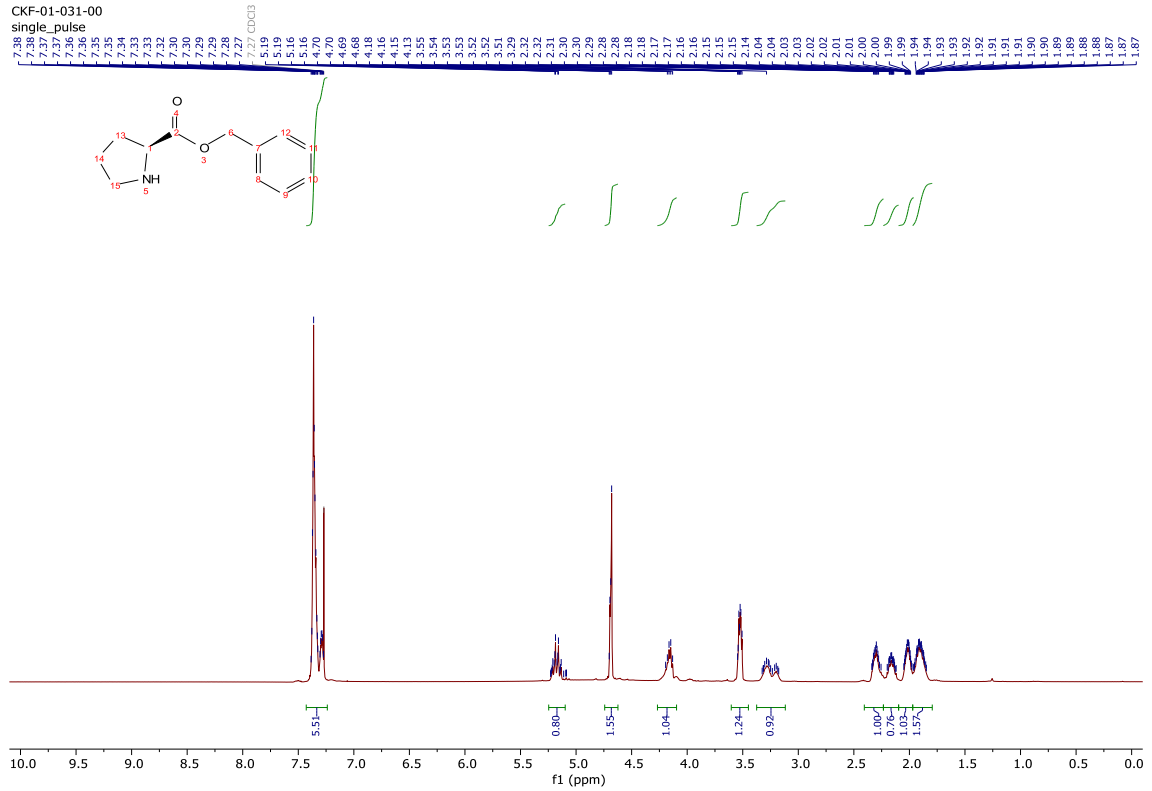
single\_pulse decoupled gated NOE



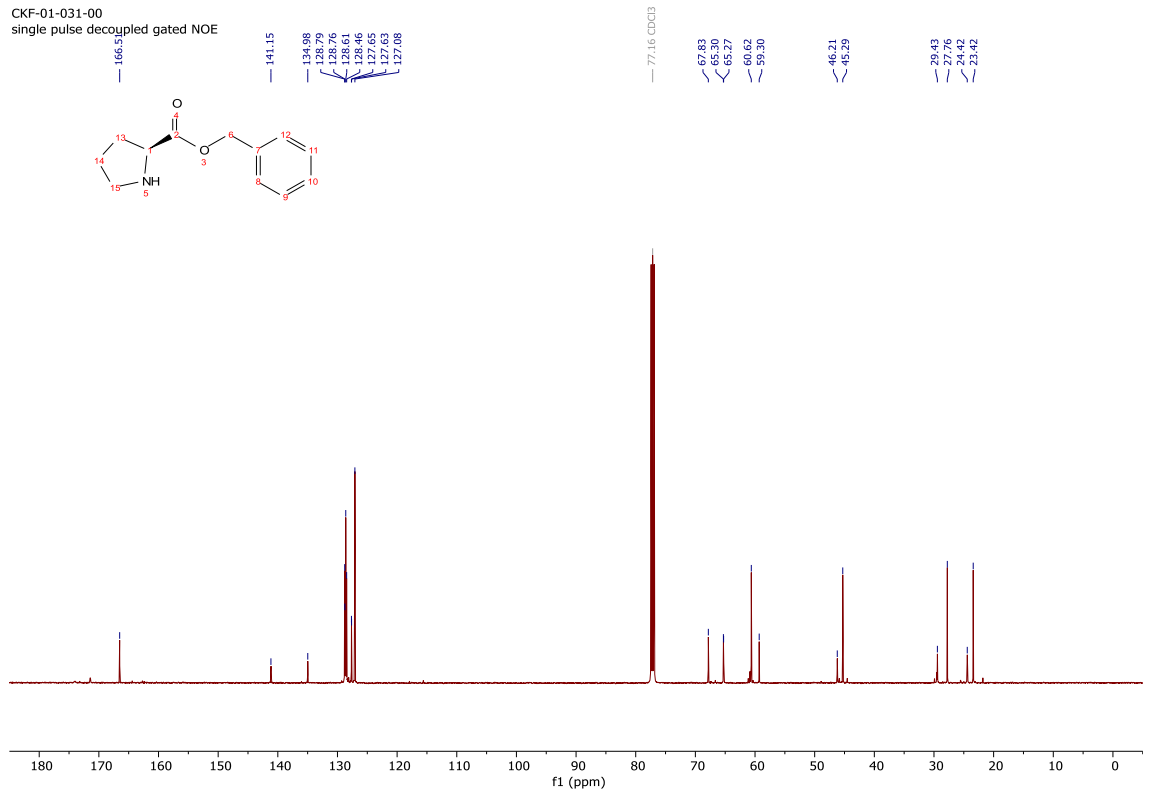


# benzyl L-prolinát (XV)

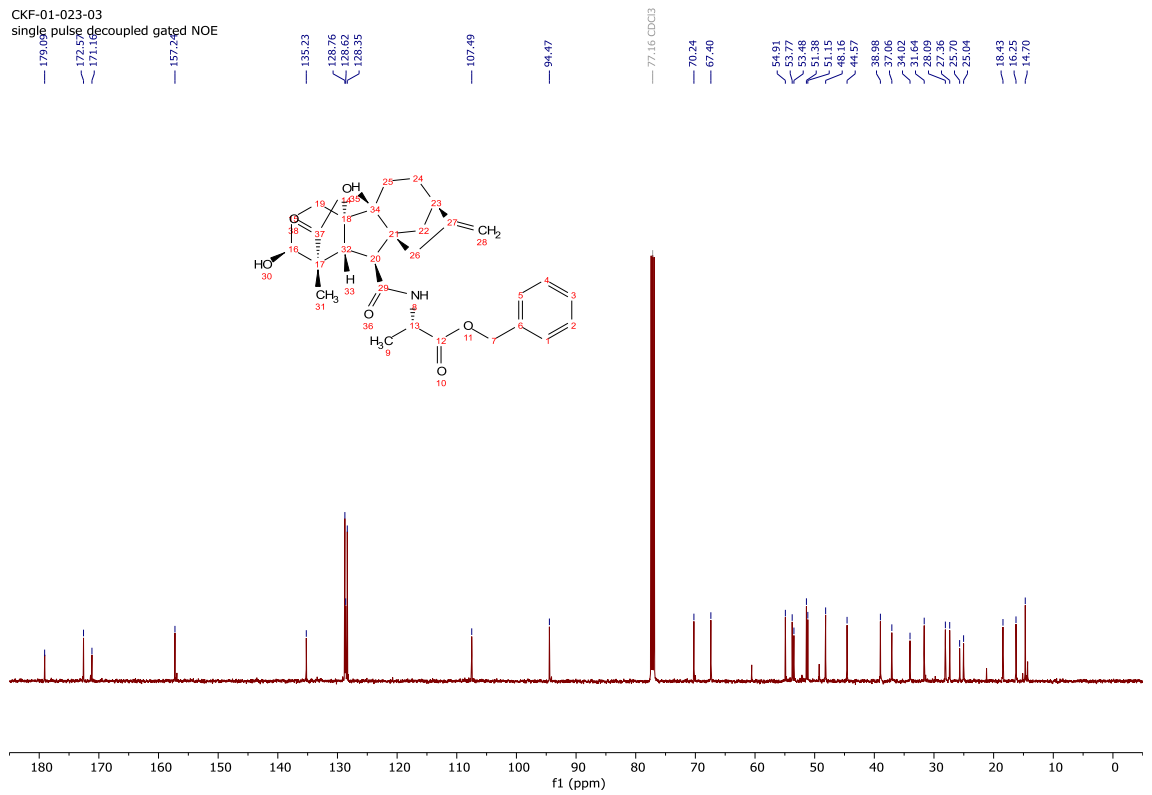
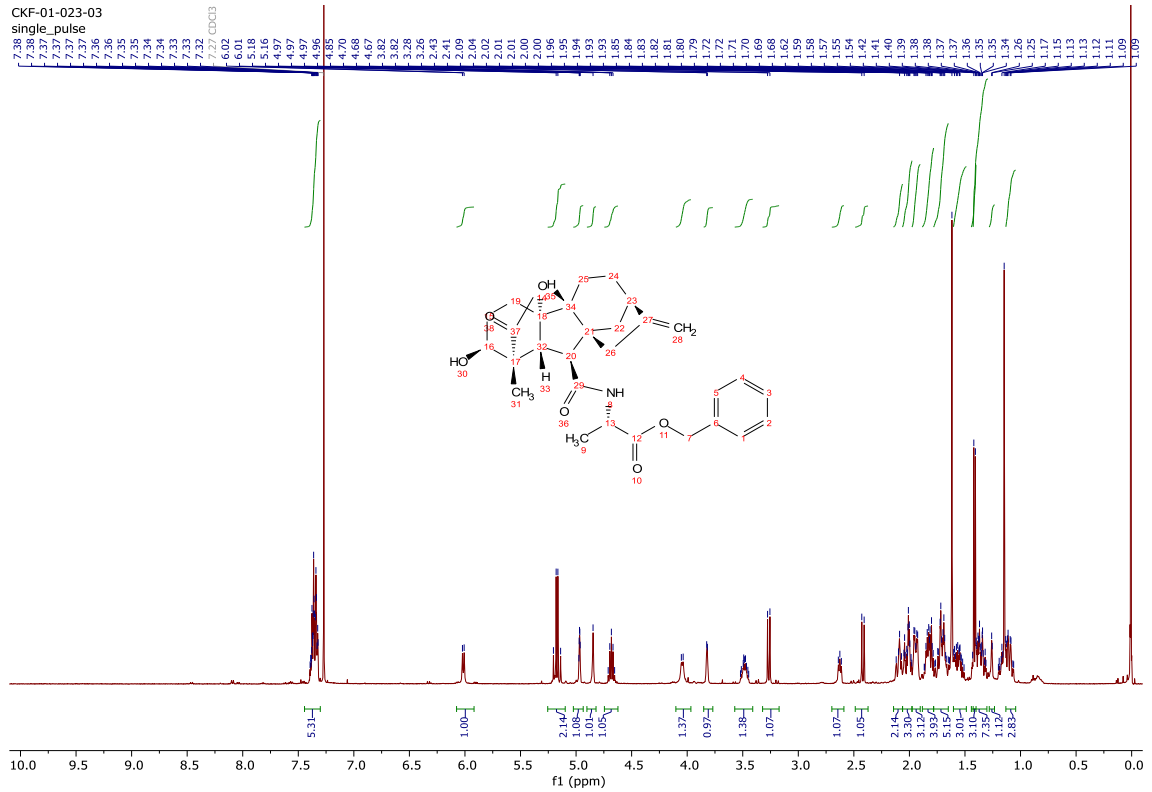
CKF-01-031-00  
single\_pulse



CKF-01-031-00  
single pulse decoupled gated NOE

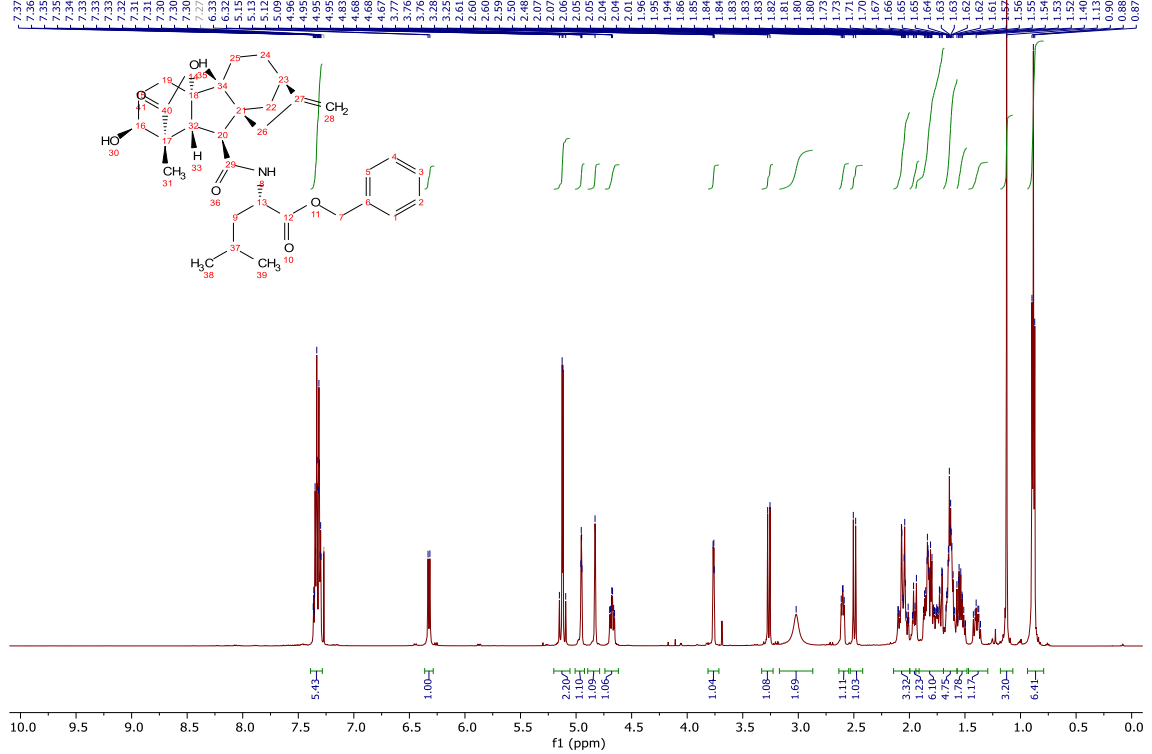


Benzyl ((1*S*,2*S*,4*aR*,4*bR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylene-13-oxododecahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[*a*]azulene-10-carbonyl)-L-alaninát (XVI)

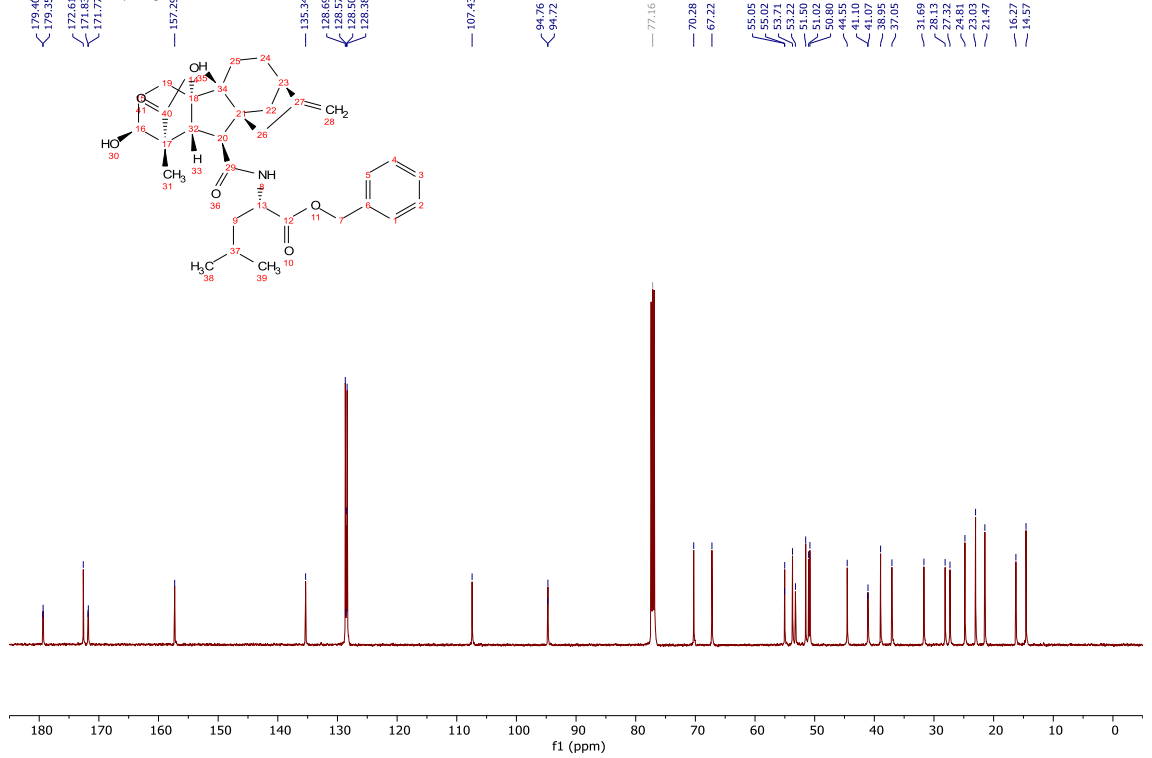


Benzyl ((1*S*,2*S*,4*aR*,4*bR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylene-13-oxododecahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulene-10-carbonyl)-L-leucinát (XVII)

CKF-01-026-01-01  
single\_pulse

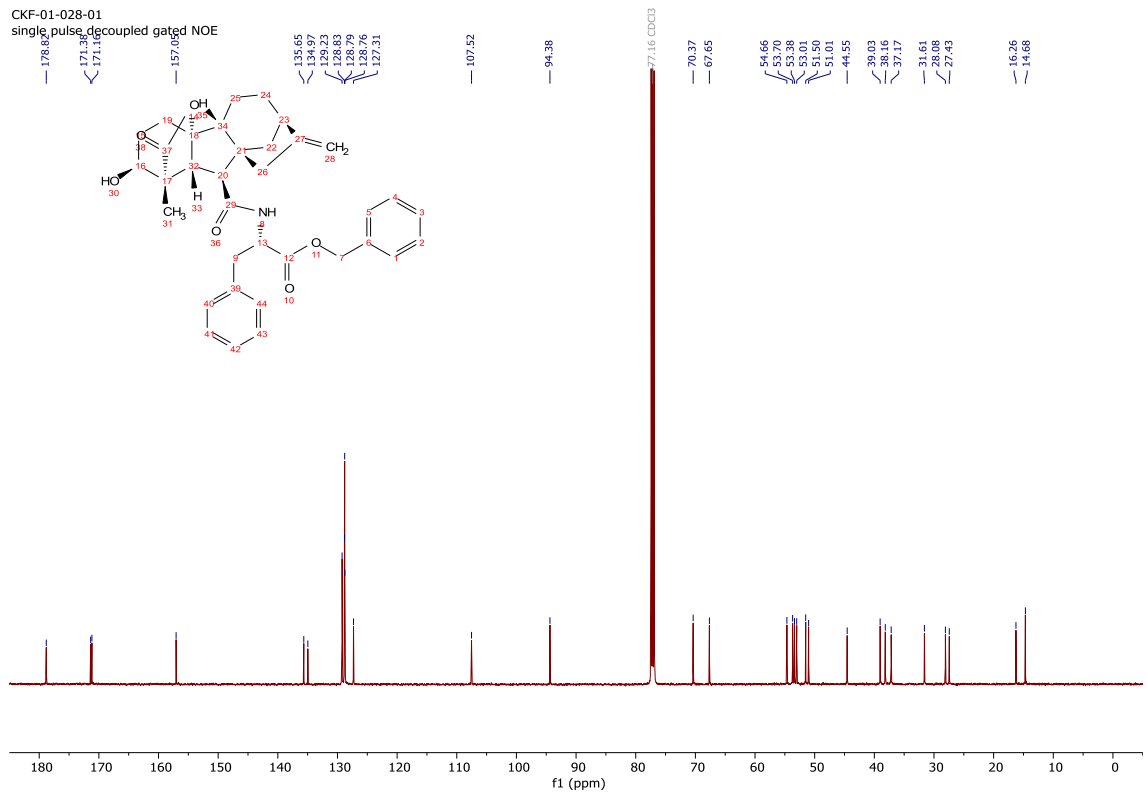
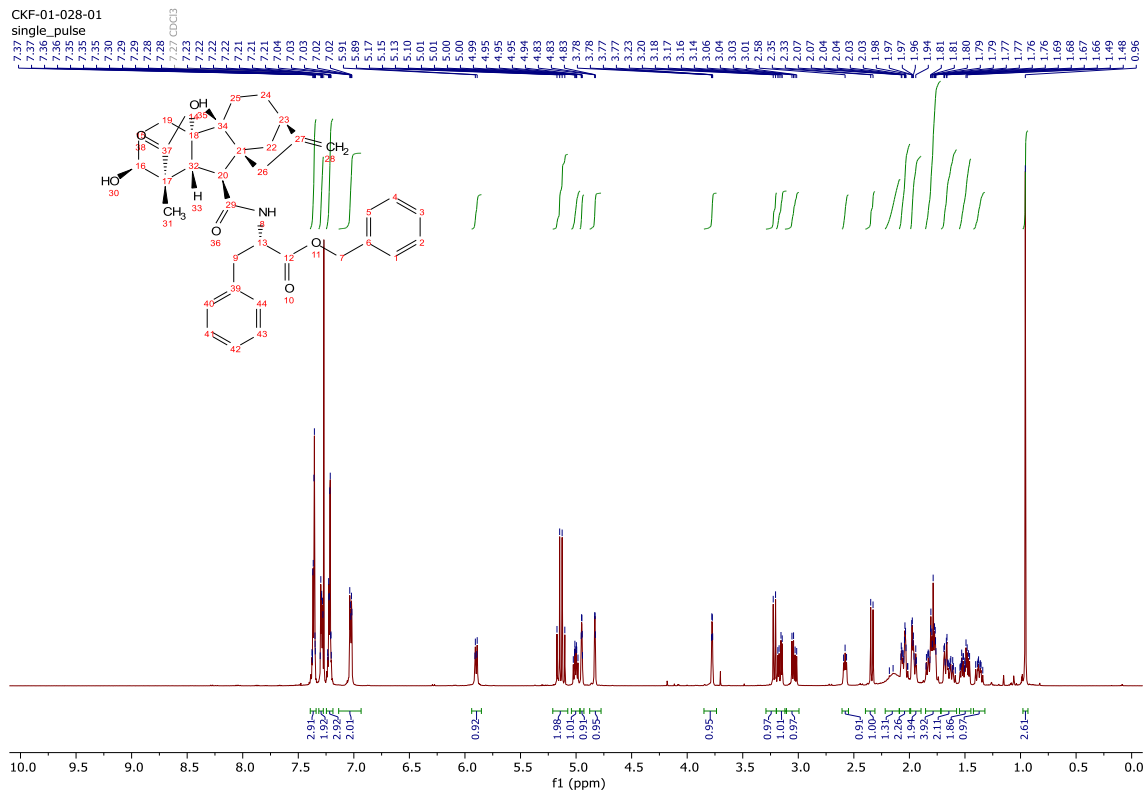


CKF-01-026-01-01  
single\_pulse decoupled gated NOE



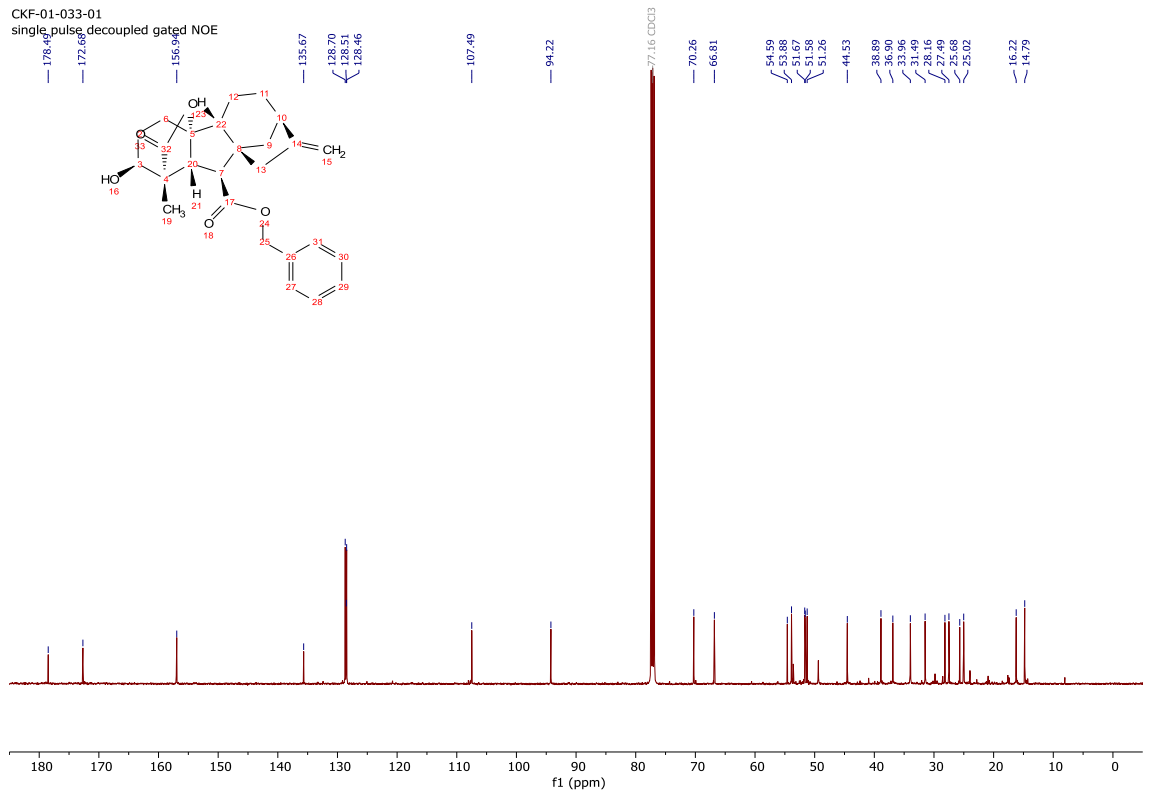
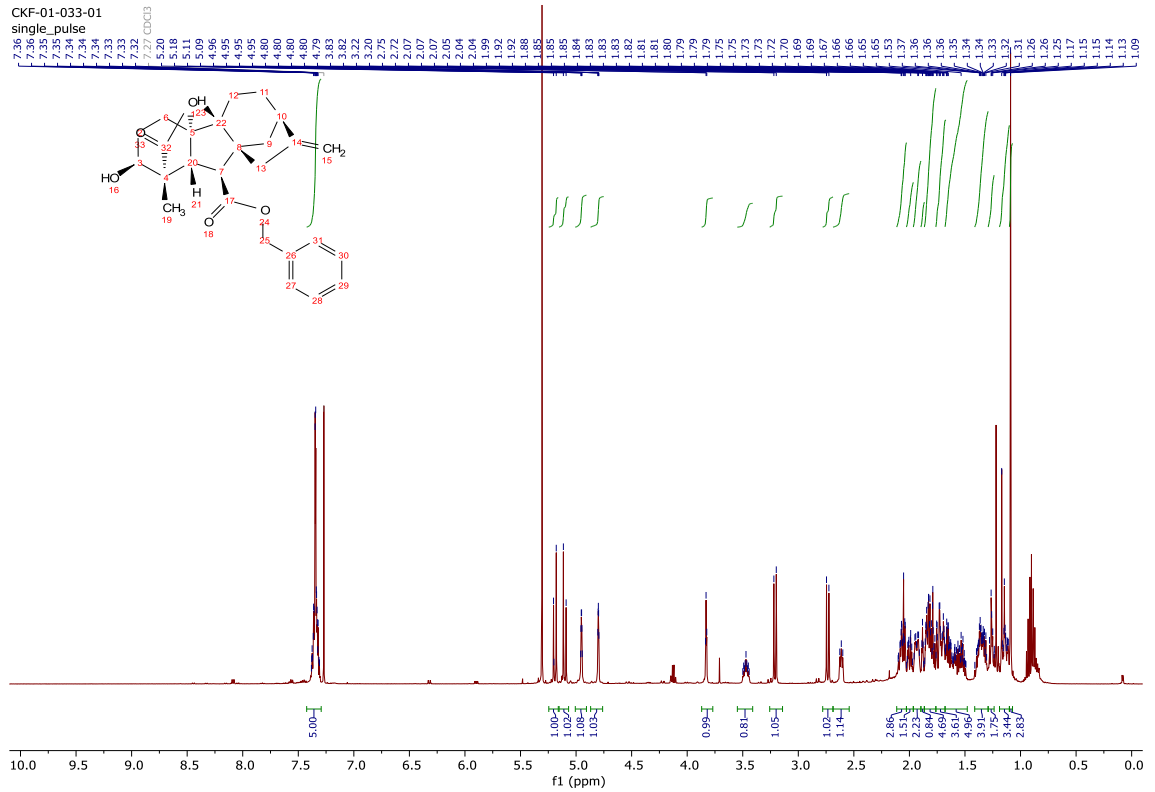
Benzyl ((1*S*,2*S*,4*a**R*,4*b**R*,7*R*,9*a**R*,10*S*,10*a**R*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylene-13-oxododecahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulene-10-carbonyl)-*L*-phenylalaninát (XVIII)

CKF-01-028-01  
single\_pulse



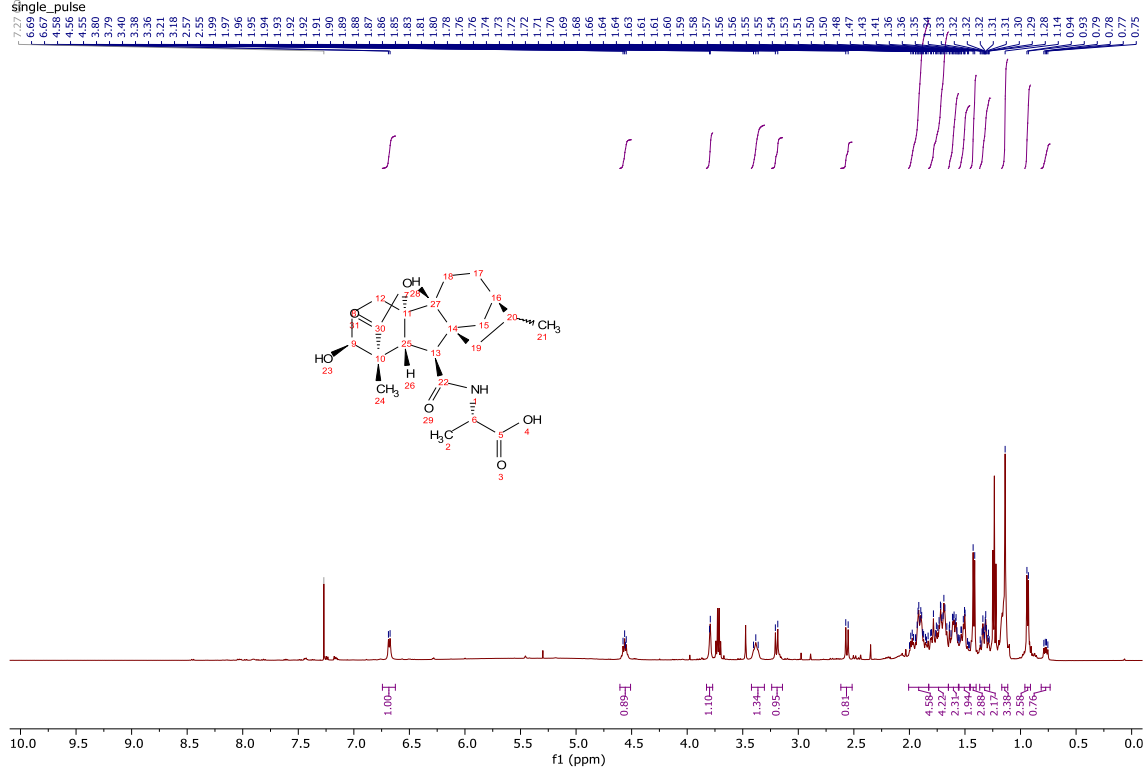


Benzyl (1*S*,2*S*,4*aR*,4*bR*,7*R*,9*aR*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1-methyl-8-methylene-13-oxododecahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[*a*]azulene-10-carboxylate (XXII)



**((1*S*,2*S*,4*aR*,4*bR*,7*R*,8*S*,9*aS*,10*S*,10*aR*)-2-hydroxy-1,8-dimethyl-13-oxododecahydro-4*a*,1-(epoxymethano)-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulene-10-carbonyl)-L-alanine (XX)**

CKF-01-030-00  
single\_pulse



CKF-01-030-00  
single\_pulse decoupled gated NOE

