

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Syntéza nových derivátů giberelinů odvozených od giberelinu
A₃ a jejich biologické vlastnosti**

Bakalářská práce

Autor: **Renáta Klvaňová**

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.**

Rok odevzdání: 2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s označením všech použitých zdrojů a spoluautorství.

V Olomouci dne 24.5.2021

.....

Podpis

Poděkování

Mé hlavní díky směřuje k vedoucímu práce doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za odborné rady, čas a obrovskou trpělivost při vypracování této práce. Dále bych chtěla moc poděkovat Mgr. Lucii Maděrkové za odborné rady a pomoc v laboratoři. Děkuji také Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. a Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D. za možnost vyzkoušet si biologické testování mých látek v jejich laboratořích.

V neposlední řadě moc děkuji i mé rodině, přátelům a známým za neskonalou trpělivost a podporu při studiu.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2021_011).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Renáta Klvaňová
Název práce A ₃	Syntéza nových derivátů giberelinů odvozených od giberelinu a jejich biologické vlastnosti
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá především syntézou biologicky aktivních derivátů kyseliny giberelové (giberelin A₃), která patří do skupiny rostlinných hormonů giberelinů. V teoretické části práce jsou obsaženy informace o giberelinech, jejich biosyntéze a biologické aktivitě a pozornost je věnována i giberelinu A₃ (GA₃) a jejím významným derivátům. V experimentální části je popsán postup syntézy jednotlivých derivátů GA₃, informace o struktuře látek a o metodách analýzy a detekce. Shrnuty jsou i výsledky biologického testování všech úspěšně připravených látek na nádorových a nenádorových buněčných liniích a *C. elegans*.

Klíčová slova	biologická aktivita; gibereliny; cytotoxicita; biosyntéza; chemická syntéza
Počet stran	60
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Renáta Klvaňová
Title	Gibberellin A ₃ -based derivatives and their biological activity
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

My Bachelor Thesis deals mainly with the synthesis of biologically active derivatives of gibberellic acid (Gibberellin A₃). A natural biologically active gibberellin that belongs to the group of plant growth regulators. The theoretical part of the thesis contains information about gibberellins, their biosynthesis and biological activity, and attention is focused on gibberellin A₃ (GA₃) and its important derivatives. The experimental part describes the procedure of synthesis of individual derivatives of GA₃, information about structures and methods of analysis and detection. The results of biological testing of all successfully prepared substances on various cell lines and *C. elegans* are also summarized.

Keywords	biological activity; gibberellins; cytotoxicity; biosynthesis; chemical synthesis
Number of pages	60
Number of appendices	1
Language	Czech

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	9
2 Teoretická část	11
2.1 Gibereliny	11
2.1.1 Dějiny giberelinů	12
2.1.2 Struktura giberelinů	13
2.1.3 Funkce a praktické využití	14
2.2 Giberelinový receptor	15
2.2.1 DELLA proteiny a jejich vztah ke giberelinům	15
2.3 Identifikace a analýza giberelinů	17
2.4 Vztah mezi strukturou a biologickými účinky giberelinů	17
2.5 Biosyntéza giberelinů	18
2.5.1 Průběh biosyntézy	19
2.5.2 Enzymy biosyntézy	20
2.5.3 Deaktivace biosyntézy	21
2.6 Chemická syntéza giberelinů – konverze C ₁₉ a C ₂₀ -GAs	22
2.6.1 Konverze C ₁₉ na C ₂₀ -GAs	22
2.6.2 Konverze C ₂₀ na C ₁₉ -GAs	23
2.7 Kyselina giberelová (GA ₃)	23
2.7.1 Biologické vlastnosti GA ₃ a její průmyslové využití	24
2.7.2 Účinky GA ₃ na živočišné buňky	25
2.7.3 Bioaktivní deriváty giberelinů	26
2.7.3.1 GA-13315	26
2.7.3.2 Amidové deriváty GA ₃	26
3 Experimentální část	27
3.1 Použité chemikálie	27
3.1.1 Použitý materiál	27
3.1.2 Použité metody	27
3.1.3 Příprava vizualizačních roztoků pro TLC analýzu	28
3.2 Příprava methylesteru kyseliny giberelové	29
3.2.1 Příprava výchozí látky pro zavedení chránicí skupiny na GA ₃	29
3.3 Příprava finálních derivátů	30
3.3.1 Chránění karboxylové skupiny kyseliny giberelové	30
3.3.2 Oxidace OH skupiny látky 5 na keton 6	31
3.3.3 Redukce dvojně vazby na A kruhu látky 6	32

3.3.4 Redukce keto skupiny v látce 7 na odpovídající alkohol 8 (3- <i>epi</i> -6)	33
3.3.5 Redukce keto skupiny a násobné vazby na A kruhu u látky 6	34
3.3.6 Odchránění karboxylové funkční skupiny v látce 6	35
3.3.7 Hydrazinolýza látky 5 a následná benzylace otevřeného produktu 11	36
3.4 Biologické testování	38
3.4.1 Biologické testování na nádorových a nenádorových buněčných liniích.....	38
3.4.2 Biologické testování na <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
4 Výsledky.....	42
4.1 Příprava methylesteru kyseliny gibberelové	42
4.2 Chránění karboxylové skupiny GA ₃ – příprava výchozího intermediátu	42
4.3 Příprava ketonu 6 z esteru 5	43
4.4 Příprava dalších derivátů z intermediátu 6.....	43
4.5 Odstranění chránicí skupiny DMB z připravených látek	44
4.6 Tvorba dvojitého nenasyceného systému u gibberelinů a ochránění nově vzniklého C19 karboxylu pomocí benzyl bromidu.....	45
4.7 Biologické testování látek	46
4.7.1 Biologické testování na nádorových a nenádorových buněčných liniích.....	46
4.7.2 Biologické testování na <i>C. elegans</i>	46
5 Diskuze.....	48
5.1 Syntéza derivátů odvozených ze skeletu GA ₃	48
5.2 Biologické testování.....	52
5.2.1 Biologické testování na nádorových a nenádorových buněčných liniích.....	52
5.2.2 Biologické testování na <i>C. elegans</i>	53
6 Závěr	54
Použitá literatura	55

Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová	IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
AcONa	octan sodný	J	štěpící konstanta
AcOK	octan draselný	KS	enzym biosyntézy giberelinů (<i>ent</i> -kaurensyntáza)
b.t.	bod tání	m	multiplet
BnBr	benzyl bromid	MeOH	methanol
CC	chromatografická kolona	MS	hmotnostní spektrometrie
CD ₃ C(O)CD ₃	deuterovaný aceton	NADPH	koenzym nikotinamidadeninukleotidfosfát
CDCl ₃	deuterovaný chloroform	NMR	nukleární magnetická rezonance
CDP	kopalyl difosfát	p	pentet
CHCl ₃	chloroform	PDA	detektor s diodovým polem
d	dublet	ppm	parts per milion
dd	dublet dubletu	RGA	represor giberelinů u <i>Arabidopsis thaliana</i>
DCM	dichlormethan	RGLx	represory giberelinů u <i>Arabidopsis thaliana</i>
DELLA	represor giberelinů (kyselina asparagová-kyselina glutamová-leucin-leucin-alanin)	RNA	ribonukleová kyselina
DMB	dimethoxybenzyl	RT	laboratorní teplota
DMF	dimethylformamid	R.t.	retenční čas
DMP	Dess-Martinovo činidlo	RVO	rotační vakuová odparka
eq, ekviv	počet ekvivalentů	s	singlet
EtOAc	ethylacetát	SLR1	represor giberelinů u rýže
GA-2ox	enzymy deaktivace biosyntézy giberelinů	SLY1	regulátor signalizace giberelinů
GAs	gibereliny	t	triplet
GA ₃	kyselina giberelová	tt	triplet tripletu
GAI	represor giberelinů u <i>Arabidopsis thaliana</i>	THF	tetrahydrofuran
GC	plynová chromatografie	TLC	tenkovrstvá chromatografie
GGPP	geranylgeranylpyrofosfát	TVHYNP	doména DELLA proteinů
GID1	giberelinový receptor	α _D	specifická optická otáčivost
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie	δ	chemický posun
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie		

1 Úvod a cíle práce

Rostlinné hormony jsou látky organického původu, které se běžně vyskytují v rostlinách ve velmi nízkých koncentracích, které i v kontextu dnešních analytických metod atakují limity detekce. I přesto dokážou značně ovlivnit fyziologické procesy v buňkách rostlin. Ovlivňují pak zejména vývoj, diferenciaci a růst rostlin či reakci rostlin na různé typy stresů. Důležitou roli ale hrají i při reprodukci či formování rostliny do její konečné podoby. Pro rostlinné hormony vzniklo obecné pojmenování „fyttohormony“ a prvním takovým objeveným fyttohormonem se stal auxin.¹

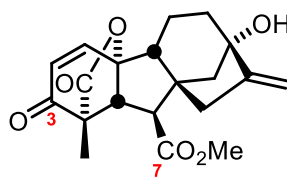
První informace o látkách tohoto typu sahají do poloviny 19. století, kdy se myšlenkou na existenci tohoto typu látek začal zabývat Charles Darwin a Julius von Sachs, otci myšlenky navozující úvahy o regulaci růstu rostlin. Od té doby se věda posunula hodně dopředu a nyní je popsáno mnoho fyttohormonů, mezi něž patří auxiny,^{2,3} cytokininy,² brassinosteroidy,⁴ gibereliny,^{5,6} strigolaktony⁷ a další.⁸ Všechny tyto látky vykazují specifické reakce na biotické a abiotické stresy rostliny a v důsledku toho se také často mění jejich hladina v rostlině. Jedná se tedy o přesně řízený proces, který se snaží udržet rostlinu v jakési optimální kondici a umožňuje jí se v mnoha ohledech rozvíjet.⁹

Aby látka byla označena za fyttohormon, tak musí kromě faktu, že ovlivňuje růst a vývoj rostliny ve velice nízké koncentraci, mít v rostlině i svůj vlastní receptor, se kterým specificky reaguje. Produkce jak hormonů, tak receptorů závisí na míře exprese příslušných genů, které musejí být v buňce v určitém počtu kopií, aby k expresi těchto genů vůbec mohlo dojít. Důležitou částí rostlin jsou i fotoreceptory, které dokážou ovlivnit řadu signálních drah rostlinných hormonů. Fotoreceptory obsahují proteiny fytochromy, které jsou velmi citlivé na světlo, a sluneční paprsky tak spouštějí jejich aktivitu stejně tak jako i aktivitu rostlinných hormonů.¹⁰

K významným rostlinným hormonům se řadí i gibereliny, což jsou přírodní látky diterpenoidního charakteru s tetracyklickým skeletem. Z hlediska hlavní funkční skupiny bychom je mohli zařadit do karboxylových kyselin. Z funkčního hlediska se podílejí na vývoji celé rostliny. Dosud bylo popsáno 136 endogenních giberelinů, ne všechny však působí na rostlinu stejnou měrou, a mnohé z nich prakticky vůbec. Mezi gibereliny s koncovou biologickou aktivitou lze zařadit pouze gibereliny A₁, A₃, A₄ a A₇, přičemž u ostatních giberelinů se má za to, že jsou buďto prekurzory k těmto giberelinům, nebo jejich katabolity, či deaktivátory. Nejdůležitějšími gibereliny jsou giberelin A₁ (GA₁) a GA₃ (také zvaný kyselina giberelové). GA₃ se hojně využívá v agronomickém průmyslu za účelem lepšího vývoje rostlin a většího výnosu zemědělských plodin.¹

V dnešní době se studiem giberelinů z pohledu funkčních derivátů (ne z pohledu jejich biologické aktivity) zabývá zejména skupina prof. Petera Heddena (Rothamsted Research, UK, a Laboratoři růstových regulátorů, Institut Experimentální Botaniky, AV ČR). Tento přední odborník na tuto problematiku tedy nyní působí v ČR a díky němu tak dochází k rozvoji tohoto typu výzkumu i zde v Olomouci. Prof. Heddenovi, který je autorem mnoha publikací řešící především otázky studia giberelinů, vděčí oblast rostlinné biologie za objasnění mnoha otázek týkajících se biosyntézy giberelinů, například odkryl informace o enzymech účastnících se biosyntézy a genech kódujících tento důležitý proces probíhající v rostlinách.¹¹⁻¹⁴

Cílem mé bakalářské práce bylo (a) vypracovat literární rešerši o giberelinech, jejich bioaktivitě a biosyntéze a (b) v rámci experimentální části připravit nové deriváty giberelinů odvozené od giberelinu A₃, otestovat, jak tyto látky působí na lidské buňky (ve spolupráci s Dr. Rárovou), na vybrané živočichy (*C. elegans*, ve spolupráci s Dr. Kadlecovou), a ohodnotit jejich aktivitu v rámci GA₃ a GA₄-oxidázách (provedeno Mgr. Jaworkem v laboratoři prof. Heddena). V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme syntézou přírodních látek, zejména pak syntézou giberelinů a jejich derivátů. Velká pozornost je věnována především derivátům kyseliny giberelové, kterou se snažíme upravit tak, aby vykazovala biologickou aktivitu vůči vybraným biologickým cílům. Tyto deriváty jsou dále také podrobeny testům *in vivo* a *in vitro* a jejich aktivita je ohodnocena. Biologická aktivita giberelinů souvisí úzce s jejich strukturou, a proto jsou připravovány nové deriváty dle již dříve známých postupů a studií, které popisují přípravu bioaktivních derivátů GA₃. Cílem mé práce tedy bylo navázat na bakalářskou práci Bc. Markéty Fuksové¹⁵ a připravit látky, které budou obsahovat ketoskupinu na C-3, nebo ochráněné GA₃ deriváty s hydroxylovou skupinou na C-3, přičemž z nich měly být dále připraveny látky s karboxylovou skupinou na C-7, tedy měla být odstraněna chránicí skupina z již dříve nasyntetizovaných derivátů (Obrázek 1). Velká pozornost měla být dále upřena hlavně na biologické testy těchto látek.



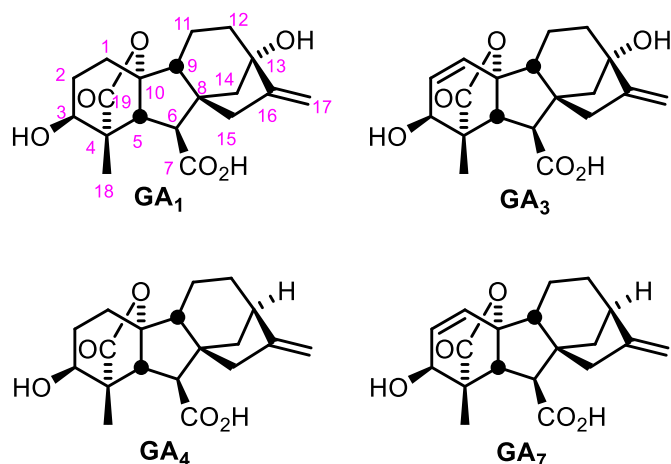
Obrázek 1. Obecný skelet derivátu giberelinu připravený Bc. Fuksovou s vyznačenými místy zamýšlené modifikace

2 Teoretická část

2.1 Gibereliny

K významným rostlinným hormonům patří mimo jiné i látky zvané gibereliny, diterpenoidní tetracyklické karboxylové kyseliny, jejichž struktura se podobá steroidním hormonům. Vyskytují se v různých rostlinných tkáních a podílejí se na vývoji celé rostliny. Dosud bylo popsáno 136 endogenních giberelinů, přičemž pouze čtyři z nich (GA₁, GA₃, GA₄, a GA₇) mají prokázanou biologickou aktivitu. Ostatních 132 giberelinů pak v rostlinách a mikroorganizmech hrají roli biosyntetických prekurzorů těchto čtyř giberelinů, jejich katabolitů, anebo dezaktivátorů (reversibilních nebo ireversibilních).¹⁶ Aktivní gibereliny se podílejí především na klíčení semen, vývoji plodů či květů a prodlužování orgánů vyšších rostlin, přičemž některé GA mají vliv pouze například na prodloužení listu a jiné zase ovlivňují kvetení rostliny.¹⁷ Jak již bylo zmíněno, nejdůležitější bioaktivní gibereliny jsou GA₁, GA₃ (také známý jako kyselina giberelová), GA₄ a GA₇ (Obrázek 2). Obecně největší pozornost je však věnována derivátům giberelinu A₃ (GA₃) z důvodu dostupnosti GA₃ (připraveno fermentací z mikroorganismů, takže snadno dostupné). Ostatní aktivní gibereliny se často podílejí zejména na vývoji květu. Obecně se koncentrace giberelinů v rostlinných tkáních pohybuje od 0,1 až 100 ng.g⁻¹ čerstvé hmoty, ale je proměnlivá a nejvyšších hodnot dosahuje v dozrávajících semenech.^{18–20} Aktivita giberelinů se často nápadně koreluje s aktivitou rostlinného hormonu auxinu. Bylo prokázáno, že gibereliny do určité míry iniciuje tvorbu auxinů, a že obě tyto skupiny fytohormonů spolu dokáží působit součinně.^{21–24}

Přesnou lokalizaci giberelinů v rostlině nelze s jistotou určit, protože se vyskytují ve všech tkáních, avšak v nedávném výzkumu bylo prokázáno, že se ve vysoké koncentraci objevují v hrotu kořene nezralých semen *Arabidopsis thaliana*. Každá tkáň tedy obsahuje jinou koncentraci giberelinů a jejich biosyntéza probíhá buď lokálně nebo jsou transportovány do určitého místa z okolních tkání. To znamená, že gibereliny jsou mobilní elementy, které jsou transportovány do potřebného místa buď na krátkou nebo i dlouhou vzdálenost. Transport byl demonstrován na kvasinkách, což poukázalo na vliv komplexu GID1-DELLA a také skupiny dusičnanů 1/peptid-transportérů. Gibereliny obecně fungují na základě mechanismu iontové pasti, který jim mobilitu výrazně omezuje a velkou roli opět hraje to, či se jedná o bioaktivní nebo neaktivní látku.²⁵



Obrázek 2. Biologicky aktivní gibereliny a jejich číslování

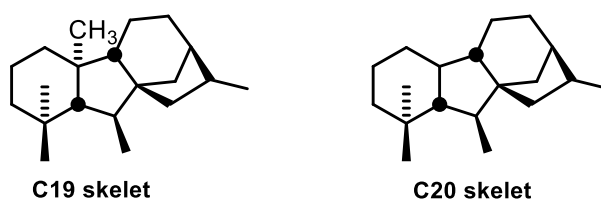
2.1.1 Dějiny giberelinů

První zmínky o giberelinech sahají až do konce 19. století do Japonska, kde v roce 1898 japonský vědec Shotaro Hori popsal plísňové onemocnění rýže, které se sekundárně vyznačovalo nadměrným rozvinutím semen. Později však bylo prokázáno, že stejné příznaky vyskytující se u onemocnění rýže vyvolávají v rostlině rýže i látky získané z houbového rostlinného patogena *Gibberella fujikuroi*, po němž také gibereliny získaly svoje pojmenování.^{6,18,26} Po tom, co v roce 1926 japonský vědec Eiči Kurosawa potvrdil, že onemocnění rýže nazývané „bakanae“ způsobuje opravdu látka z houby, mohly započít první experimenty s těmito dosud neznámými fytohormony. Do roku 1938 je datována první izolace giberelinů jako bílé krystalické látky z houbového patogenu *Gibberella fujikuroi*, přičemž bylo při následné aplikaci na rostliny zjištěno, že vykazují velmi příznivý vliv na vývoj různých částí rostliny. A proto byl také hned po druhé světové válce rozjet program i mimo Japonsko, který měl za cíl odhalit kmen hub, které by gibereliny mohly produkovat. U hub kmene *Fusaria* byla nejdříve objevena pouze kyselina giberelová (později identifikována jako směs látek, kde GA₃ měla hlavní podíl), v pozdějších výzkumech však bylo izolováno z houby *Gibberella fujikuroi* také dalších 24 giberelinů. Cesta k izolaci čisté látky byla však ještě velmi spletitá, jelikož dostupný vzorek byl následně označen za směs dvou sloučenin – giberelinu A a giberelinu B. Později bylo zjištěno, že samotný giberelin A se skládá z dalších třech látek – GA₁, GA₂ a GA₃.^{27,28} Již v polovině 50.let se ve Spojených státech začaly gibereliny vyrábět komerčně k zemědělským účelům, protože bylo potvrzeno na rostlinách hrachu a kukuřice, že obnovují růst u trpasličích rostlin. Úplným potvrzením výskytu giberelinů v rostlinách se ale stala až izolace provedená roku 1958 J. MacMillanem a P.J. Suterem z nezralých semen fazole obecné.^{27,28} O několik let později tito dva vědci

dokázali izolovat i další gibereliny – GA₅, GA₆ a GA₈. Od té doby proběhlo mnoho výzkumů v dané oblasti a došlo k identifikování celkově již 136 endogenních giberelinů, které se od konference v Ottawě z roku 1967 jednotně začali označovat zkratkou „GA“ a příslušným číslem podle pořadí popsání (např. „GA₃“ označuje kyselinu giberelovou – látku, jež po svém popsání byla na každém kontinentě známa pod jiným jménem a zkratkou). Pro jednotné označení „kyselina giberelová“ se dohodli Britové, Američané a Japonci poté, co dospěli k výsledku, že v případě kyseliny giberelové, giberelinu-X a giberelinu A3 se jedná o jednu a tutéž strukturu.²⁷ Do konce 60.let 20.století byla identifikace jednotlivých giberelinů možná pouze z čistého materiálu o vysoké návážce, následně však došlo k rozvoji analytických metod, které umožnily kombinovat plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií. Tato analytická metoda umožnila díky známým hmotnostním spektrům (fragmentaci) látek identifikovat nejdříve látky již objevené a od nich odvozovat struktury nové, přičemž nebylo potřeba tak vysokého množství látky a čistoty jako do té doby. Jedinou nevýhodou tohoto postupu je, že ve většině případů nelze odvodit strukturní závislosti mezi jednotlivými substituenty. A tak se tento problém řešil přípravou (de novo syntéza) navržených struktur, jejichž GC/MS spektra byla následně porovnána s naměřenými. Pokud se spektra shodovala, nový giberelin byl na světě. K dnešnímu dni je tak známo 136 endogenních giberelinů, přičemž se odhaduje, že těchto látek se přirozeně v rostlinách nachází mnohem více. Tyto ale prozatím unikají naší pozornosti, protože se pravděpodobně vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (v řádech ng.g⁻¹).

2.1.2 Struktura giberelinů

Gibereliny jsou považovány z chemického hlediska za cyklické diterpenoidní karboxylové kyseliny, které lze dělit na dvě podskupiny (Obrázek 3), přičemž obsáhlejší 60 členná skupina se vyznačuje pentacyklickou kostrou s 19 uhlíky.²⁸ C₁₉-gibereliny se považují za deriváty *ent*-20-norgiberelanu.¹⁸ Liší se od sebe oxidačním stavem a jedná se o biologicky aktivní látky, jejichž aktivita je podmíněna přítomností γ -laktonového můstku mezi C-4 a C-10, hydroxylovou skupinou na C-3 β a karboxylovou skupinou na C-6, která poskytuje vazbu GID1 receptoru.²⁹



Obrázek 3. Základní skelety giberelinů

Gibereliny jsou si obecně strukturně velmi podobné, často je odlišuje počet a umístění hydroxylových skupin a často bývají přítomny jako glykosidy či glukosyl estery.³⁰ Gibereliny se skládají ze čtyř kruhů, přičemž kruh A, B a C obsahují šest uhlíků a kruh D pouze 5. Množství a umístění hydroxy skupin či dvojných vazeb výrazně ovlivňuje aktivitu giberelinů, například degradací laktonového kruhu nebo hydroxylací na C-2 β dojde ke ztrátě aktivity hormonu.^{5,19,31}

Ke druhé skupině giberelinů se řadí C₂₀-gibereliny, které obsahují všech 20 uhlíků mateřské struktury *ent*-giberelanu a mají dvojnou vazbu pouze na D kruhu^{15,16} a hydroxylové skupiny na C2, C3 anebo C13 atomech uhlíku. Jejich karboxylové skupiny se nacházejí v pozici na C-7 a C-18. Rozdíly ve struktuře jsou také dány místem výskytu giberelinu. Pokud jsou gibereliny biosyntetizovány v mikroorganismech, pak mají C13 hydroxylovou funkční skupinu. Naopak gibereliny vyskytující se ve vyšších rostlinách tyto nemají.

2.1.3 Funkce a praktické využití

Gibereliny patří k nepostradatelným molekulám v rostlinných procesech, protože díky nim rostliny dokáží čelit stresovým podmínkám a zajistit si tak podmínky pro svůj optimální vývoj. Biologicky aktivní gibereliny interagují při těchto procesech s receptorem, který má vysokou specifickou afinitu vůči těmto molekulám. Následný přenos signálu do buňky, který je iniciován touto interakcí, je pak několika krokovým procesem, a je řízen několika signálními dráhami giberelinů.¹⁶

Dříve byly gibereliny považovány za stimulanty auxinů, avšak dnes je jasné, že dokážou existovat a fungovat jako samostatné rostlinné hormony, které pouze interagují s auxiny či jinými fytohormony. Rozdíl mezi gibereliny a auxiny je značný. Gibereliny se často podílejí například na klíčení semen vyšších rostlin, klíčení spor kapradin nebo na obnovení růstu geneticky zakrnělých rostlin, avšak auxiny s těmito ději nemají nic společného. U některých rostlin trpasličího vzrůstu je dokonce zakrslý růst podmíněn nízkou hladinou giberelinů nebo jim podobných látek v buňce.³² Na molekulární úrovni se projevuje působení giberelinů tak, že řídí syntézu proteinů, RNA a membránových fosfolipidů.³³

Primárně lze zařadit gibereliny mezi hormony, které prodlužují buňky a způsobují tak dlouhivý růst stonku. Nejdůležitější roli při tomto procesu hraje giberelin A₁. Díky tomuto giberelinu také dochází ke klíčení a velké produkci enzymů, zejména α -amyláz, např. i přesto, že během klíčení zrovna semena nemají optimální podmínky pro následný růst. Aktivita giberelinů se v neposlední řadě projevuje při růstu a funkci květů, kdy dokáže vyvolat dvoudomost květů, ale také při vývoji plodů.²⁰

Díky všem těmto vyjmenovaným účinkům se gibereliny hojně aplikují hlavně v zemědělském průmyslu k dosažení většího výnosu plodin nebo v potravinářském průmyslu například k zabránění stárnutí plodů. Konkrétně pak například při aplikaci giberelinů na rostliny révy vinné, kdy dochází k potlačení růstu plodů a vzniku pecek; nebo k zabránění svraštění kůry u citrusů či jablek. Přidání giberelinu A₃ ke sladovému ječmeni se pak využívá i v pivovarnictví, kde způsobuje urychlení nákladné výroby sladu při výrobě piva.²⁰

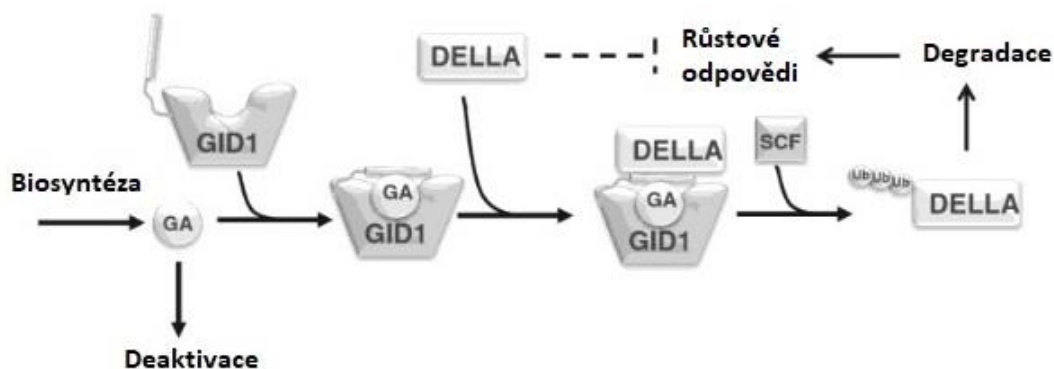
2.2 Giberelinový receptor

K tomu, aby se mohla projevit aktivita giberelinů v rostlině, je potřeba specifických receptorů giberelinů, které jsou umístěny v plazmatické membráně buňky.³⁴ Jelikož jsou gibereliny látky hydrofobního charakteru, mohou také pasivně difundovat přes membránu buňky. Právě tento fakt vedl ke hledání GA receptoru, který by splňoval podmínku reverzibilní reakce s GA a specifické vazby s biologicky aktivním GA. Pomocí několika biochemických procesů byl identifikován první takový receptor, rozpustný protein z rýžových listů, další byl nalezen v rostlině čeledi bobovitých, vigně hranaté.³⁴ Receptor vykazuje specifickou afinitu výhradně k bioaktivním giberelinům prostřednictvím zatím neidentifikovaného genu, který je lokalizován v jádře buňky.^{31,35} Strukturně se tento receptor nazývaný Gibberellin Insensitive Dwarf1 (GID1 receptor) téměř shoduje s karboxyl esterázami a postupně zjišťujeme, že prochází evolučními změnami. GID1 se totiž vyvinul v době, kdy došlo k vyčlenění cévnatých rostlin ze skupiny mechů a kapradin, ale dnes je již známý nový citlivější receptor GID typu B, který indukuje růst rostliny za velmi nepříznivých podmínek. Důležitou ale jednoduchou biochemickou reakcí se díky giberelinům v GID 1 generuje vazebný (receptor) pro přisednutí DELLA proteinu.³⁶ Pro interakci s gibereliny je velmi důležitá konformace GID1 a následně jeho vnitřní struktura zejména pak uspořádání aminokyselin v něm. Jejich přítomnost a původ jsou determinující pro funkci GID1.³⁵

2.2.1 DELLA proteiny a jejich vztah ke giberelinům

DELLA proteiny se přímo účastní negativní signalizace giberelinů, protože fungují jako jejich represory.³⁵ Toto pozorování bylo potvrzeno i díky kvasinkovému dvouhybridnímu experimentu, který je založen na skutečnosti, že GID1 se sekvenčně podobá lipázám citlivým na hormony. Díky tomuto experimentu byla nejen dokázána samotná souvislost giberelinového receptoru s DELLA proteiny, ale také míra interakce jednotlivých giberelinů, kdy se nejsilnější účinek prokázal u GA₄, a při vyšších koncentracích pak působily i GA₁ a

GA₃. Počet DELLA proteinů se u různých rostlin liší, u *Arabidopsis* se jich vyskytuje pět (RGL1, RGL2, RGL3, RGA, GAI), zatímco u rýže pouze jeden (SLR1). DELLA proteiny obsahují několik domén, jejichž aktivita (interakce se substráty) ovlivňuje vazbu receptoru na protein. Při deaktivaci hlavních DELLA a TVHYNP domén dochází k úplnému přerušení interakce protein-receptor. Při narušení C-koncové oblasti a oblasti zipu Leu byla síla vazby signifikantně snížena, a v případě delece oblasti bohaté na serin a treonin či SPACE oblasti nedošlo k žádným změnám vazby receptor-protein.³⁵ Funkce DELLA proteinů spočívá mimo jiné v regulaci transkripce protože utlumuje expresi některých genů nezbytných k biosyntéze giberelinů (via interakce s N-koncovou doménou DELLA proteinů – zejména pak RGA a GAI). Gibereliny dokážou tyto proteiny inaktivovat pomocí pozitivního regulátoru signalizace GA, který se nazývá SLEEPY1 (SLY1) protein a obsahuje důležitý komponent F-box. F-box je identifikován pomocí DELLA domén a je součástí komplexu ubikvitin – proteázy jež po interakci s DELLA proteinem zprostředkuje její degradaci. Jako důsledek interakce giberelinů s DELLA proteinem se také ukázalo, že inaktivace DELLA proteinů vede k lepšímu vývoji květů semenných rostlin. Stále pak také dochází k ovlivnění plodnosti tyčinek či procesu růstu.²⁰



Obr.4 Vztah receptoru giberelinů GID1 a DELLA proteinů (převzato a upraveno z¹⁹)

GA – giberelin; GID1 – giberelinový receptor Gibberellin Insensitive Dwarf1;

DELLA protein – represor giberelinů (zkratka vyjadřuje zastoupení jednotlivých aminokyselin D – kyselina asparagová, E – kyselina glutamová, L – leucin, L – leucin, A – alanin); SCF – komplex E3 ubikvitin ligasy (Skp1-cullin 1-F-box komplex); ub – ubikvitinace

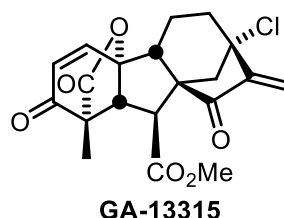
2.3 Identifikace a analýza giberelinů

Analýza giberelinů a vůbec jejich identifikace často není vůbec jednoduchá, jelikož množství hormonů v rostlinných tkáních bývá velmi malé. Není tomu jinak ani u giberelinů, které se vyskytují v koncentracích řádově $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. V dnešní době je již charakterizováno 136 endogenních giberelinů, které byly analyzovány buď v rostlinách, anebo v mikroorganismech a houbách.¹⁸ Struktury prvních z těchto sloučenin byly určeny s pomocí rentgenových krystalografických technik. Avšak tato metoda potřebuje vypěstovat monokrystal pro analýzu, což implikuje mít k dispozici značné množství čisté látky. Z tohoto důvodu pak struktura většiny ze 136 giberelinů byla určena na základě NMR spektroskopie, anebo na základě porovnání cíleně připravených látek s detekovanými GC/MS anebo HPLC/MS chromatogramy.²⁸ Dále pak stačí mít k dispozici databázi spekter a následně porovnávat naměřená GC-MS respektive UPLC-MS/MS chromatogramy a MS/MS spektra a identifikovat známé látky na základě retenčního času a MS/MS fragmentace. Zejména pak využití UPLC/MS metod v dnešní době umožňuje s vysokou citlivostí a také rychlostí poskytovat informace jak o struktuře hormonů, tak o jejich úloze v rostlinném organismu.²⁹

2.4 Vztah mezi strukturou a biologickými účinky giberelinů

Jak bylo již dříve zmíněno, ne všechny gibereliny jsou bioaktivními látkami a mezi ty aktivní se řadí hlavně GA_1 , A_3 , A_4 a GA_7 .³¹ Dosud nebylo s úplnou určitostí potvrzeno mnoho giberelinů s protinádorovou aktivitou, avšak největší pozornost je v tomto ohledu věnována zejména GA_3 a jejím derivátům. Bioaktivita souvisící se strukturou těchto látek je především spojena s pentacyklickým D kruhem. Bylo zjištěno, že důležitou roli hraje umístění keto skupiny na A nebo D kruhu, která se však přirozeně na giberelinech nevyskytuje a musí tak být na D kruh experimentálně přidána.³⁷

Většina derivátů giberelinů tedy v léčbě nádorů nefunguje, avšak byl nalezen jeden, jehož hodnoty cytotoxicity jsou velmi příznivé (Obrázek 5). Jedná se o methylester 13-chlor-3,15-dioxygiberelinové kyseliny (GA-13315) jehož antiproliferační aktivita se projevila u různých druhů tumorů. Nejvýznamnější účinek byl zaznamenán u nádorových buněk rakoviny plic (typ A549).³⁸



Obrázek 5. GA-13315. Neaktivnější dosud publikovaný derivát GA₃ s antiproliferačními účinky u vybraných rakovinotvorných buněk

V protinádorové a protizánětlivé léčbě dosahují mnohem lepších výsledků prekurzory giberelinů – *ent*-kaureny, a to například ericalycin B a oridonin, které obsahují shodně α,β -nenasycené ketony D kruhu. Právě těmito strukturami byla inspirována syntéza nových derivátů giberelinů, kde by mohly tyto keto skupiny hrát významnou roli ve smyslu ovlivnění látky natolik, aby byla toxická pro nádorové buňky organismu.³⁷

V souvislosti s protizánětlivou aktivitou jsou také GAs spojovány s rostlinou *Aloe vera*, jelikož byl potvrzen pozitivní účinek GA₃ v kombinaci s výtažky *Aloe vera* v želatině na uměle vyvolaný zánět u diabetických myši.³⁹

2.5 Biosyntéza giberelinů

Biosyntéza giberelinů byla popsána jako sled reakcí vedoucích k syntéze ať už aktivních giberelinů či jejich prekurzorů, resp. katabolitů. Klíčovým místem výzkumu biosyntézy se stala houba *Gibberella fujikuroi*, ze které se fermentací získává GA₃ a obsahuje tedy gibereliny v relativně vysokých koncentracích.^{1,12} Dobře fungující biosyntéza GAs je zodpovědná za normální vývoj vyšších rostlin, je tedy nezbytnou a zároveň velmi složitou reakcí a součástí životního cyklu rostlin.

Ke vzniku koncových biologicky aktivních giberelinů dochází ve vyšších rostlinách v cytoplazmě a tato biosyntéza probíhá v několika krocích, přičemž nejdříve musí dojít k vytvoření počáteční struktury, ze které jsou odvozeny gibereliny – *ent*-kaurenu. Syntéza *ent*-kaurenu probíhá prostřednictvím prekurzoru všech diterpenů, geranylgeranyl pyrofosfátu (GGPP) vznikajícího z kyseliny mevalonové, v protoplastidech. Následně dochází k postupné oxidaci *ent*-kaurenu za přítomnosti mnoha různých enzymů a produktem této reakce je GA₁₂-aldehyd. Identifikace těchto meziproduktů biosyntézy pomocí metody GC-MS dokázala přítomnost GA₁₂-aldehydu v extraktech zralých semen rostliny *Pisum sativum* a bylo zjištěno, že v dalším a zároveň v posledním kroku biosyntézy se metabolizuje

GA₁₂-aldehyd na GA₁₂ a dochází tak následně ke vzniku aktivních giberelinů či jejich meziproductů.^{1,12}

2.5.1 Průběh biosyntézy

Prvním krokem biosyntézy je vznik základního meziproductu giberelinů – *ent*-kaurenu, jenž je biosyntetizován z GGPP v proplastidech za účasti enzymů *ent*-kaurensyntázy (KS) a kopalyldifosfát syntázy (CPS). V případě GGPP se jedná o látku, jež je získána z kyseliny mevalonové, a která je jak prekurzorem C₂₀ GAs, tak i karotenoidů a je součástí zeleného barviva rostlin chlorofylu.⁴⁰ Reakce probíhá hlavně v chloroplastech semen pšenice a leukoplastech endospermu dýně⁴¹ jako kaskádová cyklizace geranylgeranylpyrofosfátu (GGPP), v němž nejdříve dojde k první cyklizaci GGPP (A-aktivitě) na bicyklický diterpen (CDP) a následně k druhému, úplnému zacyklení GGPP (B-aktivitě) na *ent*-kauren, přičemž vhodnými podmínkami pro průběh reakce je přítomnost Mg²⁺ iontů (Schéma 1).

Ve druhém kroku biosyntézy, která se dá považovat za univerzální pro všechny druhy rostlin, dochází k oxidaci *ent*-kaurenu na *ent*-kaurenol a následně na *ent*-kaurenal pomocí enzymů monooxidáz obsahujících cytochrom P450. Z *ent*-kaurenalu poté vzniká *ent*-kaurenová kyselina, která reaguje dvěma způsoby, a to buď na *ent*-dikaurenovou kyselinu nebo na *ent*-7 α -hydroxykaurenovou kyselinu. Obě tyto látky reagují dále za vzniku několika produktů, které ale nejsou součástí další biosyntézy giberelinů a nepodílejí se tak na jejich přímé přípravě. Důležitá je ale právě *ent*-6 α ,7 α -kaurenová kyselina, jejíž transformace vede k vytvoření GA₁₂-aldehydu jako hlavního intermediátu vedoucího ke vzniku plnohodnotného giberelinu.

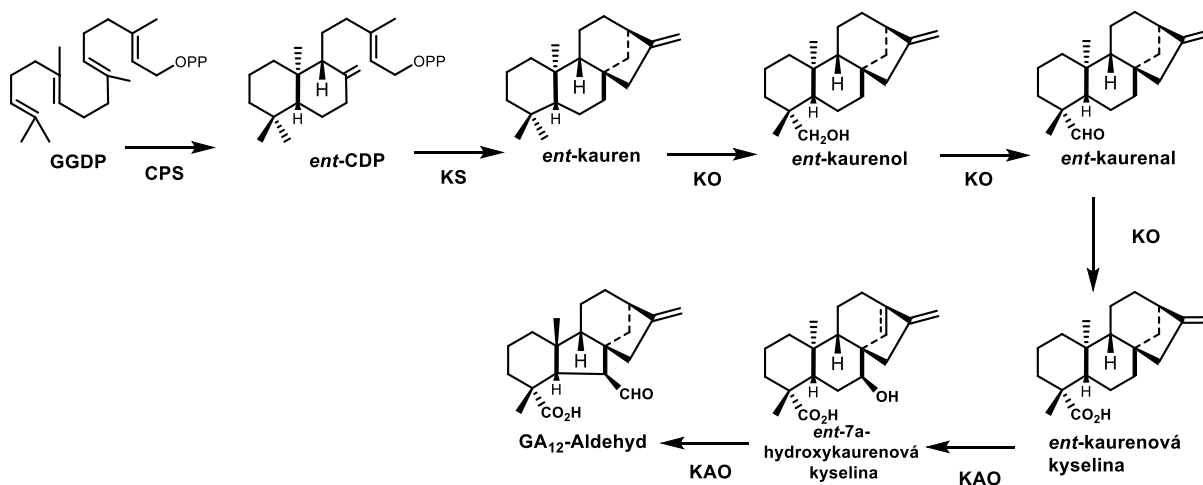


Schéma 1. Biosyntéza giberelinu A₁₂

Poslední část biosyntézy je charakteristická mnoha oxidačními reakcemi měnícími GA₁₂-aldehyd na konečnou strukturu giberelinu, kdy se nejprve C₇-aldehyd GA₁₂-aldehydu přeměňuje na karboxylovou skupinu a vzniká tak dikarboxylová kyselina. Z C₂₀-aldehydu dihydroxykyseliny dochází k oxidaci nejprve na hydroxy kyselinu a poté zpět na C₂₀-aldehyd GA₁₂, který je převeden na konečný giberelin nebo také na trikarboxylovou kyselinu.⁴² Za základní prekurzor giberelinů je tedy považován GA₁₂, jehož C-20 je oxidován a vznikají konečné struktury giberelinů. Druhou možností je hydroxylace C-13 u GA₁₂, přičemž dochází ke vzniku GA₅₃, který je postupnými kroky také dále přeměňován na aktivní či neaktivní formy giberelinů.⁴³ Jak již bylo zmíněno, GA₁₂ a GA₅₃ jsou důležitými intermediáty vzniku bioaktivních forem giberelinů. Cesta vedoucí k vytvoření nových aktivních látek je založena na působení několika enzymů řadících se do skupiny oxidáz. Za klíčový enzym lze považovat GA-20-oxidasu (GA 20-ox), jehož hlavním úkolem je vytvoření C₁₉-GAs vyjmutím C 20 z kostry C₂₀-GAs.³⁵ Právě s tímto krokem dále souvisí důležitý mezník pro vznik bioaktivních GA, a to zformování 19-10- γ -laktonového můstku typického pro C₁₉-GA. K vytvoření můstku jsou využity kyslíky z C 19 hydroxylové skupiny.³⁸

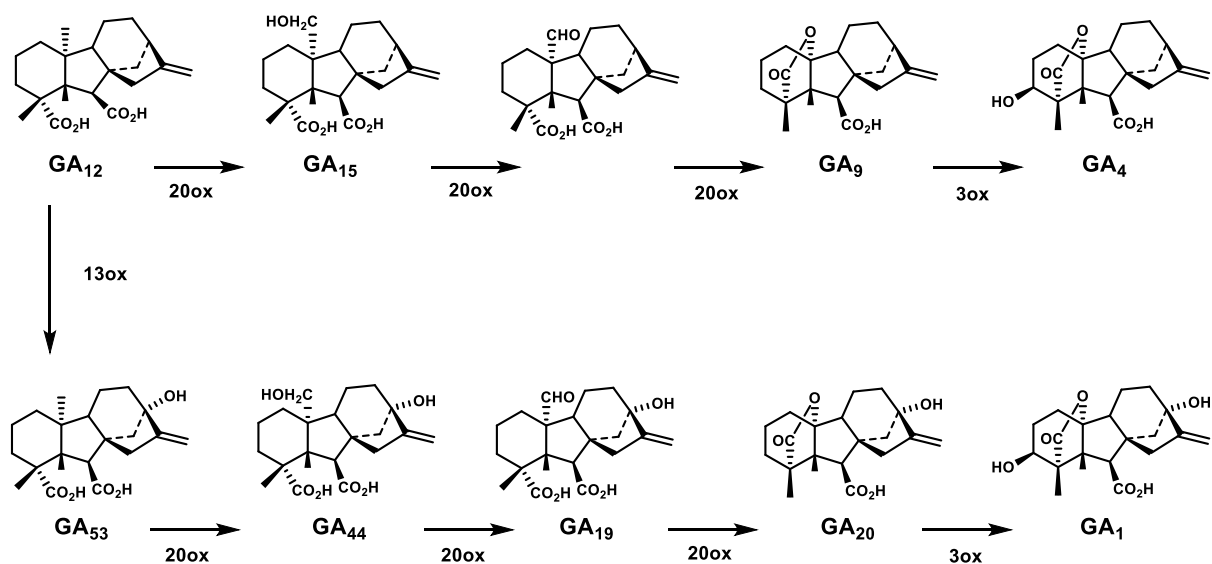


Schéma 2. Biosyntéza biologicky aktivních giberelinů z GA₁₂.

2.5.2 Enzymy biosyntézy

Celá biosyntéza je provázána působením mnoha důležitých enzymů, které katalyzují jednotlivé kroky syntézy a získány byly většinou z extraktů houby *Gibberella fujikuroi*^{1,16} nebo z endospermu dýně *Cucurbita maxima*.⁴⁴ V minulosti docházelo k častým

nesrovnalostem kvůli pojmenování jednotlivých enzymů, avšak dnes se nomenklatura shoduje na jednotných názvech. Mezi primárně působící enzymy biosyntézy lze zařadit *ent*-CPP syntázu (CPS syntáza) a *ent*-kauren syntázu, které se účastní kaskádové cyklizace GGPP vedoucí ke vzniku *ent*-kaurenu. *Ent*-kauren syntáza je považována za jeden z hlavních biosyntetických enzymů a ke svému působení potřebuje přítomnost několika různých iontů, například Mn^{2+} , Mg^{2+} či Co^{2+} .^{6,18,20,45} Lokalizace tohoto enzymu může být ve stromatu a při syntéze *ent*-kaurenu může vykazovat slabou interakci s membránami plastidů, avšak tato tvrzení zatím nejsou s úplnou přesností doložena.⁴⁶

V dalším kroku oxidace *ent*-kaurenu na výsledný GA_{12} je katalyzována pomocí skupiny enzymů monooxidáz, které aktuálně ještě nejsou úplně probádány, ale je jasné, že obsahují cytochrom P450 a jejich aktivita závisí na přítomnosti kyslíku a NADPH.⁴⁶ Monooxidázy způsobují během biosyntézy přeměnu jednoho z několika metabolitů GA na různé intermediáty, což je způsobeno nízkou substrátovou specifitou těchto enzymů.

K dalším enzymům účastnícím se biosyntézy GA lze zařadit dioxygenázy, které katalyzují cestu vzniku aktivního giberelinu z GA_{12} -aldehydu a vyžadují přítomnost 2-oxoglutarátu jako kofaktoru. Každý takový enzym patřící k dioxygenázám způsobuje přeměnu určité funkční skupiny umístěné na molekule giberelinu. K reakci na karboxylovou skupinu z aldehydu dochází díky enzymu 7-oxidasa, který působí na C-7 GA_{12} -aldehydu. Hydroxylace na C-12 a C-13 se účastní enzym 12 α -hydroxylasa závislá na přítomnosti Fe^{3+} iontů a 13-hydroxylasa závislá na 2-oxoglutarátu, která může v každé jednotlivé tkáni nebo v každém jednom giberelinu působit trochu odlišným způsobem a dokonce může v určitých reakcích vystupovat jako monooxidasa a v jiných jako dioxygenasa. Postupnou klíčovou oxidací C-20 a následného vzniku základní kostry aktivních GA_{19} zajišťuje enzym 20-oxidasa, přičemž se opět jedná o enzym závislý na přítomnosti 2-oxoglutarátu a byl izolován z velké části z tkání *P.sativum*. Působení tohoto enzymu je dosti různorodé a je označován za multifunkční enzym, který dokáže katalyzovat jak vznik GA_{19} , tak i trikarboxylových kyselin GA_{17} a GA_{25} , přičemž cesta katalýzy se v obou případech liší. 2 β -hydrolasy a 3 β -hydrolasy jsou enzymy opět významnými ale působícími protichůdně, jelikož 2 β -hydrolasy způsobují přechod aktivních GAs na neaktivní formu, ale 3 β -hydrolasy se stejně jako 20-oxidasa účastní přeměny C_{20} na C_{19} .³⁴

2.5.3 Deaktivace biosyntézy

Každá rostlina má možnost regulovat množství rostlinných hormonů ve svých tkáních a ovlivňovat tak dle potřeby své životní funkce nebo odpovědi na určitý druh stresu na ni působící. To poskytuje rostlině velkou výhodu a díky této výsadě může být také snižována

hladina bioaktivních giberelinů v rostlinách, či je lze dokonce úplně deaktivovat. Takovou inaktivaci giberelinů řídí ve velké míře velká skupina enzymů nazývajících se GA-2-oxidasy, které se dále dělí na dvě podskupiny enzymů podle druhu látky, na kterou účinkují. Na GA₂₀ a GA₁₉ tedy působí odlišné druhy enzymů skupiny GA-2ox.¹⁸ Za hlavní reakci deaktivace je považována 2β-hydroxylace zprostředkovaná právě pomocí GA-2ox, avšak nedávné studie potvrdily další možnost deaktivace, v níž hraje hlavní roli další enzym nesoucí označení CYP714D1/EUI patřící do skupiny enzymů s cytochromem P450. V rostlině má za úkol účinkovat hlavně v horních internodiích, kde epoxiduje dvojnou vazbu mezi uhlíky C16-C17 giberelinů bez 13-hydroxy skupiny. Epoxidovaný giberelin může být dále hydratován za vzniku dihydroxy-dihydro giberelinu a produktu této reakce. Tento derivát se teď stal důležitým bodem výzkumu deaktivace, jelikož bylo zjištěno, že mutantní rostliny obsahující enzymy CYP714D1/EUI vykazují vysoké hladiny dihydroxydihydro giberelinů. Tato skutečnost dokazuje přímou účast enzymu ze skupiny cytochromu P450 na deaktivaci giberelinů.³¹ Dalším způsobem deaktivace giberelinů, kde hraje roli hydroxylová skupina nebo 7-karboxylová skupina, je jejich přeměna na konjugáty, přičemž nejčastějším produktem této reakce bývá glukosa a její estery. Zatímco vznik konjugátů a 2β-hydroxylace probíhají za účelem snížení hladiny giberelinů v organismu, u *G.fujirukoi* tento proces neprobíhá, jelikož bioaktivní GA jsou žádoucí kvůli podpoře růstu v rámci napadené hostitelské rostliny a získávání živin z ní.⁴⁷

2.6 Chemická syntéza giberelinů – konverze C₁₉ a C₂₀-GAs

V historii giberelinů se pokusila řada vědců izolovat a následně i syntetizovat gibereliny ve svých laboratořích. Hodně z nich se zabývalo totální syntézou giberelinů, především kyseliny giberelové. Průkopníky této syntézy se nejdříve stal E. J. Corey (Nobelova cena za chemii 1990) následovaný v těsném závěsu Lewis N. Manderem. Po úspěšné totální syntéze giberelinu však bylo dále za cíl synteticky připravit z GA₃ i ostatní gibereliny pomocí konverze.^{6,28} Pomocí syntetických postupů tak lze připravit z vybraných C₂₀-GA již známé C₁₉-GA. C₂₀-GA se tedy vyznačují úplnou strukturou o 20 uhlících, zatímco C₁₉-GAs mají o C20 uhlík méně a v jejich molekule se objevuje laktonový můstek mezi C4 a C10.⁴⁸

2.6.1 Konverze C₁₉ na C₂₀-GAs

K výrobě a získání C₂₀-GA z C₁₉-GA je zapotřebí takového prekurzoru, který je v dostatečném množství dostupný ve volné přírodě, přičemž nejčastěji využívaným a levným giberelinem – prekurzorem s 19 C je kyselina giberelová obsažená v houbě *Gibberella fujikuroi*. Výhodou ve struktuře tohoto giberelinu je 13-hydroxylová skupina

GA₃, která poskytuje tak žádoucí konverzi na cílové látky. K dosažení požadované struktury je především v prvním kroku zapotřebí dosazení substituentu do polohy C10 u GA₃. Další kroky konverze se u jednotlivých skupin giberelinů liší, a to především v závislosti na poloze a počtu jejich hydroxy substituentů ležících na C2, C12, C13 nebo C15.²⁷

2.6.2 Konverze C₂₀ na C₁₉-GAs

Provést konverzi C₂₀ na C₁₉-GAs je možné hlavně z důvodu, že většina C₂₀-GAs se vyskytují v přírodě jako prekurzory C₁₉-GAs. Chemickou konverzí tedy lze dosáhnout získání struktur s 19 C, kdy u jednoho z dnes už více známých postupů se jako výchozí látky používají *ent*-giberelan-19,20-dioové kyseliny. V této chemické konverzi bylo využito toho, že giberelan-19,20-dioové kyseliny podléhají oxidační dekarboxylaci oloveným tetraacetátem v přítomnosti DMF nebo methanolu za vzniku směsi γ - a δ -laktonů, kdy například u konverze GA₁₃ lze ve směsi identifikovat známý C₁₉-giberelin GA₄, malé množství C3 ketonů a nový izomerní lakton, který však ani po přečištění na čistý vzorek nevykazuje žádnou biologickou aktivitu.⁴⁸

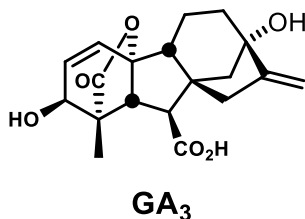
2.7 Kyselina giberelová (GA₃)

Za jednu ze základních struktur všech rostlinných hormonů giberelinů je považována kyselina giberelová neboli giberelin A₃ (GA₃). GA₃ patří mezi malou skupinu giberelinů, které vykazují silnou biologickou aktivitu, a proto je často využívána kvůli výraznému vlivu na kvetení, dozrávání semen či celkový vývoj rostliny. Vysoká koncentrace kyseliny giberelové je lokalizována do tyčinek květů a podílí se tak na vývoji květu, a to především samčího, a na vývoji stopek květů.⁴⁹

Z chemického hlediska se jedná o slabou tetracyklickou diterpenoidní kyselinu se sumárním vzorcem C₁₉H₂₂O₆ obsahující laktonový můstek a dvě hydroxylové skupiny, která je nestabilní v zásadách a minerálních kyselinách. GA₃ lze identifikovat jako bílou opticky aktivní krystalickou látku, jejíž bod tání se pohybuje v rozmezí 233-235°C. Kyselina giberelová jako produkt houbového patogenu *Gibberella fujirukoi* způsobujícím onemocnění rýže zvané *bakanae*, byla popsána v roce 1938 japonskými vědci Yabutou a Hayashim a nejdříve nesla pojmenování giberelin B, později už giberelin A.

Struktura GA₃ vychází z obecného vzorce všech GAs a skládá se tedy ze čtyř kruhů – A, B, C a D. Na A kruhu se vyskytuje kromě dvojných vazby mezi C-1 a C-2 a methylové skupiny i první ze zmíněných dvou hydroxylových skupin, přičemž první OH-skupina je označována jako sekundární a druhá jako terciární a hydroxylová skupina kruhu A má primární

postavení, tudíž při oxidaci na keto skupinu reaguje jako první. Terciární hydroxylová skupina se stejně jako volná karboxylová skupina váže na kruh B. Pro kruh A je také typický laktonový můstek, přičemž obsažený kyslík v laktonovém kruhu je v allylické pozici vůči dvojně vazbě.²⁹



Obrázek 6. struktura GA₃

2.7.1 Biologické vlastnosti GA₃ a její průmyslové využití

Ze všech známých giberelinů je GA₃ považována za jeden z nejvíce biologicky aktivních rostlinných hormonů. Díky vysoké produkci této látky houbou *Gibberella fujikuroi*, respektive jejím houbovým patogenem, pomocí fermentace může být GA₃ izolována a aplikována na různé rostlinné druhy za účelem pozorování účinků na tyto organismy. Kyselina giberelová bývá nejčastěji nanášena na rostlinné části pomocí spreje jako roztok rozpuštěné GA₃ ve vodě, další možností je GA₃ v lanolinu. Po vystavení účinkům GA₃ rostliny nejčastěji reagují změnami detekovatelnými na jejich stonku, kde dochází k prodloužení stonku, jeho tloušťnutí či k rozvoji internodií. Výrazné změny u dalších částí rostlin nejsou tak zřetelné jako u stonku, avšak u některých rostlin vyrůstají rychleji květy a v závislosti na rychlém růstu stonku se zmenšují kořeny rostliny.⁵⁰ U GA₃ byl tak prokázán vliv na aktivaci hydrolytických enzymů v buňkách, způsobují rezistenci organismů proti patogenům, dokážou i zpomalit zrání či stárnutí plodů.⁵¹ Zajímavým pokusem je i využití směsi GA₃ s roztokem Ca²⁺, která způsobuje zvýšení váhy některých rostlinných částí, zvyšuje aktivitu chlorofylu a některých hormonů a obsah vody v rostlině.⁵¹ Velkou roli v experimentech na rostlinách ovšem hraje i koncentrace GA₃, u některých rostlinných druhů lze pozorovat účinky již při malém množství aplikované látky, u jiných nestačí ani vysoké koncentrace k vyvolání jakýchkoli změn.⁵² Biologickou aktivitu GA₃ ovlivňuje i roční období, ve kterém je látka na rostlinu aplikována.⁵¹

Díky všem poznatkům o biologické aktivitě GA₃ je hojně využívána hlavně v zemědělském průmyslu, a to především v rostlinné výrobě, sladovnictví a vinařství, za účelem zvýšení produkce plodin ale i jejich kvality. Investice do výzkumu giberelinových přípravků a jejich výroba je však velmi nákladná, a proto se firmy snaží snižovat jejich

produkci. I přesto se GA₃ vyskytuje v žebříčku nejprodávanějších rostlinných hormonů působících na růst a rozvoj plodin a je produkována v řádech mnoha desítek tun ročně.⁵³

2.7.2 Účinky GA₃ na živočišné buňky

V současné době je GA₃ nejvíce využívána k ošetřování rostlin díky dobře prozkoumaným vlastnostem, které podporují vývoj rostlin a jejich určitých částí, avšak dosud nejsou dostatečně známy účinky GA₃ na živočišný organismus. Existuje ale i několik studií, které se zabývají vlivem na lidské zdraví.⁵⁴ V několika málo provedených experimentech byly dokázány nebezpečné toxické vlastnosti GA₃ pro organismus.⁵⁵ Jeden z výzkumů se zabývá dopady na zdraví při podávání GA₃ prostřednictvím stravy, kdy bylo dokázáno, že dochází ke zhoršování chronických zánětů, které mohou vést dokonce až k tvorbě tumorů, tudíž by mělo být kontrolováno množství hormonů při aplikaci na potraviny. Komplikace jsou především způsobeny přítomností SP neuropeptidů⁵⁴ nacházejících se v sensorických neuronech⁵⁶, které uvolňují tumor faktory vedoucí ke vzniku chronických onemocnění.

Jak bylo již dříve zmíněno, GA₃ dokáže paralelně účinkovat s rostlinou *Aloe vera*. Experiment s diabetickými myši vedl k závěru, že směs těchto látek dokáže při určitých koncentracích působit u zvířat proti zánětům, které u nich byly uměle vyvolány. Tento poznatek pak může znamenat i to, že původ obou látek se nemusí úplně lišit.⁵⁷

K potvrzeným pozitivním účinkům GA₃ se řadí i protinádorová aktivita tohoto hormonu v případě, kdy je mutace způsobena nějakým chemickým mutagenem. Tyto vlastnosti byly dokázány na experimentu, kdy byl použitý modelový organismus *Drosophila melanogaster* vystaven účinkům alkylačního činidla a následně po aplikaci GA₃ do organismu bylo možné sledovat, že GA₃ byla schopna redukovat počet mutací jako jsou delece chromozomů či různé druhy rekombinací.⁵⁸

GA₃ je v poslední době hodně studována za účelem zjištění jejích protinádorových účinků, testována bývá i její cytotoxicita. V tomto ohledu se docela osvědčily komplexy GA₃ s některými vybranými kovy jako jsou například platina, selen a zlato. K reakci s ionty těchto kovů mohlo dojít díky jediné karboxylové skupině GA₃ za určitého pH a za vzniku komplexu. Po testování na vybraných mikroorganismech se objevila antimikrobiální aktivita u komplexů s Au³⁺ a Se⁺⁴, naopak při testech na dvou nádorových buněčných liniích se zjistila relativně malá cytotoxicita u komplexů s Au³⁺ a Pt²⁺, avšak ve srovnání s protinádorovými léčivy je tato cytotoxicita stále vysoká. Nelze však vyloučit, že dalšími úpravami komplexů s GA₃ může být dosaženo nových a snad i lepších výsledků v léčbě nádorů.⁵⁹

2.7.3 Bioaktivní deriváty giberelinů

2.7.3.1 GA-13315

Synteticky připraveným derivátem GA₃ s vysokou protinádorovou aktivitou, a naopak nízkou cytotoxicitou je methylester 13-chlor-3,15-dioxy-giberelové kyseliny, jehož objev může vést k získání dalšího účinného léčiva zhoubných nádorů na farmaceutickém trhu. Jeho výhoda spočívá v tom, že v krátkém časovém úseku nedochází k rezistenci buněk proti GA-13315, ba dokonce jsou k němu buňky citlivější a to již při nízkých dávkách této látky.³⁸ Jak bylo již dříve zmíněno v textu, protinádorová aktivita derivátu je podmíněna hlavně přítomností α,β -nenasycených ketonů na A- a D-kruhu giberelinu, sloučenina dále obsahuje chlor na C-13 uhlíku místo hydroxylové skupiny, methyl na karboxyskupině a byla přidána i další ketoskupina na C-15. Nový derivát byl testován na mnoha nádorových buněčných liniích s velmi příznivými výsledky, nejen co se týče antiproliferačních vlastností, ale bylo zjištěno, že GA-13315 ovlivňuje i růst nádorů, tzv. angiogenezi. Angiogenní účinek je velice patrný hlavně u nádorových buněk lidského adenokarcinomu označovaných A549, které jsou odvozené od lidských plicních buněk.

2.7.3.2 Amidové deriváty GA₃

Na dnešním farmaceutickém trhu se často nacházejí léčiva, která ve své struktuře obsahují amidovou vazbu. Ta se používá jak v průmyslu, tak v medicínském odvětví hlavně díky jednoduchosti jejich přípravy.⁶⁰ Proto byla amidová vazba využita i k výrobě nových derivátů GA₃, které byly testovány na cytotoxicitu na různých nádorových buněčných liniích. Větší pozornost však byla věnována nádorovým buňkám rakoviny prostaty, kde sice nebyla identifikována jakákoli cytotoxicita, ovšem bylo zjištěno, že amidové deriváty mohou mít význam v metabolismu cholesterolu buněk. Konkrétně došlo ke snížení absorpce volného cholesterolu v buňkách a také acetylovaného lipoproteinu s nízkou hustotou.⁶¹

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

K syntéze výchozích látek a jednotlivých derivátů a intermediátů byly použity tyto chemikálie:

1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), 2,4-dimethoxybenzylalkohol, aceton, benzyl bromid (BnBr), bromid zinečnatý (ZnBr_2), Dess-Martinovo činidlo (DMP), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4), dichlormethan (DCM), dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMS), ethylacetát (EtOAc), hexan, hydrazin monochlorid ($\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), chlorid amonný (NH_4Cl), chlorid měďnatý (CuCl_2), chloroform (CHCl_3), deuterovaný chloroform (CDCl_3), K-selektrid, kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová (CH_3COOH), methanol (MeOH), methyljodid (MeI), nasycené roztoky NaCl, petrolether (PE), síran hořečnatý (MgSO_4), síran sodný (Na_2SO_4), *tert*-butylalkohol (*t*-BuOH), tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4), tetrahydrofuran (THF), trichloroacetonitril (CCl_3CN), trichloro-2,4-MeOphenylacetimidát, uhličitan draselný (K_2CO_3), uhličitan sodný (Na_2CO_3).

3.1.1 Použitý materiál

Biologické testy byly provedeny na nenádorových buněčných liniích sítnicového pigmentového epitelu RPE-1 a nádorových buněčných liniích karcinomu prsu MCF-7. Dále byly látky testovány na hlístovi *Caenorhabditis elegans* a na GA_3 - a GA_4 -oxidasech.

3.1.2 Použité metody

Celá experimentální část bakalářské práce byla zpracována pomocí níže uvedených metod. Syntetické metody byly prováděny v aparaturách žíhaných plamenem pod inertní atmosférou (argon) dle standartních postupů. Průběžná kontrola reakcí byla prováděna pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC), kde stacionární fázi zastupovala hliníková destička překrytá vrstvou sorbentu, v tomto případě silikagelem. Jednotlivé sloučeniny byly následně zviditelněny pomocí UV lampy při 254 nm a pomocí vizualizačních roztoků manganistanu draselného (KMnO_4) nebo Hannesianova roztoku. Některé z požadovaných látek byly ze směsi oddělovány pomocí metody extrakce kapalina-kapalina, kde analyzovaná látka přešla do organické fáze a byly filtrovány přes Celit[®].

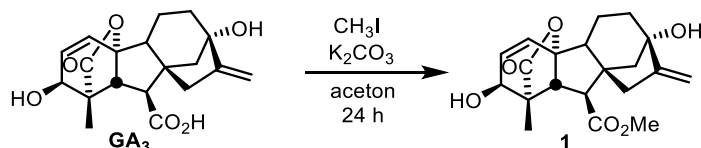
Následně byly produkty zbavovány nečistot na chromatografické koloně (CC) za použití silikagelu a vhodné mobilní fáze. Tou byla směs rozpouštědel v určitých poměrech, nejčastěji DCM:EtOAc, DCM:MeOH anebo EtOAc:hexan. Frakce s finálními produkty byly jímány do zkumavek o objemu 20 ml, následně byly převedeny do jedné baňky a produkty byly odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

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 naneseny na reverzní kolonu (Symmetry C18, 5 μm , 150 mm x 2,1 mm; Waters, Milford, MA, USA) při 40 °C. Rozpouštědlo A obsahovalo 15mM mravenčnan amoný (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 ESI. Napětí bylo nastaveno na 15 V, iontový zdroj byl zahřán na 120 °C a měření bylo prováděno v pozitivním (ESI^+) a negativním módu (ESI^-). ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL 500 JNM-ECA pracující při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C) v rozpouštědlech CDCl_3 nebo CD_3COCD_3 při laboratorní teplotě. Chemické posuny (δ , ppm) a štěpící konstanty (Hz) ^1H NMR spekter jsou uvedeny standardním způsobem vzhledem ke zbývajícímu CHCl_3 přítomnému v 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}C NMR chemické posuny (δ , ppm) jsou uváděny vzhledem k 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).

3.1.3 Příprava vizualizačních roztoků pro TLC analýzu

- Hannesianův vizualizační roztok – rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové v 250 ml ethanolu vznikl Hannesianův roztok.
- Roztok KMnO_4 – rozpuštěním 9 g KMnO_4 a 20 g K_2CO_3 v 150 ml 10 % NaOH vznikl zásaditý roztok KMnO_4 .

3.2 Příprava methylesteru kyseliny giberelové



V acetonu (1000 ml, 0.14 M) byla rozpuštěna látka **1** a směs byla míchána po dobu 5 minut. Následně byl ke směsi přidán K_2CO_3 (29.9 g, 216 mmol, 1.5 ekviv). Po 5-ti minutách míchání byl postupně do reakční směsi dodán MeI (10.8 ml, 173 mmol, 1.2 ekviv) a míchání pokračovalo dalších 7 dní. Po této době byla reakce ukončena přidáním H_2O (400 ml) a následně i EtOAc (500 ml). Vzniklá směs byla promyta pomocí nasyceného roztoku NaCl (3 x 200 ml). Organická vrstva byla vysušena nad bezvodým Na_2SO_4 , produkt byl zfiltrován a zahuštěn na RVO. Zbývající vodná fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 500 ml) a spojené organické extrakty byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaCl (200 ml) a následně sušeny nad Na_2SO_4 . Surový produkt byl zfiltrován, odpařen na RVO a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2 , aceton:hexan = 2:3) a poskytl finální produkt **2** (111.76 g, 70 %).

B.t. = 195-196,5 °C

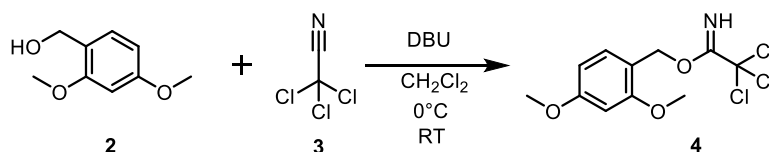
$\alpha_D^{24} = +53,2^\circ$ ($c = 1,62$; CH_3OH)

1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 6.32 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 5.90 (dd, $J = 9.3, 3.7$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J = 2.9, 1.9$ Hz, 1H), 4.96 (dd, 1H), 4.15 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.20 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.27 – 2.17 (m, 2H), 2.14 – 2.00 (m, 3H), 1.96 – 1.88 (m, 2H), 1.84 – 1.78 (m, 1H), 1.74 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 1.69 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.24 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 178.42, 172.58, 157.02, 133.13, 132.44, 107.76, 90.49, 78.30, 69.92, 53.54, 52.88, 52.29, 51.16, 50.70, 50.58, 44.91, 43.17, 38.30, 17.10, 14.50

MS (ESI⁺), m/z (%): 378 [$M+NH_4$]⁺, 399 [$M+K$]⁺; R.t. = 14.06 min.

3.2.1 Příprava výchozí látky pro zavedení chránicí skupiny na GA₃



DBU (0.905 g, 5.95 mmol, 0.4 ekviv) byla přidána do roztoku látky **2** (10 g, 59.5 mmol, 1.0 ekviv) rozpuštěné v CH_2Cl_2 (200 ml, 0,3 M) a byla míchána za RT. Směs byla po 15-ti

minutách ochlazená na 0°C a po 5-ti minutách byla přidána **3** (7.15 ml, 71.3 mmol, 1.2 ekviv). Výsledná reakční směs byla ponechána se ohřát na RT a byla míchána přes noc. Směs během doby míchání změnila svou barvu ze světlé barvy na tmavou. Výsledný roztok byl odpařen na RVO a byl získán surový produkt. Ten byl následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO₂; PE:EtOAc = 2:1) a poskytl látku **4** (20 g, 100 %) ve formě tmavé olejovité kapaliny.

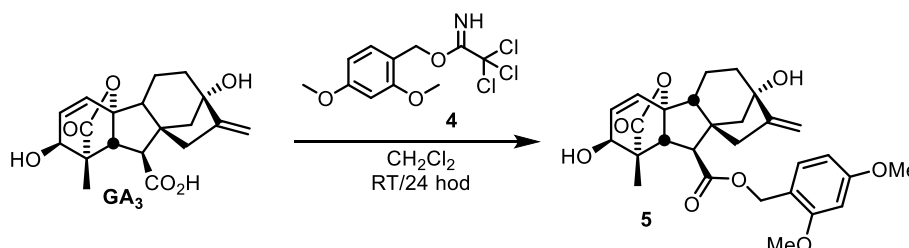
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 3.82 (s, 6H), 5.31 (s, 2H), 6.48 (s, 1H), 6.49 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H, minor NH), 8.33 (s, 1H, major NH).

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 55.6, 55.6, 55.6, 55.6, 55.7, 66.8, 91.8, 98.6, 98.7, 104.1, 104.2, 116.5, 130.6, 130.7, 130.8, 130.9, 159.0, 161.4, 163.0.

3.3 Příprava finálních derivátů

3.3.1 Chránění karboxylové skupiny kyseliny gibberelové

*2,4-dimethoxybenzyl (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*



Látka **4** (14 g, 44.8 mmol, 1.1 ekviv) byla rozpuštěna za RT v CH₂Cl₂ (165 mL, 0.25 M) a následně byla přidána **GA₃** (14.1 g, 40.7 mmol, 1.0 ekviv). Tato směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hodin. Surový produkt byl odpařen na RVO a následně čištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO₂, DCM:EtOAc = 9:1->4:1->2:1->1:2). Jako finální produkt byla izolována látka **5** (6.6 g, 33 %) v podobě bílé krystalické látky.

Bílá krystalická látka

B.t. = 188,7 – 191,2 °C

$\alpha_D^{21,5} = 28.4$ (*c* = 1.21, aceton)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 5.3, 2.3 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.31 (dd, *J* = 9.2, 0.9 Hz, 1H), 5.89 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 5.24 (dd, *J* = 2.6, 2.1 Hz, 1H), 5.14 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.91 (t, *J* = 2.1 Hz,

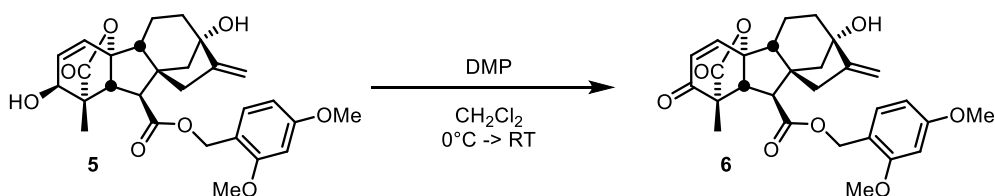
¹H), 4.18 – 4.11 (m, 1H), 3.81 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 3.79 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), 3.20 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.78 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.23 – 2.10 (m, 2H), 2.07 – 2.02 (m, 1H), 1.98 (dd, *J* = 10.9, 2.4 Hz, 1H), 1.92 – 1.61 (m, 5H), 1.23 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ (ppm): 178.69, 172.34, 161.75, 159.21, 157.48, 132.96, 132.67, 132.02, 116.06, 107.32, 104.01, 98.61, 90.51, 78.28, 69.94, 63.04, 55.57, 53.58, 52.85, 51.27, 50.96, 50.74, 50.67, 44.74, 42.94, 38.46, 17.13, 14.31

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 535 [M+K]⁺

3.3.2 Oxidace OH skupiny látky 5 na keton 6

2,4-dimethoxybenzyl (1S,4aR,4bR,7S,9aS,10S,10aR)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylene-2,13-dioxo-1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulene-10-carboxylate



Ve vyžehané baňce pod argonovou atmosférou byla rozpuštěna látka **5** (500 mg, 1.01 mmol, 1.0 ekviv) v CH₂Cl₂ (10.1 ml, 0.1 M) a směs byla následně ochlazená v ledové lázni na 0°C. Po 5 minutách míchání bylo ke směsi přidáno DMP (562 mg, 1.26 mmol, 1.25 ekviv) a následovalo další míchání při laboratorní teplotě. Po 30 minutách byla reakce ukončena a výsledná směs byla zfiltrována přes Celit[®] za sníženého tlaku. Filtrační koláč byl promyt pomocí EtOAc (3 x 20 mL). Surový produkt byl zahuštěn na RVO a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO₂, DCM:EtOAc = 10:1->6:1->2:1), která poskytla produkt **6** (345 mg, 69 %).

Bílá krystalická látka

b.t. 79.4 – 81.2 °C

$\alpha_D^{21.5} = 39.5$ (*c* = 1.1, chloroform)

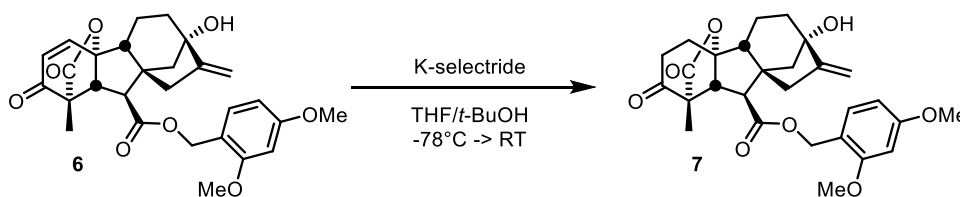
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.25 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 6.0, 2.4 Hz, 0H), 6.45 (s, 1H), 6.05 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 5.28 (dd, *J* = 3.1, 1.8 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 4.95 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.53 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 2.89 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 2.23 (dt, *J* = 15.8, 2.9 Hz, 1H), 2.20 – 2.14 (m, 1H), 2.14 – 2.08 (m, 1H), 2.07 – 1.96 (m, 2H), 1.88 – 1.81 (m, 1H), 1.76 (tt, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 2H), 1.27 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 191.96, 173.33, 171.36, 161.99, 159.35, 156.98, 147.48, 132.31, 129.43, 123.74, 107.81, 104.10, 98.73, 89.58, 78.19, 65.20, 63.43, 62.37, 55.64, 51.71, 51.58, 50.22, 45.01, 42.94, 38.26, 17.22, 11.56

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 533 [M+K]⁺

3.3.3 Redukce dvojn  vazby na A kruhu látky 6

2,4-dimethoxybenzyl (1S,4aR,4bR,7S,9aS,10S,10aR)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylene-2,13-dioxododecahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulene-10-carboxylate



V acetonov  lázni se such m ledem byl při teplotě -78 °C míchán roztok látky **6** (120 mg, 0,24 mmol, 1.0 equiv) v THF (2.5 mL) a k tomuto roztoku byl přidán K-selektid (728 μL , 3.0 ekviv, 1.0 M roztok v THF). Po 5 minutách za -78 °C byl postupn  přidáván po kapkách roztok *t*-BuOH (60 μL , 2,5 ekviv) v THF (1 mL). Takto byla reakční směs míchána 45 minut. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NH_4Cl (5 mL) při -78 °C a n sledn  byla reakční směs ohřata na laboratorní teplotu. V sledn  směs byla extrahována pomocí EtOAc (2 x 20 mL) a ziskan  organick  časti roztoku byly spojeny a promyty nasycen m roztokem NaCl (25 mL). Organick  fáze byla n sledn  vysušena pomocí MgSO_4 a zfiltrována přes vatu v nálevce. Filtrát byl odpařen na RVO a následovalo p e i t n  na chromatografick  koloně (SiO₂, hexan:EtOAc = 1:1->1:2->1:3), kter  poskytl finální produkt **7** (1.7 mg, 5 %).

 ir  olejovit  látka

$\alpha_{\text{D}}^{23} = -12.1$ ($c = 1.0$, chloroform)

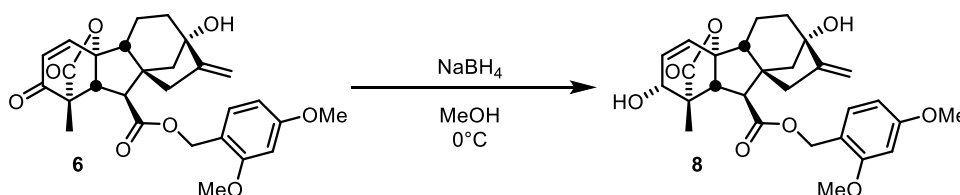
^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.21 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J = 5.4, 2.1$ Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.24 (dd, $J = 3.2, 1.7$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.93 (t, $J = 2.0, 1.3$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.09 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 2.69 – 2.54 (m, 2H), 2.48 (ddd, $J = 13.8, 7.9, 2.3$ Hz, 1H), 2.27 (dt, $J = 16.8, 2.9$ Hz, 1H), 2.17 – 2.09 (m, 2H), 2.08 – 2.03 (m, 1H), 2.03 – 1.97 (m, 1H), 1.96 – 1.86 (m, 2H), 1.78 (dtd, $J = 11.3, 7.8, 7.4, 1.7$ Hz, 1H), 1.71 (tq, $J = 11.5, 3.1, 2.1$ Hz, 2H), 1.18 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 200.45, 171.92, 166.53, 156.66, 132.29, 129.23, 121.58, 115.91, 107.48, 104.07, 98.71, 78.28, 63.37, 57.62, 55.63, 52.51, 51.49, 45.88, 42.78, 38.32, 34.88, 30.96, 17.81, 10.41.

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 497 [M+H]⁺

3.3.4 Redukce keto skupiny v látce 7 na odpovídající alkohol 8 (3-*epi*-6)

2,4-dimethoxybenzyl (1*S*,2*R*,4*aR*,4*bR*,7*S*,9*aS*,10*S*,10*aR*)-2,7-dihydroxy-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-carboxylate



Keton **6** (300 mg, 0.607 mmol, 1.0 ekviv) byl rozpuštěn v MeOH (16 mL) a výsledná směs byla následně ochlazená na 0°C. Do vychlazené směsi byl přidán NaBH₄ (93.7 mg, 2.43 mmol, 4.0 ekviv) a vše bylo mícháno při 0 °C po dobu 1 hodiny. Po ověření proběhnutí reakce pomocí TLC chromatografie byla reakční směs ohřáta na RT a ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH₄Cl (20 mL). Výsledná směs byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 30 mL) a spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (25 mL). K této směsi byl přidán MgSO₄ a vše bylo zfiltrováno přes vatu v nálevce. Tento surový produkt byl nakonec přečištěn na chromatografické koloně (SiO₂, CH₂Cl₂:EtOAc = 4:1 ->2:1) a odpovídající frakce byly spojeny následně odpařeny s použitím RVO. Vznikl finální produkt **8** (192 mg, 64 %) průhledné barvy a olejovité konzistence, která po stání začala krystalovat.

Bílá krystalická látka

b.t. 88.5 – 91.3 °C

$\alpha_D^{23} = -6.8$ (*c* = 1.0, chloroform)

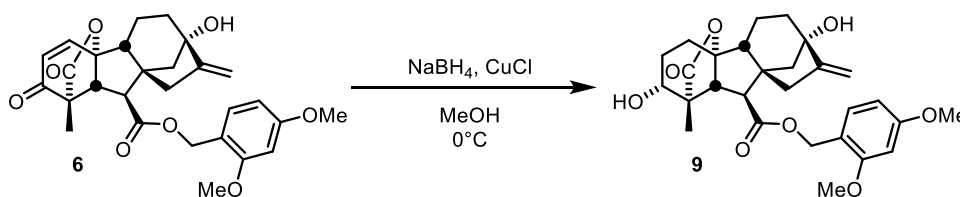
^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.24 – 7.19 (m, 1H), 6.45 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 6.21 (dd, *J* = 9.3, 1.9 Hz, 1H), 5.86 (dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz, 1H), 5.23 (ddd, *J* = 13.4, 3.2, 1.9 Hz, 1H), 5.17 – 5.05 (m, 2H), 4.91 (dt, *J* = 4.5, 2.0 Hz, 1H), 4.32 – 4.22 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.95 (s, 0H), 2.77 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 2.28 – 1.98 (m, 6H), 1.97 – 1.82 (m, 2H), 1.82 – 1.59 (m, 3H), 1.18 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 176.92, 172.19, 161.45, 158.89, 156.21, 133.20, 131.65, 129.77, 115.50, 106.63, 103.74, 98.01, 89.63, 72.80, 62.59, 57.63, 54.97, 54.88, 54.85, 51.00, 50.63, 44.14, 42.51, 38.30, 28.40, 16.71, 13.66

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 536 [M+K]⁺

3.3.5 Redukce keto skupiny a násobné vazby na A kruhu u látky 6

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



Keton **6** (300 mg, 0.607 mmol, 1.0 ekvív) byl rozpuštěn v bezvodém MeOH (15.2 mL) a následně byl přidán CuCl₂ (618 mg, 3.12 mmol, 10.3 ekvív). Tato reakční směs byla míchána 2 hodiny při teplotě 0 °C a její barva se změnila na zelenou. Poté byl do směsi pomalu přidáván NaBH₄ (468 mg, 6.07 mmol, 20.0 ekvív), došlo opět ke změně zbarvení na černou a následovalo míchání dalších 15 minut stále při teplotě 0 °C. Nakonec byla směs ponechána ohřát se na RT a míchána po dobu 18 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byla směs zfiltrována přes filtrační papír a filtrační koláč byl promyt pomocí MeOH (3 x 10 mL). K filtrátu bylo následně přidáno 40 ml 20% NaH₂PO₄ a vzniklá směs byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 40 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaCl (2 x 50 mL). Ke směsi byl přidán MgSO₄ a celá směs byla zfiltrována. Tento surový produkt byl odpařen na RVO a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO₂, DCM:EtOAc = 10:1, 4:1, 2:1, 2:1) s konečným vznikem produktu **9** (150 mg, 50%).

Nažloutlá olejovitá kapalina

$\alpha_D^{23} = +61.9$ (*c* = 1.1, chloroform)

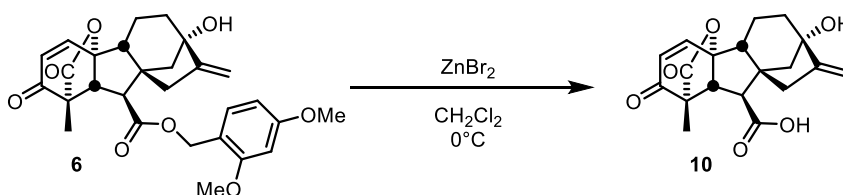
^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 8.9, 6.5 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.23 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.67 (dd, *J* = 10.5, 6.0 Hz, 1H), 2.76 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 2.56 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 2.26 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.24 – 2.17 (m, 1H), 2.17 – 2.00 (m, 2H), 1.90 (dq, *J* = 13.5, 9.4 Hz, 1H), 1.75 (dd, *J* = 10.8, 6.6 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.18 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 177.59, 172.66, 161.83, 159.27, 157.24, 132.12, 116.07, 107.23, 104.05, 98.66, 92.61, 78.38, 73.21, 63.13, 57.29, 55.62, 54.63, 52.79, 51.30, 50.91, 45.49, 42.94, 38.45, 30.22, 29.69, 17.57, 12.93

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 538 [M+K]⁺

3.3.6 Odchránění karboxylové funkční skupiny v látce **6**

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



Ester **6** (100 mg, 0.202 mmol, 1.0 ekviv) byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (0.1 M; 2,25 mL) a výsledná směs byla míchána při 0 °C po dobu 5 minut. ZnBr₂ (137 mg, 0.607 mmol, 3.0 ekviv) byl přidán a reakční směs postupně začala měnit barvu z bílé na růžovou a byla stále míchána po dobu 5 hodin za 0 °C. Poté byla reakční směs zfiltrována přes Celit[®] a vzniklý filtrační koláč byl promyt pomocí CH₂Cl₂ (3 x 20 ml), zahuštěn na RVO, a následně přečištěn na chromatografické koloně (SiO₂, CH₂Cl₂:MeOH:AcOH = 20:1:0,1->15:1:0,1->10:1:0,1), která poskytla finální produkt **10** (27,8 mg, 99 %).

Průhledná olejovitá kapalina

$\alpha_D^{21,5} = +12.7$ (*c* = 1.0, chloroform)

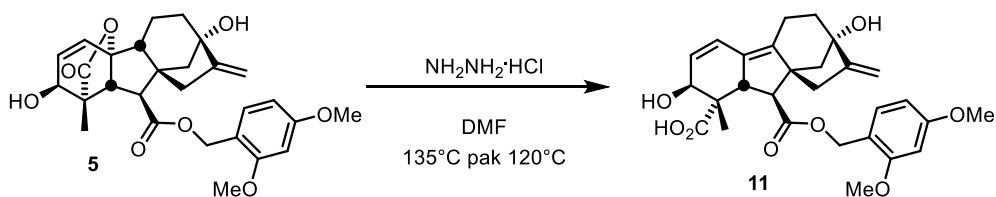
^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 6.07 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 3.49 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 2.94 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 2.42 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 2.26 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 2.12 (s, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 2H), 1.34 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 191.96, 173.33, 171.36, 156.98, 147.48, 132.31, 129.43, 89.58, 78.19, 62.37, 55.64, 51.71, 51.58, 50.22, 45.01, 42.94, 38.26, 17.22, 11.56.

MS (ESI⁻), *m/z* (%): 343 [M-H]⁻

3.3.7 Hydrazinolýza látky **5** a následná benzylace otevřeného produktu **11**

(1*S*,2*S*,7*S*,9*aR*,10*S*,10*aS*)-10-(((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)carbonyl)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10*a*-octahydro-1*H*-7,9*a*-methanobenzo[*a*]azulene-1-carboxylic acid

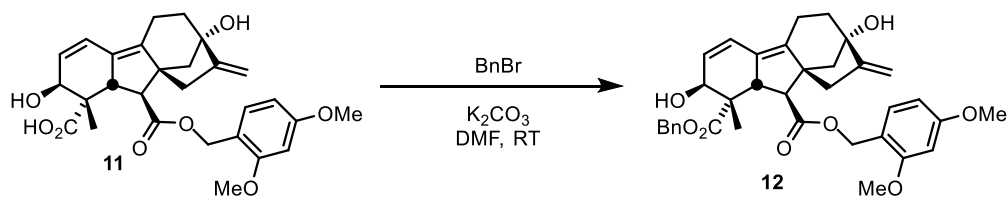


Ester **5** (2 g, 4.03 mmol, 1.0 ekviv) a $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ (3.7 g, 52.4 mmol, 13.0 ekviv) byly rozpuštěny v DMF (20 mL, 0.1 M) a směs byla míchána při teplotě 135 °C. V okamžiku, kdy se reakční směs stala homogenní, byla přesunuta reakční směs do jiné lázně vyhřáté na 120 °C, a míchána po dobu 2 hodin. Poté byla ochlazena na laboratorní teplotu, ochlazena na 0 °C a pak byla přidána H_2O (30 mL). Následně bylo upraveno pH směsi pomocí pomalého přikapávání 6 M HCl na hodnotu pH = 3. Následovala extrakce směsi pomocí EtOAc (3 x 30 mL). Spojené organické frakce byly promyty 1 M HCl (2 x 30 mL), solankou (25 mL), sušeny nad MgSO_4 , zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Odparek byl následně rozsuspendován v EtOAc (15 mL), a promyt pomocí směsí aq. nas. $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (2 x 10 ml, 1:1 (V/V)) a organická rozpouštědla byla odpařena na RVO. Následovala extrakce vodné složky pomocí EtOAc (3 x 15 mL), pH této složky bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu pH 3 a následně proběhla další extrakce pomocí EtOAc (3 x 25 mL). Všechny tři organické fáze byly zahuštěny na RVO a poskytly surový produkt **11** (450 mg, 22 %), který byl následně použit v dalším kroku.

^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 7.28 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 6.36 (dd, J = 9.3, 0.9 Hz, 1H), 5.88 (dd, J = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 5.20 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 5.13 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.85 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 4.03 (dd, J = 5.8, 2.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.25 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 2.67 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.17 (dtt, J = 15.7, 13.7, 2.6 Hz, 2H), 2.05 (dt, J = 4.4, 2.2 Hz, 1H), 1.98 – 1.92 (m, 1H), 1.90 – 1.77 (m, 2H), 1.77 – 1.64 (m, 3H), 1.16 (s, 3H)

MS (ESI⁻), m/z (%): 496 [M-H]⁻

1-benzyl 10-(2,4-dimethoxybenzyl) (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate



Surový produkt **11** (450 mg, 0.906 mmol, 1.0 ekvív) byl rozmíchán v DMF (9 mL, 0.1 M) a po rozpuštění výchozí látky byl přidán K_2CO_3 (188 mg, 1.36 mmol, 1.5 ekvív). Po 5 minutách byl přidán pomalu BnBr (0.13 mL, 1.09 mmol, 1.2 ekvív). Následně se nechala reakční směs míchat po dobu 20 hodin. Reakční směs byla rozředěna demi- H_2O (20 mL) a vzniklá směs byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 20 mL). Spojené organické frakce byly promyty vodou (10 mL), solankou (10 mL), sušeny nad $MgSO_4$, zfiltrovány a následně zahuštěny na RVO. Získaný produkt byl přečištěn na chromatografické koloně (SiO_2 , DCM:EtOAc = 4:1->2:1) a poskytl látku **12** jako bílou krystalickou látku (206.1 mg, 20 %).

Bílá krystalická látka

b.t. = 117 – 118.4 °C

$\alpha_D^{21.5} = +32.7$ (c = 1.08, chloroform);

1H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 7.41 – 7.26 (m, 5H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 6.47 (dd, J = 10.2, 7.7 Hz, 1H), 6.45 (s, 2H), 6.32 (dd, J = 9.3, 0.9 Hz, 1H), 5.91 (dd, J = 9.3, 3.5 Hz, 1H), 5.26 – 5.23 (m, 2H), 5.15 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 5.10 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.92 (s, 1H), 4.16 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.14 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.20 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.79 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 2.24 – 2.10 (m, 2H), 2.07 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 1.99 (dd, J = 10.7, 2.5 Hz, 1H), 1.95 – 1.86 (m, 1H), 1.85 – 1.75 (m, 1H), 1.73 – 1.69 (m, 1H), 1.24 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-D) δ 178.66, 172.31, 161.83, 159.29, 157.59, 133.23, 133.18, 132.58, 132.12, 128.87, 128.79, 128.69, 116.15, 107.42, 104.06, 98.68, 90.56, 78.39, 70.05, 63.11, 55.65, 55.63, 53.65, 52.93, 51.34, 50.80, 50.73, 44.83, 43.02, 38.50, 17.21, 14.54

MS (ESI⁺), m/z (%): 626 [M+K]⁺

3.4 Biologické testování

3.4.1 Biologické testování na nádorových a nenádorových buněčných liniích

K biologickému testování byl použit tento biologický materiál: buněčná linie prsního karcinomu MCF7 a buněčná linie sítnicového pigmentového epitelu RPE-1

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- DMEM médium: 10 % fetální sérum, L-glutamin (2 mM), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), NaHCO₃
- RPMI médium: 10 % fetální sérum, stabilizovaný glutamin, penstrep
- Trypsinizace: 2,5 % trypsin v DPBS:EGTA (1:1)
- Oplachování: roztok EGTA (EGTA, PBS, NaOH)
- Další: DMSO, PBS, Resazurin,

Toxicita derivátů připravených v laboratoři organické syntézy byly následně otestovány na nádorových buněčných liniích MCF-7 a na nenádorových buněčných liniích RPE-1. Buněčné linie MCF-7 byly kultivovány na miskách v DMEM médiu a buněčné linie RPE-1 v RPMI médiu při teplotě 37 °C v inkubátoru s atmosférou obohacenou o CO₂ a při vlhkosti 100 %. V miskách byla přítomna určitá koncentrace buněk, které byly nejdříve spočítány pod optickým mikroskopem pomocí Bürkerovy komůrky. Takto připravená média s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi byla rozpipetována do dvou 96-jamkových desek s plochým dnem a desky byly umístěny do inkubátoru s teplotou 37 °C, kde byly inkubovány po dobu 1 dne. Následovalo ovlivnění buněk připravenými deriváty, kdy byly do konkrétních jamek desek nanесeny testované látky o koncentraci 7,5 mM, obsah jamek byl rozpipetován do koncentrační řady a po triplikátech. Takto připravené desky s buňkami byly inkubovány po dobu 3 dnů. Po inkubaci byl do jamek přidán roztok Resazurinu v PBS a desky byly opět uloženy na 3 hodiny do inkubátoru. Následovalo samotné měření fluorescence na spektrofotometru, kdy množství fluorescence odráží počet živých buněk v jamce. Ze všech naměřených hodnot byla následně vypočítána hodnota IC₅₀.

3.4.2 Biologické testování na *Caenorhabditis elegans*

K biologickému testování byl použit tento biologický materiál: *C. elegans* Wildtype N2 a *Escherichia coli* OP50 (Caenorhabditis genetic center)

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- Médium pro růst nematodů (NGM): chlorid sodný (NaCl), cholesterol, fosfátový pufr pH 6.0, Pepton, Agar, ethanol (EtOH), chlorid vápenatý (CaCl₂), síran hořečnatý (MgSO₄), redestilovaná voda (ddH₂O)
- Stopové prvky: ethylendiamintetraoctan sodný (Na₂EDTA), síran železnatý heptahydrát (FeSO₄.7H₂O), síran zinečnatý heptahydrát (ZnSO₄.7H₂O), chlorid manganatý tetrahydrát (MnCl₂.4H₂O), síran měďnatý (CuSO₄), redestilovaná voda (ddH₂O)
- Fosfátový pufr (PPB): hydroxid draselný (KOH), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), redestilovaná voda (ddH₂O)
- Citrátový pufr: citronan sodný (C₆H₅Na₃O₇), hydroxid draselný (KOH), kyselina citronová (C₆H₈O₇), redestilovaná voda (ddH₂O)
- Lysogenylové (LB) médium: chlorid sodný (NaCl), kvasnicový extrakt, Trypton, redestilovaná voda (ddH₂O)
- Promývací roztok M9: chlorid sodný (NaCl), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Na₂HPO₄.12H₂O), síran hořečnatý heptahydrát (MgSO₄.7H₂O), redestilovaná voda (ddH₂O)
- Mrazící roztok: glycerol, hydroxid sodný (NaOH), chlorid sodný (NaCl), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), redestilovaná voda (ddH₂O)
- S-basal: cholesterol 5 mg/ml v ethanolu, chlorid sodný (NaCl), nesterilní fosfátový pufr, redestilovaná voda (ddH₂O)
- S-complete médium: S basal, stopové prvky, chlorid vápenatý (CaCl₂), citrátový pufr, síran hořečnatý (MgSO₄)
- Roztok na bleaching: hydroxid sodný (NaOH), chlornan sodný (NaClO), destilovaná voda (dH₂O)
- Pufr na chitinázovou assay (alkalický pufr – pH 10.6): glycin, hydroxid sodný (NaOH), destilovaná voda (dH₂O)
- Další: Savo, dimethylsulfoxid (DMSO), Ivermectin (IVR), substrát pro chitinázu (4-methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriosid, 0.8 mM, v -20°C), připravené deriváty kyseliny gibberelové (GA₃)

Dodavatelé příslušných chemikálií a materiálu: substrát chitinázy a IVC – Merck; kvasnicový extrakt, trypton, pepton a agar – VWR, ostatní – LachNer.

Použité přístroje: centrifuga Holm&Halby – Jouan BR4, minicentrifuga Labnet, flowbox aura HZ 72 T, inkubátor pro kultivaci bakterií Medline Scientific limited, chlazený inkubátor Q-Cell, lupa Bresser, mikroskop Leica, pipetor Swiftpipet pro, pipety Eppendorf a Finnpipette, multikanálová pipeta Transferpette[®] S-12, plate-reader Tecan, termoshaker Bioer, třepačka IKA[®] KS 260 basic, váhy AND ER-182A.

Všechny připravené deriváty kyseliny gibberelové byly testovány na hlístech *Caenorhabditis elegans* za účelem zjištění míry toxicity látek na tento organismus. Testování probíhalo na organismu *C. elegans* typu Wildtype N2, který byl kultivován na miskách s NGM médiem a s bakteriemi *Escherichia coli* typu OP50 při 20 °C.

Pro kultivaci *C. elegans* bylo připraveno tekuté LB médium smícháním všech potřebných látek a do něj byly inokulovány bakterie *E. coli*, přičemž takto připravené médium bylo mícháno a následně uchováno přes noc v teplotě 37 °C. Bakterie byly poté přeneseny na misky s již ztuhlým a vychladlým NGM médiem, po misce byly řádně rozetřeny a byly kultivovány znovu přes noc. Na takto připravené misky byli přidáni hlísti *C. elegans*, kteří byli kultivováni v teplotě 20 °C.

Bakteriální suspenze pro pěstování *C. elegans* v tekutém médiu byla připravena tak, že bakterie v LB médiu byly přepipetovány do 50 ml plastových zkumavek s víčkem (falkonek) a centrifugovány 15 minut při 4 100 rpm a následně byl odstraněn supernatant. Pomocí S-basal byla zkumavka několikrát opláchnuta a následně byl roztok ze zkumavky vylit a byla odstraněna přebytečná kapalina ze zkumavky. Takto připravený pelet bakterií ve předem zvážené falkonce bylo nutné zvážít, odečíst hmotnost falkonky a poté rozpustit v příslušném množství S complete za vzniku suspenze (60 mg bakterií/ml).

Po kultivaci *C. elegans* na NGM miskách s bakteriemi byl proveden transfer části NGM agaru s *C. elegans* na čerstvé médium s novými bakteriemi *E. coli*, které bylo následně 2 dny uchováno při teplotě 20 °C, dokud nedošlo k pozorování jedinců posledního larválního stádia označovaných L4 a jejich vajíček na NGM médiu.

Následovala synchronizace populace. Populace *C. elegans* byla přenesena do mikrozkušavky. Po centrifugaci a odstranění supernatantu byl do mikrozkušavky napipetován roztok na bleaching se Savem. Takto připravené mikrozkušavky se suspenzí byly umístěny do termoshakeru za pokojové teploty při 1500 rpm na 10 minut. Po tomto kroku by červi neměli být v roztoku vůbec vidět, protože bleaching roztok se Savem a třepání způsobil usmrcení dospělých jedinců *C. elegans*, zatímco v roztoku zůstala nenarušená vajíčka díky jejich odolné chitinové schránce. Následně byly zkumavky krátce

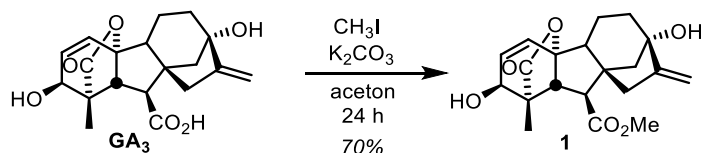
vloženy do centrifugy, supernatant byl odstraněn a k peletu byl napipetován roztok M9 (3x), následně 1x S complete. Peletka byla odebrána a přenesena do nové zkumavky s 5 ml S complete, Takto připravená vajíčka *C. elegans* byla uchována do druhého dne.

Následující den bylo možné v médiu pozorovat jedince *C. elegans* ve stádiu larvy označované L1. Tyto larvy byly následně spočítány, aby mohlo být následně připraveno 10 ml suspenze s obsahem 150 – 300 kusů *C. elegans* na 1 ml suspenze obsahující 3 mg/ml bakterií (tedy na jednu 96-jamkovou desku bylo potřeba 0,5 ml bakterií na 9,5 ml média s červy). Takto připravená směs byla následně rozpipetována do 96-jamkové desky s plochým dnem (do dvou sloupců 330 μ l a do dalších dvou 270 μ l) a do konkrétních jamek byly přidány i testované deriváty o koncentracích 5 a 50 μ M. Látky byly naředěny do koncentrační řady (ředění 10x) a obsah jamek byl rozpipetován do triplikátů (60 μ l). Použita byla také pozitivní kontrola ve formě látky Ivermectin (1 μ M) a negativní kontrola byl dimethylsulfoxid (DMSO), v němž byly rozpuštěny testované látky. Pozitivní i negativní kontrola byly přidány do jamek ve stejném objemu jako testované látky. Takto připravená deska byla inkubována na třepačce po dobu 4 dnů. Po této době byla deska „oskórována“, bylo tedy odhadnuto kolik živých či mrtvých jedinců se nachází v každé jamce. Po „oskórování“ byl do všech jamek přidán substrát pro chitinázu (4-methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriosid, 0,8 mM; 1,5 μ l) a deska byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byl do jamek přidán pufr pro chitinázovou assay (30 μ l) a následovalo samotné měření signálu živých hlístů na přístroji Tecan. Celý tento experiment byl zopakován 3x.

4 Výsledky

4.1 Příprava methylesteru kyseliny giberelové

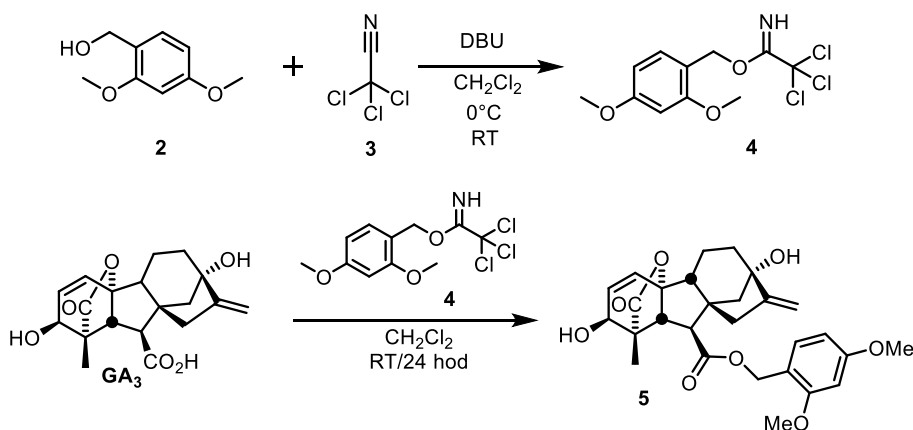
Na základě již známého a optimalizovaného postupu¹⁵ byl připraven z kyseliny giberelové GA₃ methylester kyseliny giberelové (MEGA₃), látka **1**. Reakce probíhala se 70 % výtěžkem.



4.2 Chránění karboxylové skupiny GA₃ – příprava výchozího intermediátu

K dalším experimentům bylo potřeba připravit i další derivát od GA₃ s jinou chránicí skupinou na C7 karboxylátu. Pro tento účel byla vybrána DMB chránicí skupina vyvinutá Mgr. L. Maděrkovou.* Dosažené výsledky jsou shrnuty v Tabulka 1.

Tabulka 1. Příprava DMB esteru **5**



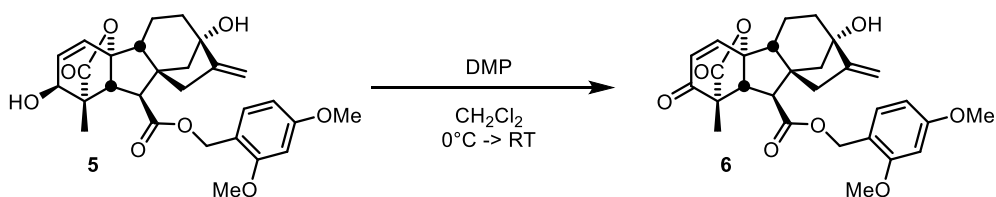
Reakce	Navážka GA ₃ (g)	Izolovaný výtěžek (%)	Doba reakce (hod)
1	10 g	69 %	48
2	14 g	63 %	24

* Nepublikované výsledky

4.3 Příprava ketonu 6 z esteru 5

Reakční podmínky byly převzaty z bakalářské práce Bc. Markéty Fuksové.¹⁵

Tabulka 2. Oxidace C3 alkoholu v 5 na odpovídající keton



Reakce	Navážka esteru 5 (g)	Izolovaný výtěžek (%)	Doba reakce (min)
1.	0,5	70	30
2.	1	60	120

4.4 Příprava dalších derivátů z intermediátu 6

V následujících částech byla využívána látka 6 s ketoskupinou na C3 jako výchozí látka pro vznik nových derivátů giberelinu A₃. Postupně jsem zkoušela následující reakce: redukce C3 ketonu v 6 na alkohol (vznik látky 8 v 64% výtěžku), redukce a,b-nenasyceného olefinu v 6 (vznik ketonu 7 v 5% výtěžku – reakce neoptimalizována), a redukce ketonu a zároveň olefinu v látce 6 (vznik látky 9 v 50% výtěžku)(Schéma 3).

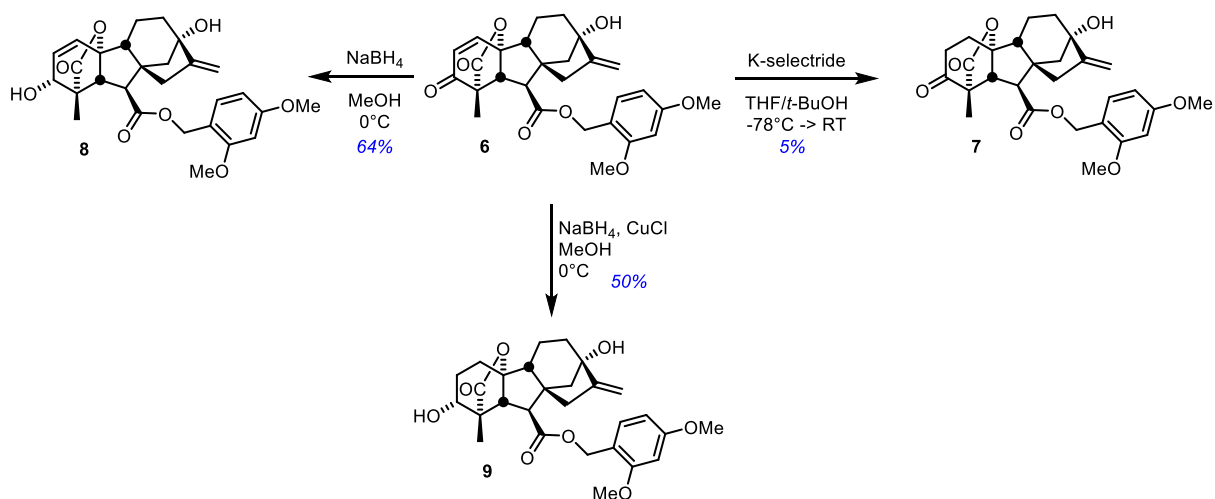


Schéma 3. Modifikace výchozího ketonu 6 a vzniklé produkty.

4.5 Odstranění chránicí skupiny DMB z připravených látek

Následně jsme se zaměřili na přípravu volných karboxylových kyselin od námi připravených derivátů giberelinů (Schéma 4). V kontextu práce jsem vyzkoušela postup, který jsme pro tento typ chránicí skupiny vyvinuli v laboratoři, a který je založen na využití ZnBr_2 .[†] Aplikované reakční podmínky vedly k produktu pouze v případě látky **6**, kdy cílový produkt **10** byl izolován ve 46% výtěžku (). U dalších derivátů vždy docházelo k degradaci. Odchránění látky **7** nebylo testováno z důvodu malého množství výchozí látky **7**.

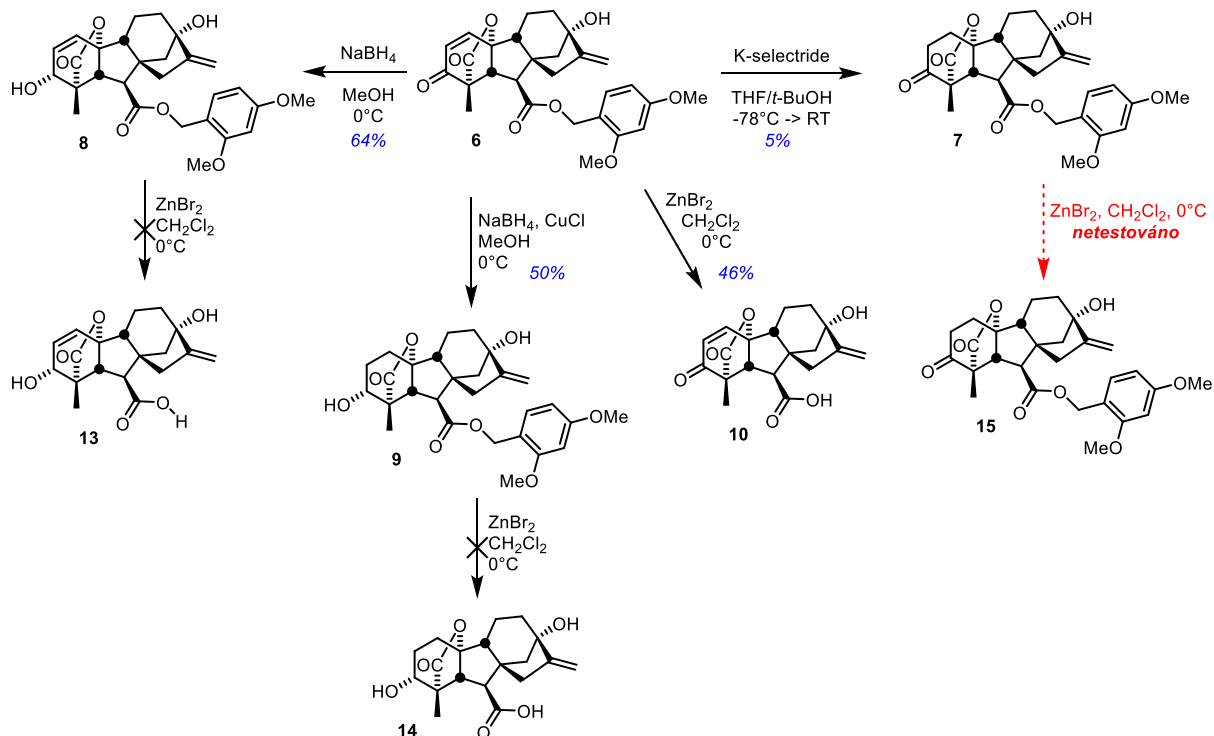
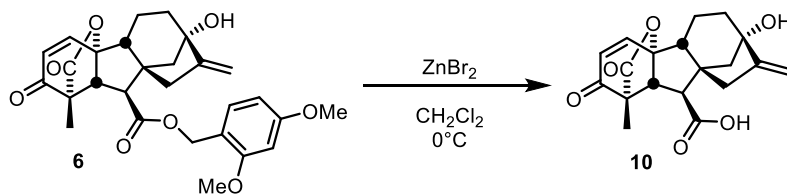


Schéma 4. Přehledné schéma reakcí z derivátů giberelinu **6** a pokus o převedení těchto produktů na volné kyseliny.

Tabulka 3. Odchránění DBM skupiny u esteru **6**.



Pokus	Navážka esteru 6 (mg)	Izolovaný výtěžek látky 10 (%)	Doba reakce (hod)
1	60 mg	9	2
2	100 mg	46	5

[†] Nepublikované výsledky.

4.6 Tvorba dvojitého nenasyceného systému u giberelinů a ochránění nově vzniklého C19 karboxylu pomocí benzyl bromidu

Dále jsme se rozhodli připravit i deriváty GA₃ s delší nenasycenou částí na kruzích A a B. K tomuto jsem se rozhodla modifikovat protokol využívaný Bc. Fuksovou pro methyl ester GA₃ (MEGA₃). Vzniklý produkt byl následně ochráněn ve formě benzyl esteru () a cílový produkt **12** byl izolován ve 46% výtěžku (přes dva kroky). Reakce nebyla dále optimalizována.

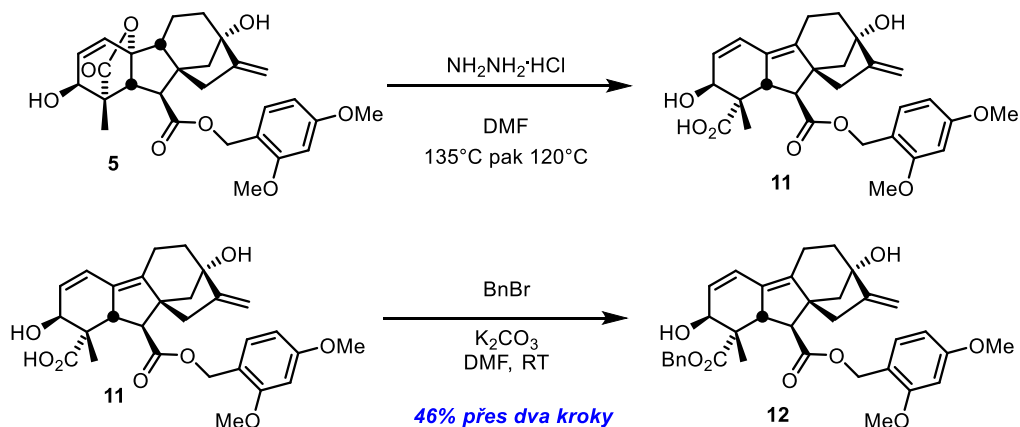


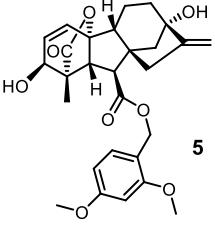
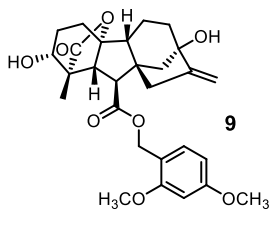
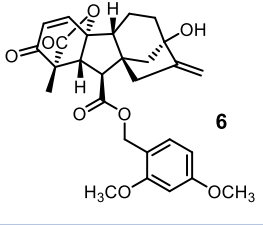
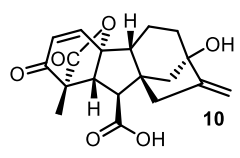
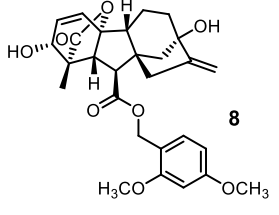
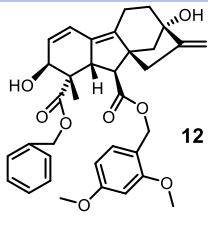
Schéma 5. Tvorba prodlouženého nenasyceného systému v rámci derivátů giberelinů a následná benzylace takto upraveného systému.

4.7 Biologické testování látek

4.7.1 Biologické testování na nádorových a nenádorových buněčných liniích

Všechny připravené látky byly testovány v různých koncentracích na nádorových buněčných liniích MCF-7 a nenádorových buněčných liniích RPE-1, kdy inkubace buněk s látkami probíhala 72 hodin při teplotě 37 °C (Tabulka 4).

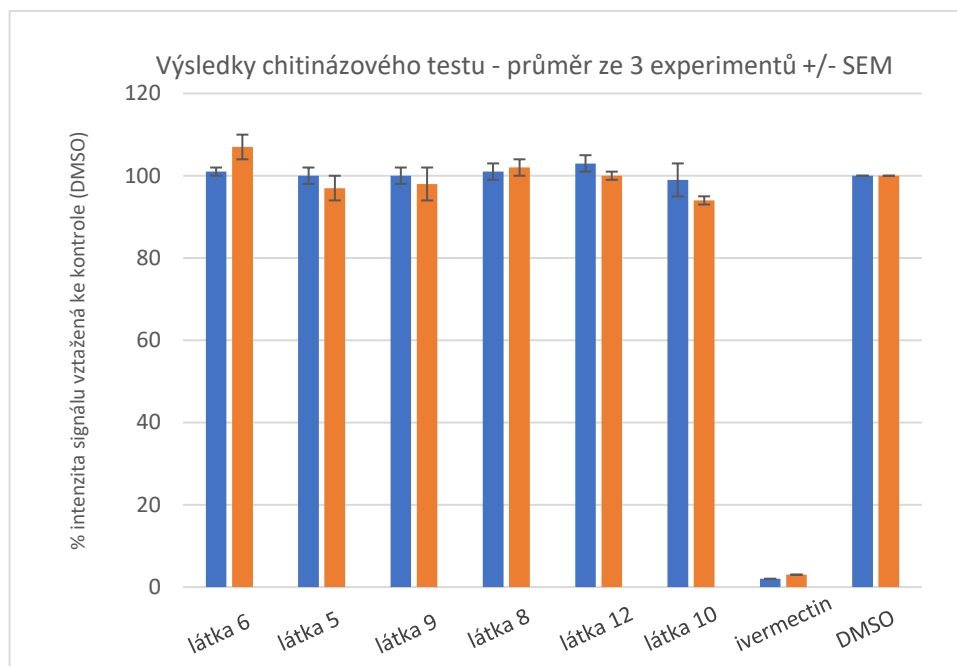
Tabulka 4. Výsledky cytotoxicity látek testovaných na buněčných liniích MCF-7 a RPE-1 (látky označené znaménkem mínus (-) budou ještě dotestovány)

Látka	IC ₅₀ (μM) MCF-7	IC ₅₀ (μM) RPE-1	Látka	IC ₅₀ (μM) MCF-7	IC ₅₀ (μM) RPE-1
	3,8±0,8	21,9±0,6		-	-
	>50	>50		-	-
	>50	>50		-	-

4.7.2 Biologické testování na *C. elegans*

Toxicita všech připravených derivátů byla také testována na hlístech *C. elegans*, kde byly látky nanášeny do jamek ve dvou koncentracích, které činily 5 μM a 50 μM. Tyto látky pak byly srovnávány s pozitivní kontrolou Ivermectinem, který způsobuje smrt hlístů, a negativní kontrolou DMSO, jenž na hlísty nijak nepůsobí. Graf (Graf 1) zobrazuje výsledky chitinázového testu prováděného u *C. elegans*. Hodnoty v grafu byly získány vypočítáním průměru ze všech třech triplikátů desky a z průměru pak procento intenzity signálu vztažené k DMSO. Následně byl vypočítán průměr intenzit signálu (v %), kde byly tyto průměry získány třemi biologickými opakováními experimentu. Ze stejných hodnot byla také vypočítána střední chyba průměru (SEM). U všech testovaných látek nebyla prokázána

žádná toxicita, která by jakýmkoli způsobem narušovala vývoj, život či rozmnožování jednotlivých jedinců *C. elegans*. Z grafu (Graf 1) lze vyčíst, že čím víc se hodnota průměru blíží k hodnotě 100 %, tím méně je látka toxická. Ve všech jamkách s hlísty otrávenými danými látkami byli přítomni hlísti synchronizované populace (dospělci) a jejich potomci, tedy vajíčka a larvy prvního larválního stádia L1 (Obrázek 7), tudíž nebyla narušena schopnost vývoje ani reprodukce tohoto organismu.



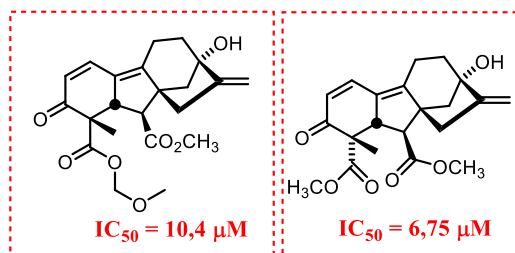
Graf 1 – Výsledky chitinázového testu derivátů GA_3 , pozitivní kontrola Ivermectin (IVR, 1%), negativní kontrola dimethylsulfoxid (DMSO, 0.1%), SEM – střední chyba průměru. Modrá barva představuje výsledky pro látky o koncentraci 50 μM , oranžová pro 5 μM



Obrázek 7. Kontrolní jamka s *C. elegans* (přítomni jedinci larválního stádia L1 a také dospělci *C. elegans*), měřítko 100 μm

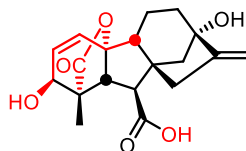
5 Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit a ohodnotit biologickou aktivitu nových syntetických derivátů giberelinu A₃. Z předcházející práce Bc. Markéty Fuksové¹⁵ bylo známo, že některé deriváty odvozené od GA₃ (Obrázek 8) vykazují protinádorovou aktivitu. Naším předpokladem bylo, že tato aktivita je způsobena a,b-nenasyceným ketonem v kruhu A.^{37,38}



Obrázek 8. Látky připravené Bc. M. Fuksovou s cytotoxickou aktivitou

Celá syntéza nových derivátů vycházela z komerčně dostupného giberelinu A₃, jenž nám sloužil jako výchozí platforma pro přípravu následujících derivátů. Nejprve jsem se zaměřila na přípravu esteru od GA₃. V tomto kontextu jsem nejprve připravila methyl ester od GA₃, látku **1**. Reakce probíhala dobře, přesně podle literatury a zkušeností ve skupině, ale kvůli potencionálním problémům spojeným s finální demethylací (volné kyseliny byly v plánu také testovat), které se v poslední době objevovaly ve skupině (giberelinový skelet je totiž značně náchylný k přesmykům v přítomnosti silnějších kyselin, a k fragmentaci v přítomnosti silnějších bází), jsme se rozhodli využít nedávno vyvinutou chránicí skupinu označovanou zkratkou DMB (pro 2,4-**dimethoxybenzyl**). Následně jsem pak začala tomuto derivátu modifikovat kruh A a částečně i B z pohledu oxidace/redukce jednotlivých atomů. Výsledné produkty pak byly ohodnoceny z pohledu jejich biologické aktivity.



Obrázek 9. Místa na giberelinu A₃, u nichž jsme chtěli zavést modifikace

5.1 Syntéza derivátů odvozených ze skeletu GA₃

Všechny připravené deriváty, jak už bylo zmíněno výše, vycházejí ze struktury komerčně dostupného a bioaktivního giberelinu A₃ (GA₃). Jak již bylo zmíněno, původním záměrem mé práce bylo provést veškeré modifikace na methyl esteru GA₃, látce **1**. V průběhu syntézy jsme ale na základě paralelních negativních zkušeností s touto (methylová) chránicí

skupinou v naší výzkumné skupině „přesedlali“ na DMB-chráněný ester GA₃, látku **5** (Schéma 6).

Naším cílem bylo (a) prodloužit nenasycený systém na dvě dvojné vazby (látko **12**) a (b) ohodnotit jakým způsobem se bude měnit biologická aktivita, pakliže u derivátů látky **5** budeme postupně přidávat, resp. ubírat, jednotlivé násobné vazby ať již z pohledu C=C anebo C=O.

Začali jsme tedy nejprve látkou **12** (prodloužení nenasyceného systému). V tomto případě jsme provedli pomocí hydrazinolýzy otevření laktonového kruhu u látky **5** dle protokolu vyvinutého a optimalizovaného Bc. M. Fuksovou.¹⁵ V mém případě to fungovalo celkem dobře a přesně podle protokolu. Ten byl sice vyvinut pro trochu jiný substrát, ale zdá se, že na tomto funguje také dobře. Co je zajímavé a chtěla bych vyzdvihnout je, že za těchto podmínek nedochází k hydrolýze výchozí látky **5** – tedy že nedochází k odchránění výchozího esteru na karboxylovou kyselinu. Následná benzylace pak probíhala standartně. Bohužel z časových důvodů spojených s COVID-19 restrikcemi se mi nepovedlo provést oxidaci C3 alkoholu v dienu **12** na produkt **16**. Takto vzniklá látka by byla opravdu velice konjugovaná a možná že i značně aktivní, když ji porovnáme s látkami Bc. Fuksové (viz Obrázek 8).

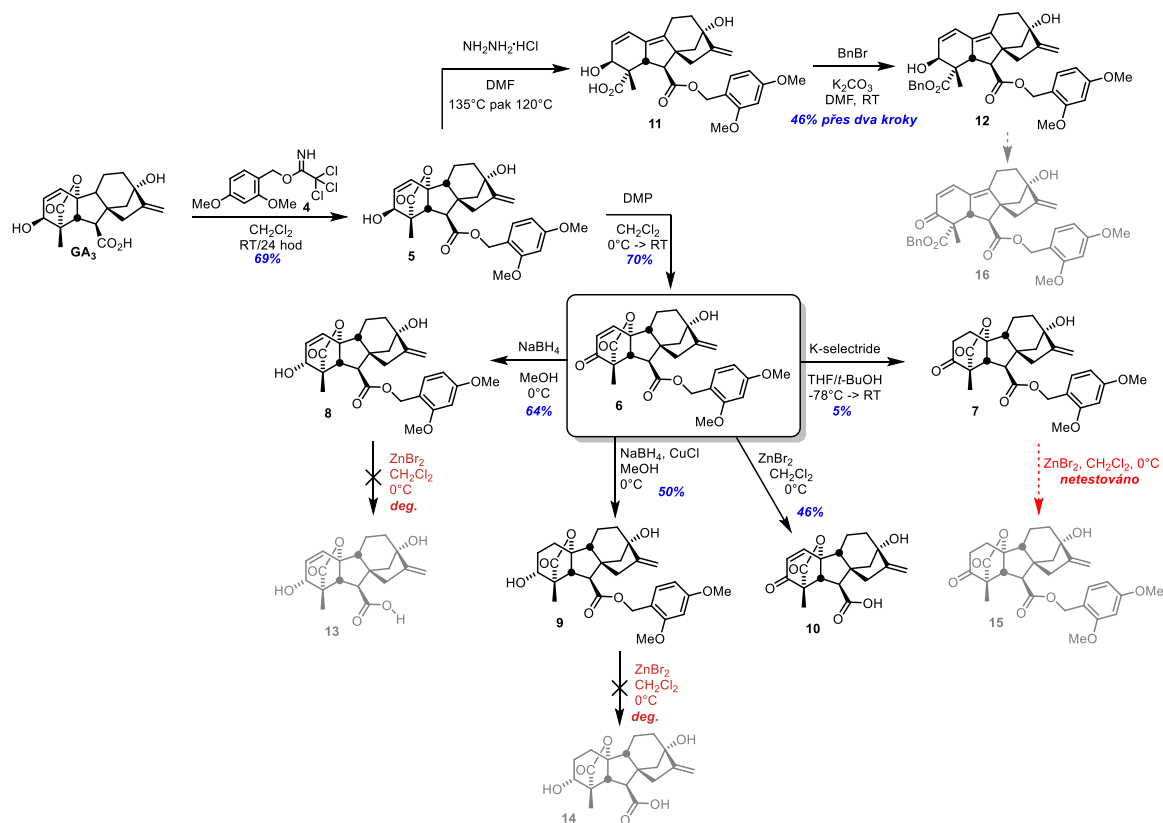


Schéma 6. Celkový přehled jednotlivých modifikací na giberelinu A₃. Šedou barvou jsou vyvedeny plánované ale nezískané produkty.

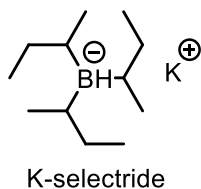
U druhého přístupu (b) jsem se zaměřila na modifikace oxidačního stavu (hybridizace) na uhlících C3, C2 a C1. Nejprve jsem tedy zoxidovala C3 alkohol na odpovídající keton (látko **6**) pomocí Dess-Martinova reagentu. Toto oxidační činidlo bylo vybráno záměrně, protože (a) provádí oxidace alkoholů na aldehydy/ketony za velmi mírných podmínek a v kontrolovaném pH (buďto jemně kyselé (AcOH) anebo pufované podmínky (AcOH/AcONa nebo AcOK). V mém případě reakce v jemně kyselém prostředí (při reakci se uvolňuje postupně kyselina octová) běžela reakce naprosto v pořádku a bez problémů.

Intermediát **6** jsem pak postupně podrobila následujícím reduktivním činidlům. Nejprve NaBH₄, aby došlo k selektivní redukci ketonu na C3. Formálně tedy získáme stejný produkt jako v případě látky **5**. Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma látkami je ale v absolutní orientaci hydroxylové skupiny na C3. Původní v GA₃ derivátu jde nad rovinu (směrem k nám), zatímco v případě nově připraveného derivátu **8** jde hydroxylová skupina směrem od nás (k laktonovému kruhu). Tento rozdíl je zejména důležitý z pohledu následných interakcí s receptory na testovaných biologických systémech. Výsledná stereochemie je zohledněna a

řízena sterickými nároky skupin v látce **6**. Redukční činidlo tak přistupuje ze druhé strany, než je lakton (méně stericky bráněná strana).

Pakliže ale provádíme redukci pomocí NaBH₄ (přebytek) v přítomnosti CuCl (Cu(I) sůl), tak dochází *in situ* ke tvorbě směsi nezreagovaného NaBH₄ a [Cu-H] – hydridu mědi. Generovaný kuprát tedy bude reagovat s C=C vazbou tak, že ji zredukuje na C-C (1,4-adice hydridu) a nezreagovaný NaBH₄ pak bude redukovat keton na alkohol. Vznikne tedy znovu pouze jeden diastereoizomer, neboť adice NaBH₄ je stereoselektivní a je řízena stericky obdobně jako adice na keton v předcházejícím případě.

Nakonec jsem se rozhodla redukovat selektivně olefin v přítomnosti ketonu. Z literatury je známé, že některé typy hydridů jako například K-selektid⁶² (Obrázek 10). Tento stericky bráněný hydrid pak reaguje při redukci via 1,4-adiční mechanismus ze sterických důvodů. Bohužel adice je posunuta směrem k výchozí látce, takže abychom získali nějaký produkt, tak musíme přímo do reakční směsi přidat zdroj protonů tak, abychom vychytali produkt adice (ale zároveň nezlikvidovali redukční činidlo). V tomto případě jsem to řešila přidávkem *t*-butanolu. Ukázalo se však, že v případě těchto reakčních podmínek je cílový produkt **7** izolován pouze v 5% výtěžku. Toto bylo způsobeno neutralizací K-selectridu před tím, než se stačil naadovat (příliš nízká teplota, reakce nebyla optimalizována). Avšak získané množství látky nám bohatě dostačovalo k provedení charakterizace, a hlavně k jejímu biologickému ohodnocení, takže jsem se k optimalizaci pak už nedostala.

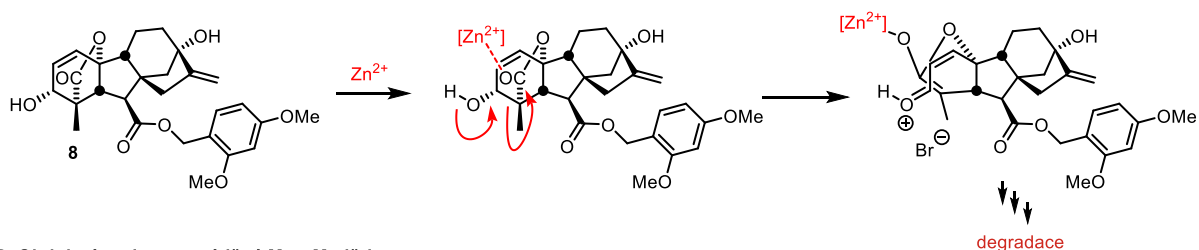


Obrázek 10. Struktura K-selektridu®

Nakonec jsem chtěla ze všech připravených derivátů GA₃ připravit jejich volné karboxylové kyseliny. Použila jsem tedy standartní protokol vyvinutý v naší skupině (ZnBr₂) na látky **6**, **8** a **9** a doufala k rychlému odstranění DMB skupiny. Bohužel, toto se povedlo pouze v případě látky **6**. U zbývajících dvou, látky **8** a **9**, došlo při reakci k degradaci. Z hlediska struktury, jediným rozdílem mezi látkou **6** a látkami **8** a **9**, a zároveň shodným znakem u látek **8** a **9**, je přítomnost/absence hydroxylové skupiny. Na tomto předpokladu (a v souladu s dalšími experimenty provedenými v rámci skupiny) jsme založili hypotézu, co se asi tak stalo. Předpokládáme, že ZnBr₂ pravděpodobně reaguje jako Lewisova kyselina a aktivuje C3 hydroxylovou skupinu k retro-aldolové reakci (Schéma 7A). Takto tvořený

produkt následně pravděpodobně podléhá další kaskádě reakcí iniciovaných bromidovým aniontem. Na konci této kaskády je pak celková degradace substrátu (surová reakční směs po těchto reakcích doslova vylučovala jakoukoliv charakterizaci jednotlivých možných produktů degradace). Jedním z nepřímých důkazů podporujících tuto teorii jsou například reakce, které provedla Mgr. Maděrková, která ukázala, že pokud reagujeme diol **17** s ZnBr_2 , dochází k degradaci. Naopak, diacetát **19** podléhá deprotekcí DMB velice rychle a bez vedlejších produktů (Schéma 7B).

A. Navržený mechanismus retroaldolové reakce



B. Obdobné reakce prováděné Mgr. Maděrkovou

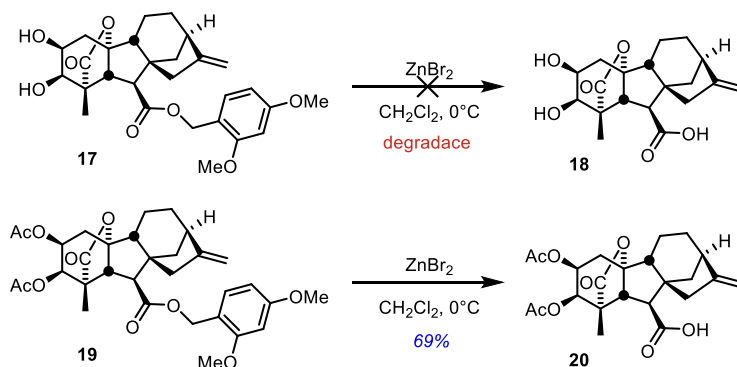


Schéma 7. (A) Navržený mechanismus (iniciace) degradace látky **8**. (B) Nepřímý důkaz podporující naši teorii o roli C3 hydroxylové skupiny při degradaci výchozí látky při DMB deprotekcí.

5.2 Biologické testování

5.2.1 Biologické testování na nádorových a nenádorových buněčných liniích

V rámci této bakalářské práce byly výsledky biologického testování látek na nádorových buněčných liniích karcinomu prsu MCF-7 a nenádorových buněčných liniích RPE-1 očekávaným aspektem, jelikož bylo cílem připravit takové deriváty, které budou vykazovat nějakou biologickou aktivitu. Cytotoxická aktivita se projevila pouze u látky **5**, u které byla naměřena inhibiční koncentrace IC_{50} $3,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$ pro MCF-7 a $21,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ pro RPE-1. Tato látka je hlavním intermediátem celé syntézy derivátů a vyznačuje se přítomností chránící skupiny DMB připojené na karboxyl GA_3 . Důležitým záměrem syntézy bylo připravit látky obsahující ketoskupiny na C3 A-kruhu, která má mít za následek biologickou aktivitu výsledné látky,¹⁵ avšak tato teorie nebyla u testovaných látek s ketoskupinou potvrzena.

5.2.2 Biologické testování na *C. elegans*

Biologické testování všech připravených derivátů bylo provedeno i na organismech *C. elegans*. Populace těchto hlístů byla synchronizována tak, aby byly látky přidávány k populaci larev nazývané L1, tedy k populaci čerstvě vylíhnutých jedinců. Po přidání testovaných látek k tomuto vývojovému stádiu *C. elegans* bylo zjištěno, že ani jedna z látek nepůsobí na hlísty toxicky a ve všech jamkách byli přítomni jedinci prvního larválního stádia L1 a dospělci *C. elegans*. Proto je možné konstatovat, že tyto látky vůbec nenarušují vývoj *C. elegans*, nedochází ani k ovlivnění rozmnožování. Tyto předběžné výsledky ukazují, že látky by při aplikaci na půdu, nemusely mít toxický efekt jak na *C. elegans*, tak i na jiné půdní organismy. Z ohledu nematocidního efektu lze říci, že testované látky nevykazovaly žádné slibné výsledky, a proto v tomto kontextu nebyly dále zkoumány.

6 Závěr

Předložená bakalářská práce se zabývá syntézou a biologickým ohodnocením vybraných derivátů odvozených od giberelinu A₃. V rámci této práce jsem připravila celkem 9 těchto derivátů z toho 7 zcela nových nepopsaných. Syntéza těchto derivátů nebyla náhodná ve stylu „připrav něco a otestuj to“, ale naopak jsme se zaměřili na velice úzký typ látek, které měly nést/nesly olefinické vazby v rámci kruhu A a B. Tento olefin (olefiny) pak mohly být konjugované s ketonovou funkční skupinou, která by z této olefinické části dělala velice silný Michaelův akceptor. Tento typ funkční skupiny pak obvykle reaguje s Michaelovými akceptory ve vazebných místech (např. cystein via SH funkční skupinu). V našem případě jsme se na tento typ fragmentu zaměřili zejména z důvodu jeho podobnosti s některými literárními příklady přírodních látek *ent*-kaurenového typu, které mají slibné protinádorové účinky. V obdobném duchu mluvily i předběžné výsledky získané v rámci bakalářské práce Bc. Markéty Fuksové.

Mnou připravené látky vykazaly v jednom případě, látka **5**, cytotoxickou aktivitu vůči buněčným liniím MCF-7 a RPE-1. Ostatní deriváty neprojevily žádnou biologickou aktivitu. Bohužel některé zamýšlené deriváty GA₃ (jde zejména o volné karboxylové kyseliny) nebyly připraveny, protože zvolená metoda jejich přípravy se ukázala jako nevhodná. Zde se bude muset vyvinout jiná metoda, jež by umožnila jejich přípravu. V případě testování na *C. elegans* žádná z látek neprojevila vůči tomuto hlístovi toxicitu, a proto tyto deriváty nepředstavují žádné riziko v případě použití na tento organismus.

Použitá literatura

- (1) Davies, P. J. *Plant Hormones*, 3rd ed.; Davies, P. J., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>.
- (2) Boivin, S.; Fonouni-Farde, C.; Frugier, F. How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01240>.
- (3) Kramer, E. M.; Rutschow, H. L.; Mabie, S. S. AuxV: A Database of Auxin Transport Velocities. *Trends Plant Sci.* **2011**, *16* (9), 461–463. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.003>.
- (4) Bajguz, A.; Chmur, M.; Gruszka, D. Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1034. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01034>.
- (5) BRIAN, P. W. Effects of Gibberellins on Plant Growth and Development. *Biol. Rev.* **1959**, *34* (1), 37–77. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1959.tb01301.x>.
- (6) Hedden, P. Gibberellins. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*; Elsevier, 2017; pp 411–420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00219-7>.
- (7) Bouwmeester, H. J.; Fonne-Pfister, R.; Screpanti, C.; Mesmaeker, A. De. Strigolactones: Plant Hormones with Promising Features. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58* (37), 12778–12786. <https://doi.org/10.1002/anie.201901626>.
- (8) Kleczkowski, K.; Schell, J.; Bandur, R. Phytohormone Conjugates: Nature and Function. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **1995**, *14* (4), 283–298. <https://doi.org/10.1080/07352689509382361>.
- (9) Regnault, T.; Davière, J.-M.; Wild, M.; Sakvarelidze-Achard, L.; Heintz, D.; Carrera Bergua, E.; Lopez Diaz, I.; Gong, F.; Hedden, P.; Achard, P. The Gibberellin Precursor GA12 Acts as a Long-Distance Growth Signal in Arabidopsis. *Nat. Plants* **2015**, *1* (6), 1–6. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.73>.
- (10) Miransari, M.; Smith, D. L. Plant Hormones and Seed Germination. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *99*, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>.
- (11) Hedden, P. *Annual Plant Reviews, Volume 49*; Hedden, P., Thomas, S. G., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119210436>.

- (12) 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>.
- (13) Hedden, P. Gibberellins Close the Lid. *Nature* **2008**, *456* (27), 455–456. <https://doi.org/10.1038/456455a>.
- (14) Hedden, P.; Thomas, S. G. Gibberellin Biosynthesis and Its Regulation. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), 11–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20120245>.
- (15) Fuksová, M. Příprava Klíčového Intermediátu Vhodného k Identifikaci Struktury Nově Izolovaných Gibberelinů, Palacky University, 2019.
- (16) Gao, X.; Zhang, Y.; He, Z.; Fu, X. Gibberellins. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*; Elsevier Inc., 2017; pp 107–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00004-9>.
- (17) Srivastava, L. M. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*; Elsevier Science, 2002.
- (18) 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>.
- (19) Sponsel, V. M. Signal Achievements in Gibberellin Research: The Second Half-Century. In *Annual Plant Reviews, Volume 49*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, UK, 2016; Vol. 49, pp 1–36. <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch1>.
- (20) 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>.
- (21) Agrios, G. N. How Pathogens Attack Plants. In *Plant Pathology*; AGRIOS, G. N. B. T.-P. P. (Fifth E., Ed.; Elsevier: San Diego, 2005; pp 175–205. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50011-7>.
- (22) AGRIOS, G. N. How Plants Defend Themselves Against Pathogens. In *Plant Pathology*; AGRIOS, G. N. B. T.-P. P. (Fifth E., Ed.; Elsevier: San Diego, 2005; pp 207–248. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50012-9>.
- (23) AGRIOS, G. N. Genetics of Plant Disease. In *Plant Pathology*; AGRIOS, G. N. B. T.-P. P. (Fifth E., Ed.; Elsevier: San Diego, 2005; pp 124–174. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50010-5>.
- (24) AGRIOS, G. N. Environmental Effects on the Development of Infectious Plant

- Disease. In *Plant Pathology*; AGRIOS, G. N. B. T.-P. P. (Fifth E., Ed.; Elsevier: San Diego, 2005; pp 249–263. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50013-0>.
- (25) Binenbaum, J.; Weinstain, R.; Shani, E. Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23* (5), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.005>.
- (26) Hedden, P. Gibberellins. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*; 2016; Vol. 1, pp 411–420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00219-7>.
- (27) Mander, L. N. Twenty Years of Gibberellin Research. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 49–69. <https://doi.org/10.1039/b007744p>.
- (28) Mander, L. N. The Chemistry of Gibberellins: An Overview. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (4), 573–612. <https://doi.org/10.1021/cr00012a005>.
- (29) Urbanová, T.; Tarkowská, D.; Novák, O.; Hedden, P.; Strnad, M. Analysis of Gibberellins as Free Acids by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2013**, *112*, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.068>.
- (30) Schneider, G.; Schliemann, W. Gibberellin Conjugates: An Overview. *Plant Growth Regul.* **1994**, *15* (3), 247–260. <https://doi.org/10.1007/BF00029898>.
- (31) Yamaguchi, S. Gibberellin Metabolism and Its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59* (1), 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>.
- (32) Jones, R. L. Gibberellins: Their Physiological Role. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1973**, *24* (1), 571–598. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.003035>.
- (33) Pallardy, S. G. Plant Hormones and Other Signaling Molecules. In *Physiology of Woody Plants*; Pallardy, S. G. B. T.-P. of W. P. (Third E., Ed.; Elsevier: San Diego, 2008; pp 367–377. <https://doi.org/10.1016/B978-012088765-1.50014-2>.
- (34) Ueguchi-Tanaka, M.; Nakajima, M.; Motoyuki, A.; Matsuoka, M. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58* (1), 183–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830>.
- (35) Ueguchi-Tanaka, M.; Nakajima, M.; Katoh, E.; Ohmiya, H.; Asano, K.; Saji, S.; Hongyu, X.; Ashikari, M.; Kitano, H.; Yamaguchi, I.; Matsuoka, M. Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin. *Plant Cell* **2007**, *19* (7), 2140–2155.

<https://doi.org/10.1105/tpc.106.043729>.

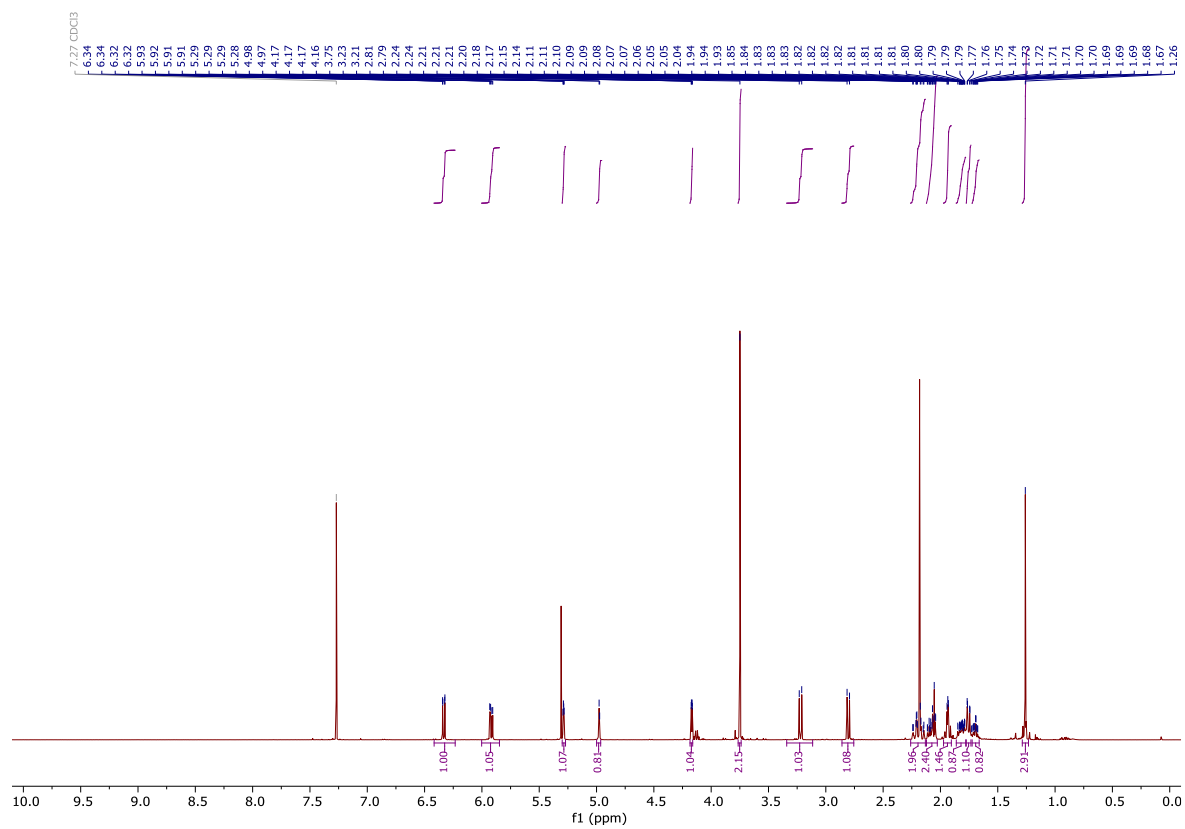
- (36) Yoshida, H.; Tanimoto, E.; Hirai, T.; Miyanoiri, Y.; Mitani, R.; Kawamura, M.; Takeda, M.; Takehara, S.; Hirano, K.; Kainosho, M.; Akagi, T.; Matsuoka, M.; Ueguchi-Tanaka, M. Evolution and Diversification of the Plant Gibberellin Receptor GID1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (33), E7844–E7853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806040115>.
- (37) Chen, J.; Sun, Z.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Qing, C.; Liu, J.; Li, L.; Zhang, H. Synthesis of Gibberellin Derivatives with Anti-Tumor Bioactivities. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (18), 5496–5499. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.090>.
- (38) Zhang, Y.; Zhang, H.; Chen, J.; Zhao, H.; Zeng, X.; Zhang, H.; Qing, C. Antitumor and Antiangiogenic Effects of GA-13315, a Gibberellin Derivative. *Invest. New Drugs* **2012**, *30* (1), 8–16. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9501-8>.
- (39) Davis, R. H.; Maro, N. P. Aloe Vera and Gibberellin. Anti-Inflammatory Activity in Diabetes. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **1989**, *79* (1), 24–26. <https://doi.org/10.7547/87507315-79-1-24>.
- (40) Hedden, P.; Proebsting, W. M. Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis1. *Plant Physiol.* **1999**, *119* (2), 365–370. <https://doi.org/10.1104/pp.119.2.365>.
- (41) Hedden, P.; Kamiya, Y. Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1997**, *48* (1), 431–460. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.431>.
- (42) Graebe, J. E. Gibberellin Biosynthesis and Control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1987**, *38* (1), 419–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.38.060187.002223>.
- (43) Sponsel, V. M.; Hedden, P. Gibberellin Biosynthesis and Inactivation. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*; Davies, P. J., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2010; pp 63–94. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_4.
- (44) Hedden, P.; Kamiya, Y. Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1997**, *48* (1), 431–460. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.431>.
- (45) Bömke, C.; Tudzynski, B. Diversity, Regulation, and Evolution of the Gibberellin Biosynthetic Pathway in Fungi Compared to Plants and Bacteria. *Phytochemistry*

- 2009**, 70 (15–16), 1876–1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.020>.
- (46) Graebe, J. E. Gibberellin Biosynthesis and Control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1987**, 38 (1), 419–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.38.060187.002223>.
- (47) Sponsel, V. M.; Hedden, P. Gibberellin Biosynthesis and Inactivation. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*; Davies, P. J., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2010; pp 63–94. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_4.
- (48) Bearder, J. R.; MacMillan, J. Chemical Conversion of C₂₀ Gibberellins into C₁₉ Gibberellins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, No. 11, 421a. <https://doi.org/10.1039/c3976000421a>.
- (49) Gupta, R.; Chakrabarty, S. K. Gibberellic Acid in Plant. *Plant Signal. Behav.* **2013**, 8 (9), e25504. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>.
- (50) Marth, P. C.; Audia, W. V.; Mitchell, J. W. Effects of Gibberellic Acid on Growth and Development of Plants of Various Genera and Species. *Bot. Gaz.* **1956**, 118 (2), 106–111. <https://doi.org/10.1086/335932>.
- (51) Rodrigues, C.; Vandenberghe, L. P. D. S.; De Oliveira, J.; Soccol, C. R. New Perspectives of Gibberellic Acid Production: A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, 32 (3), 263–273. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.615297>.
- (52) Marth, P. C.; Audia, W. V.; Mitchell, J. W. Effects of Gibberellic Acid on Growth and Development of Plants of Various Genera and Species. *Bot. Gaz.* **1956**, 118 (2), 106–111. <https://doi.org/10.1086/335932>.
- (53) 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>.
- (54) Erin, N.; Afacan, B.; Ersoy, Y.; Ercan, F.; Balçı, M. K. Gibberellic Acid, a Plant Growth Regulator, Increases Mast Cell Recruitment and Alters Substance P Levels. *Toxicology* **2008**, 254 (1–2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.020>.
- (55) El-Mofty, M. M.; Sakr, S. A.; Rizk, A. M.; Moussa, E. A. Carcinogenic Effect of Gibberellin A₃ in Swiss Albino Mice. *Nutr. Cancer* **1994**, 21 (2), 183–190. <https://doi.org/10.1080/01635589409514316>.

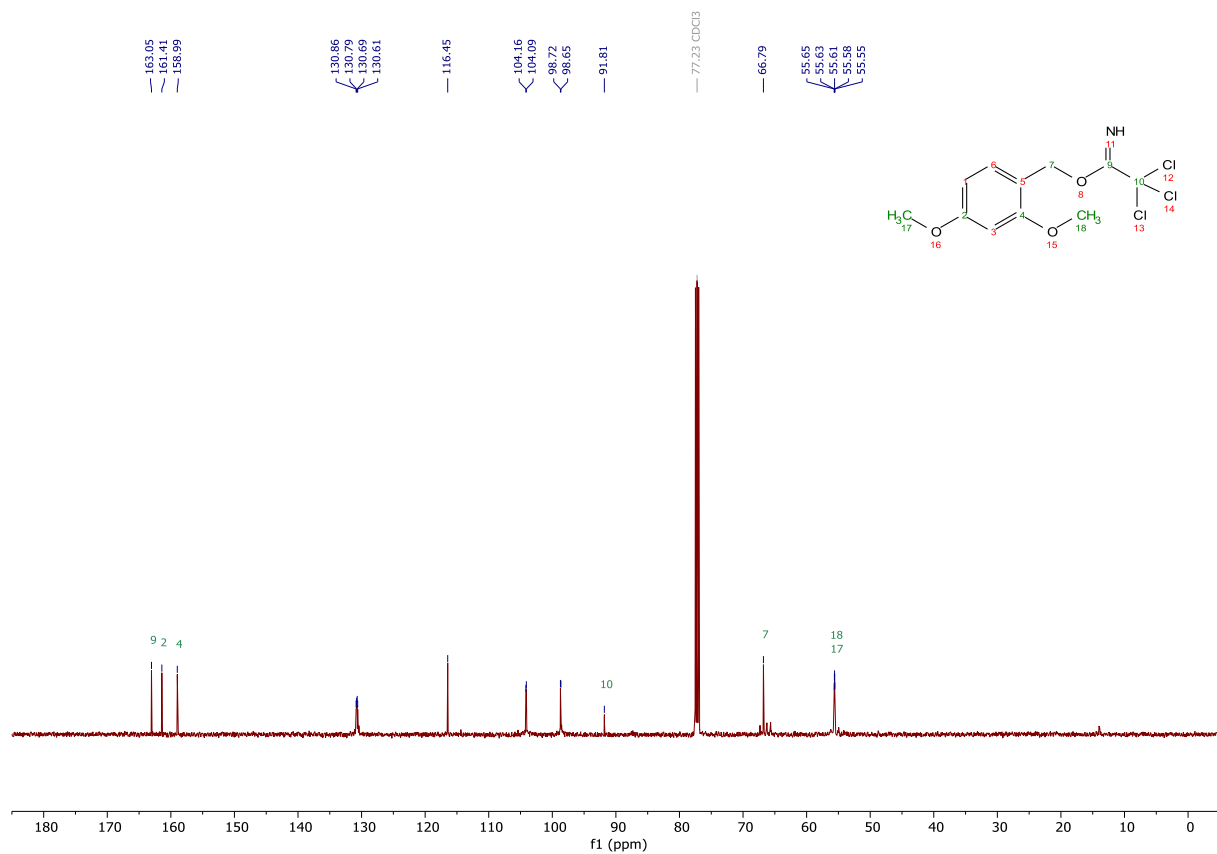
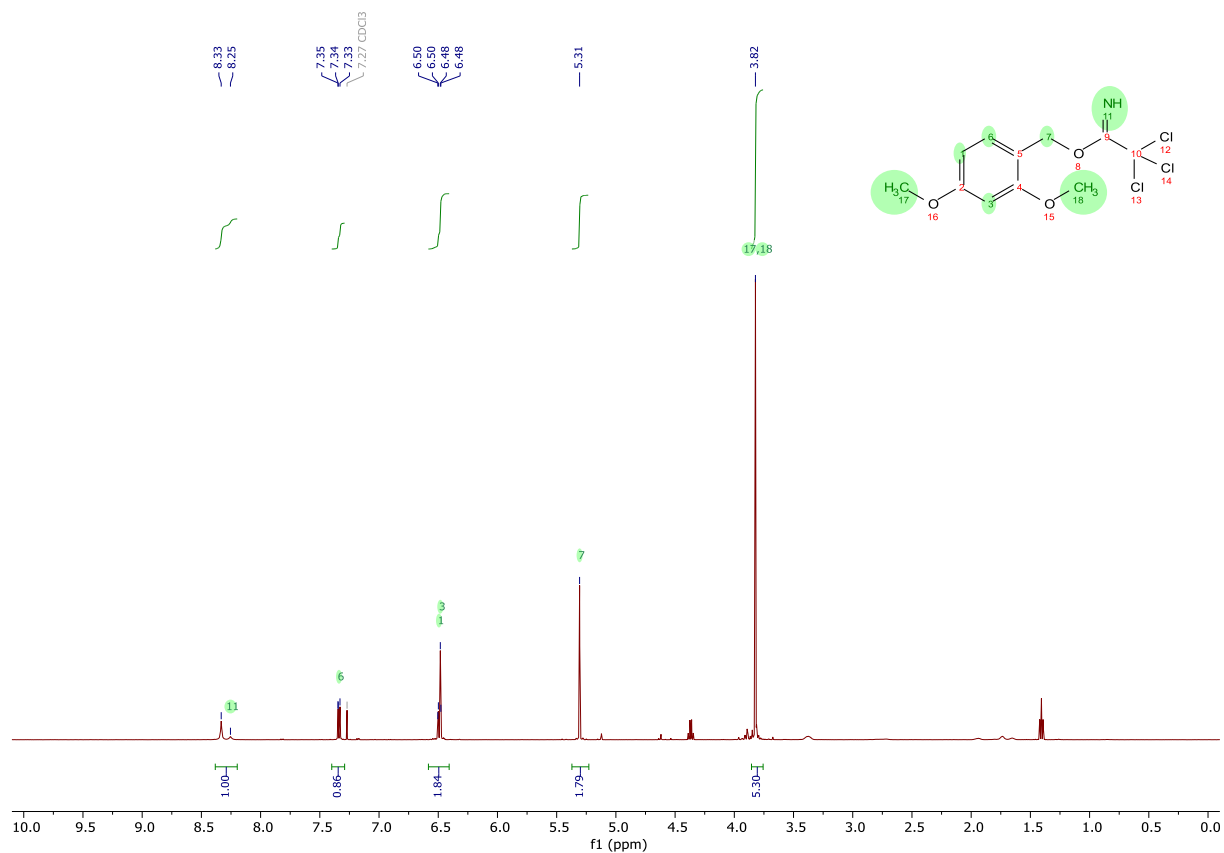
- (56) Ansel, J. C.; Kaynard, A. H.; Armstrong, C. A.; Olerud, J.; Bunnett, N.; Payan, D. Skin-Nervous System Interactions. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *106* (1), 198–204. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12330326>.
- (57) Davis, R. H.; Maro, N. P. Aloe Vera and Gibberellin. Anti-Inflammatory Activity in Diabetes. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **1989**, *79* (1), 24–26. <https://doi.org/10.7547/87507315-79-1-24>.
- (58) Ansel, J. C.; Kaynard, A. H.; Armstrong, C. A.; Olerud, J.; Bunnett, N.; Payan, D. Skin-Nervous System Interactions. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *106* (1), 198–204. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12330326>.
- (59) El-Sayed, M. Y.; Fetooh, H.; Refat, M. S.; Eldaroti, H. H.; Adam, A. M. A.; Saad, H. A. Complexes of the Plant Hormone Gibberellic Acid with the Pt(II), Au(III), Ru(III), V(III), and Se(IV) Ions: Preparation, Characterization, and in Vitro Evaluation of Biological Activity. *J. Mol. Liq.* **2019**, *296*, 111895. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111895>.
- (60) Lanigan, R. M.; Starkov, P.; Sheppard, T. D. Direct Synthesis of Amides from Carboxylic Acids and Amines Using B(OCH₂CF₃)₃. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (9), 4512–4523. <https://doi.org/10.1021/jo400509n>.
- (61) Egbewande, F. A.; Sadowski, M. C.; Levrier, C.; Tousignant, K. D.; White, J. M.; Coster, M. J.; Nelson, C. C.; Davis, R. A. Identification of Gibberellic Acid Derivatives That Deregulate Cholesterol Metabolism in Prostate Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (4), 838–845. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00929>.
- (62) Kim, K. E.; Park, S. B.; Yoon, N. M. Selective Reduction of α,β -Unsaturated Ketones with Potassium Triphenylborohydride. *Synth. Commun.* **1988**, *18* (1), 89–96. <https://doi.org/10.1080/00397918808057824>.

7 Přílohy

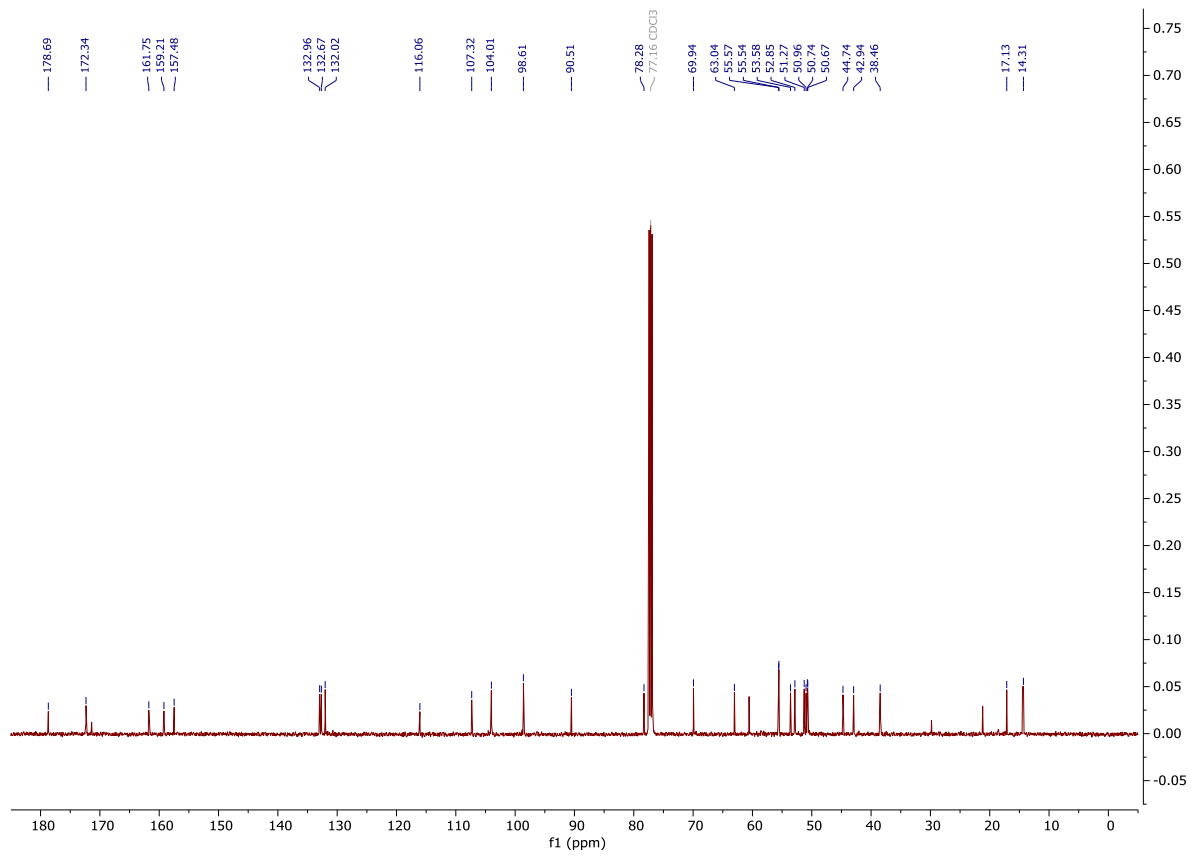
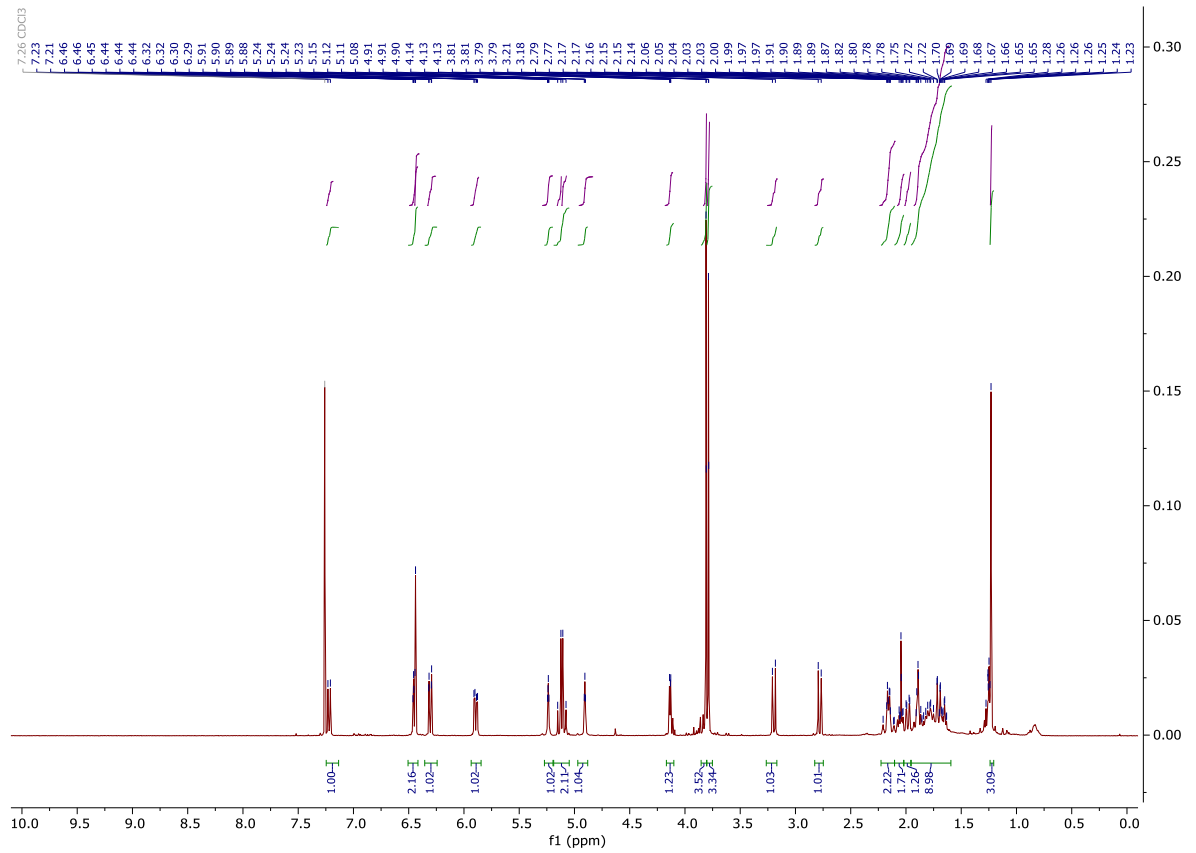
^1H spektra látky 1



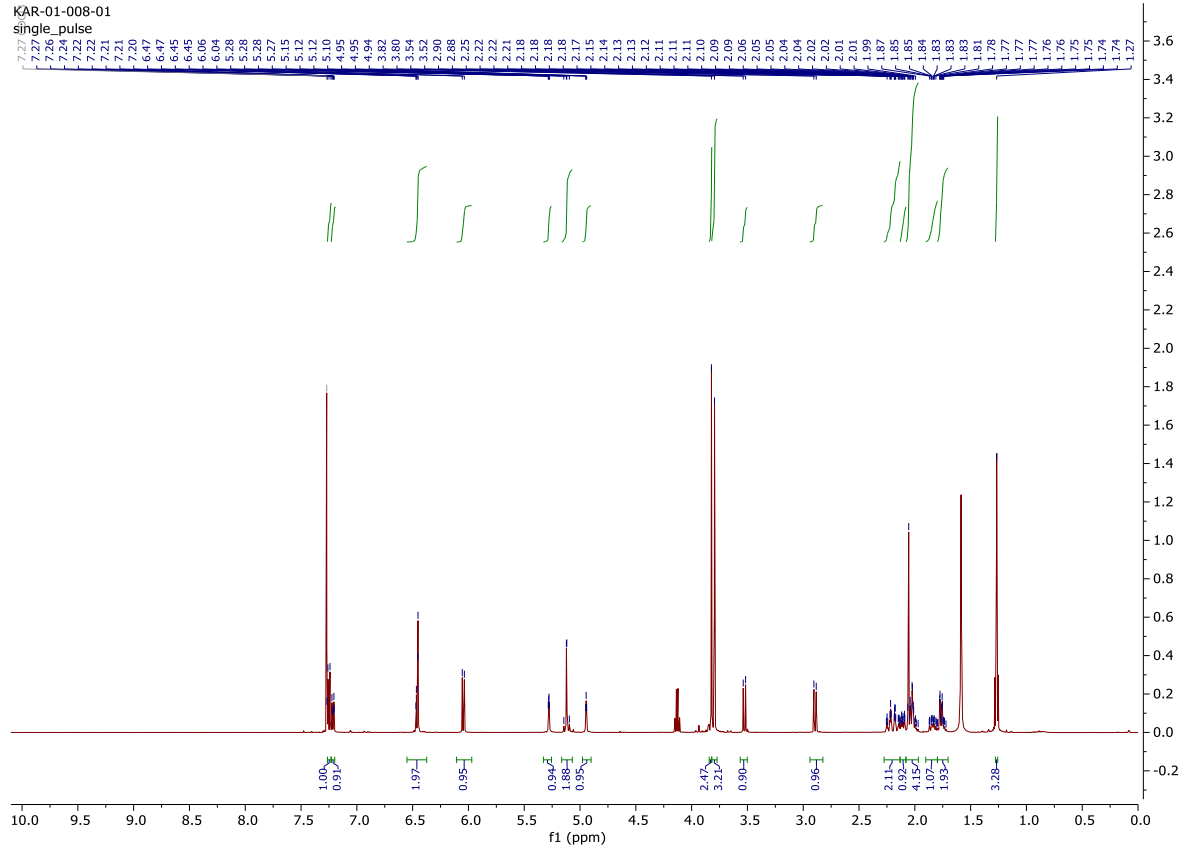
^1H a ^{13}C NMR spektra látky 4



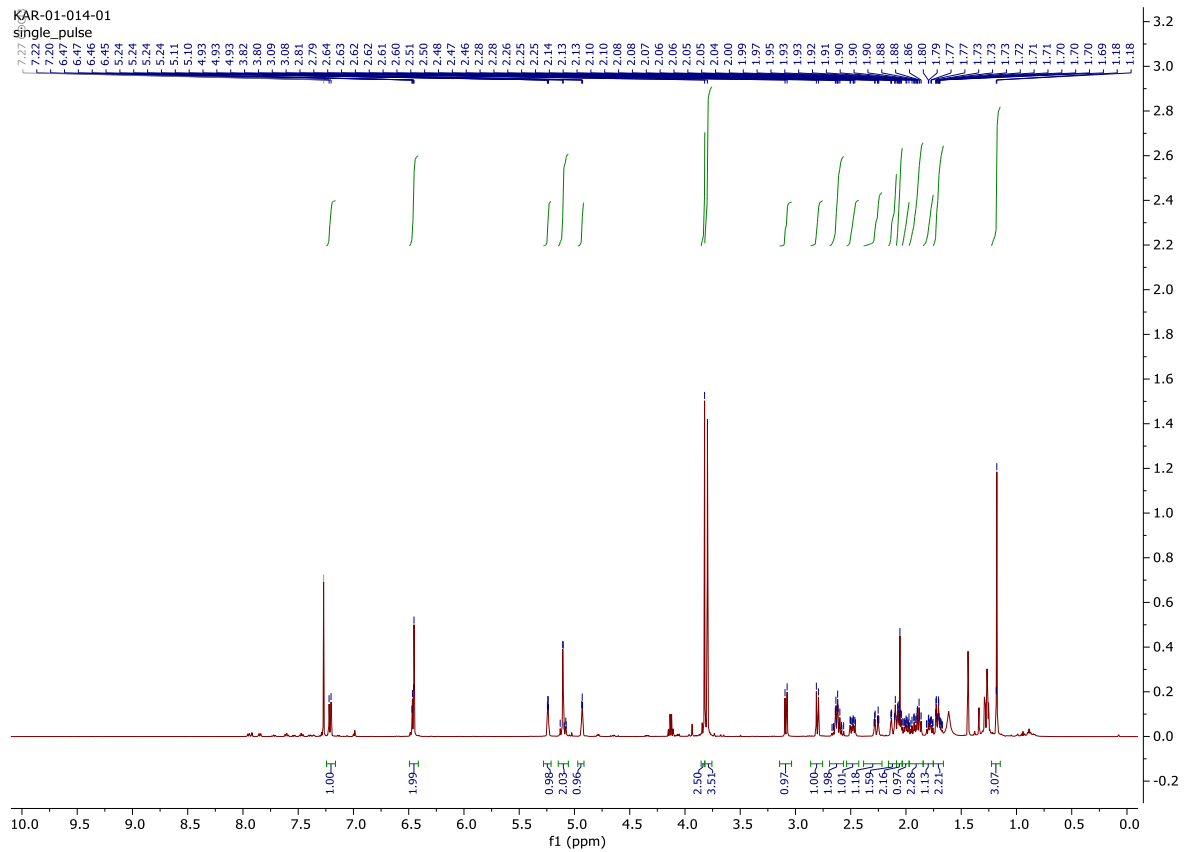
^1H a ^{13}C NMR spektra látky 5



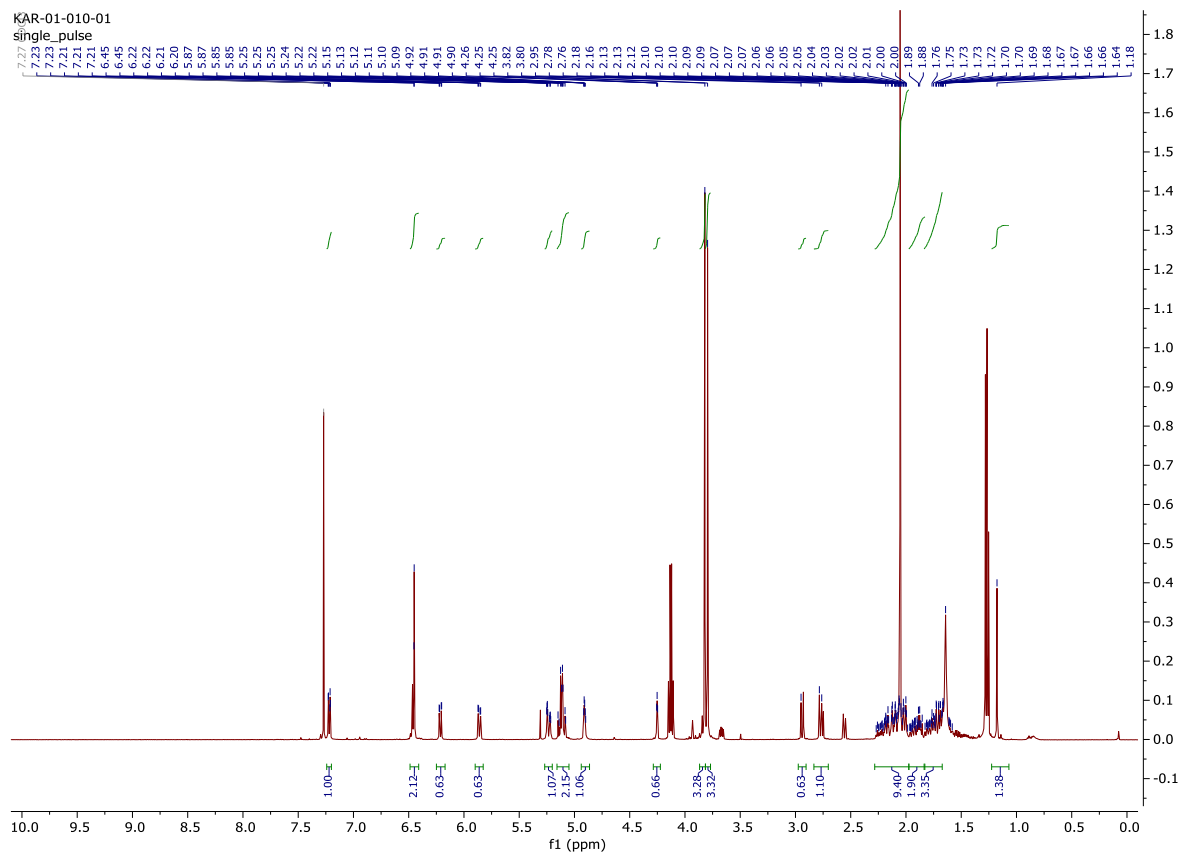
¹H NMR spektra látky 6



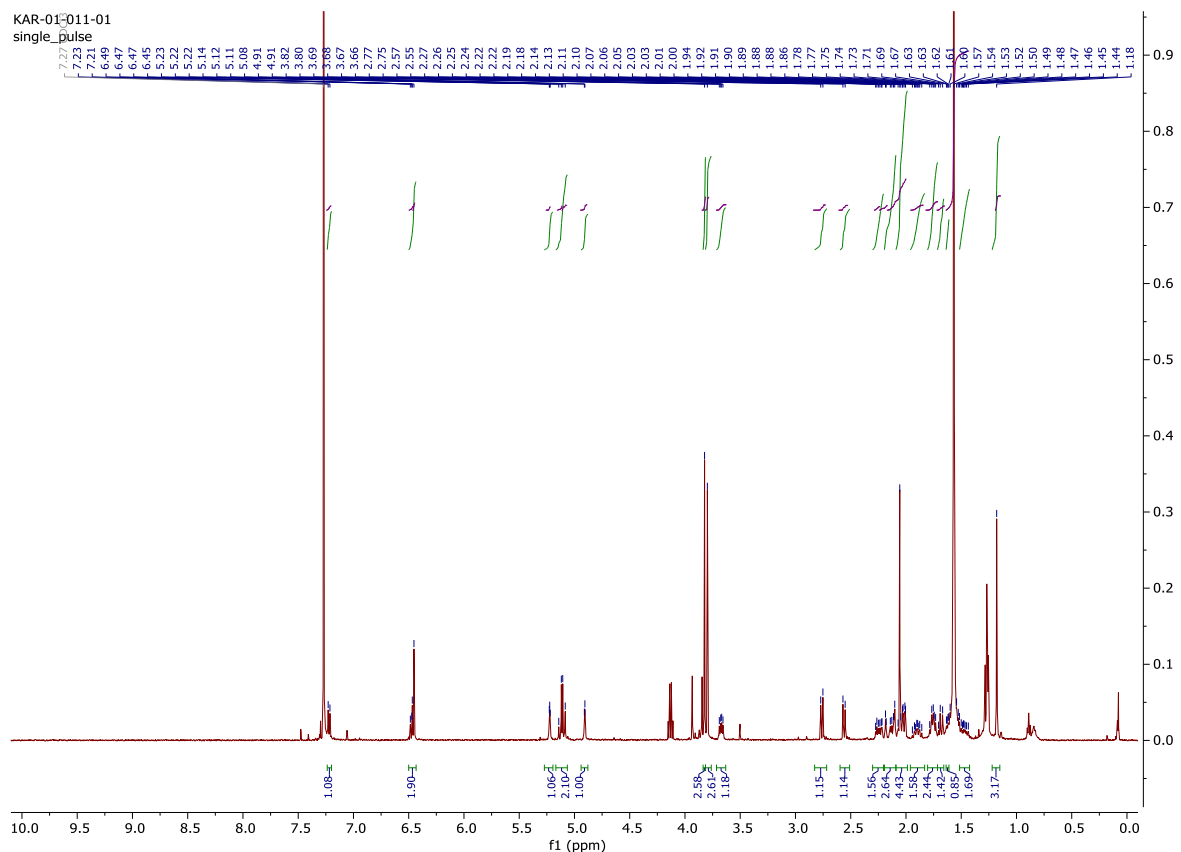
¹H NMR spektra látky 7



¹H NMR spektra látky 8

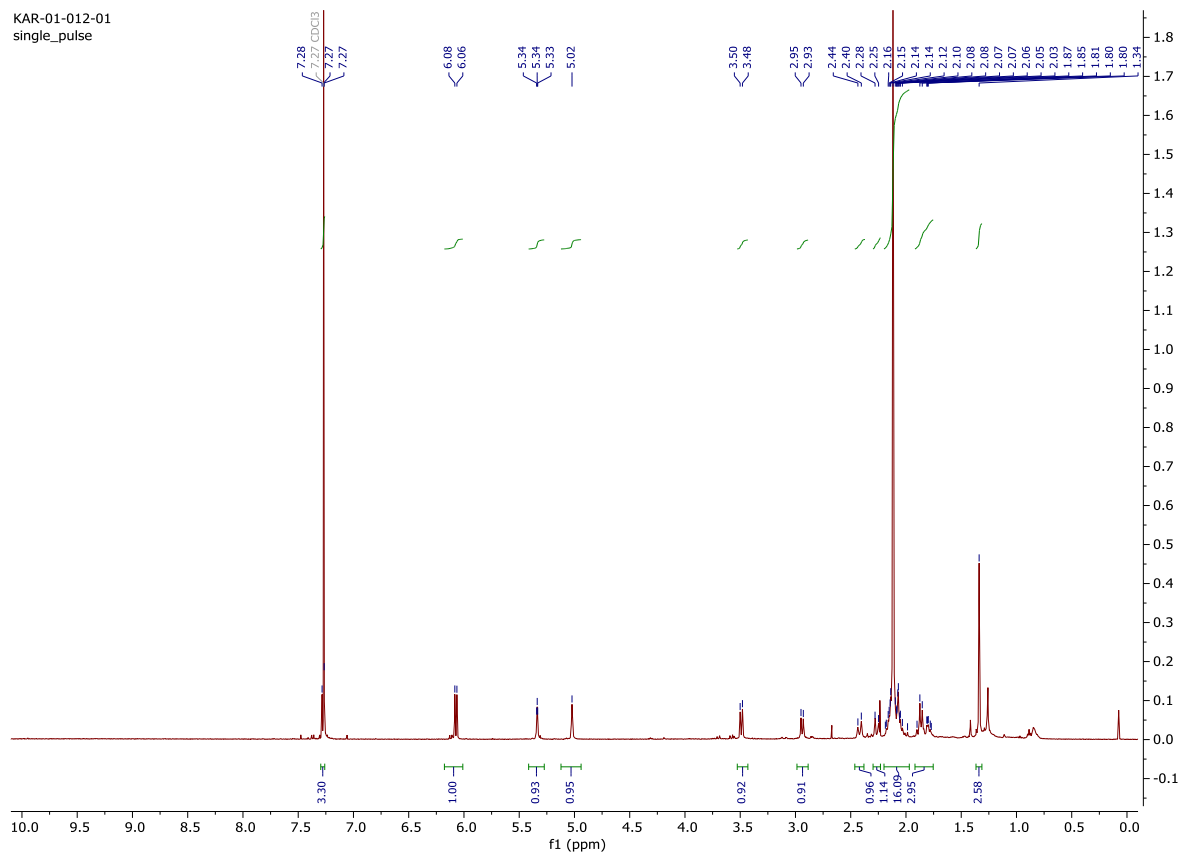


¹H NMR spektra látky 9



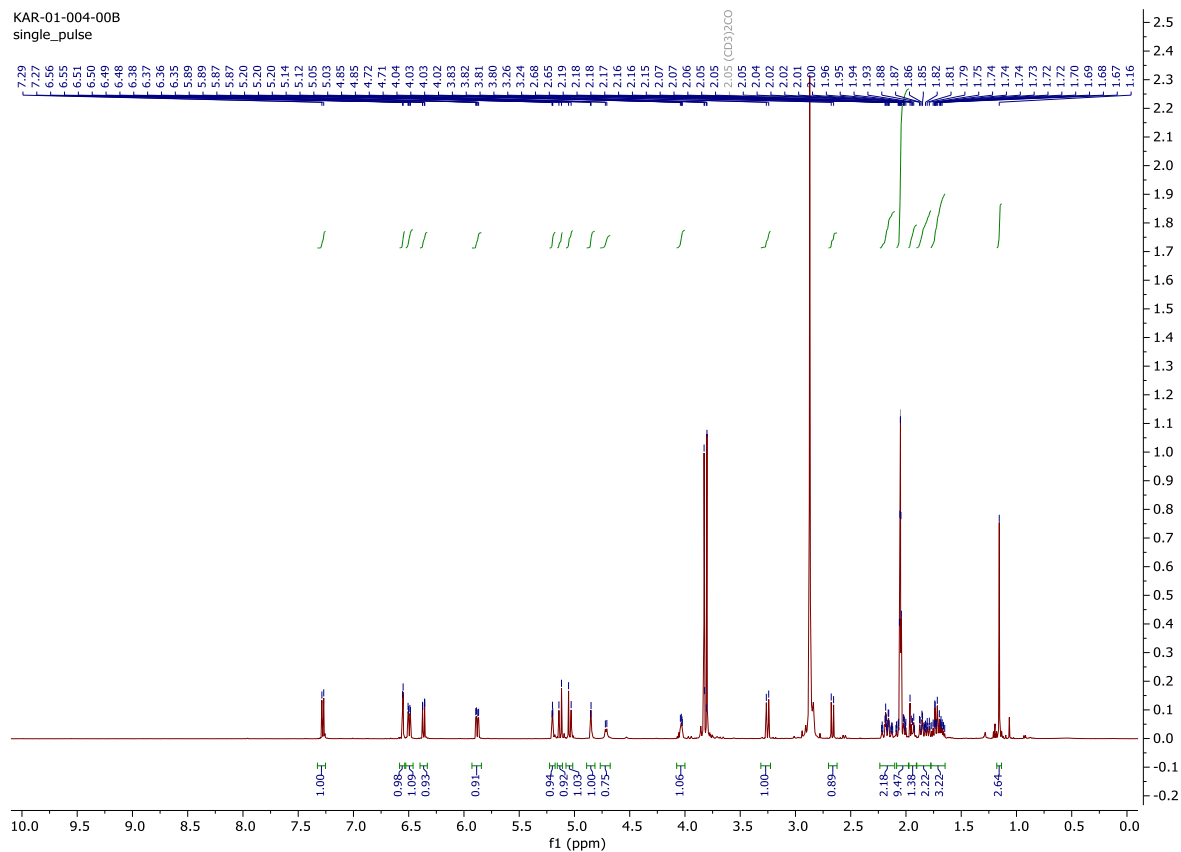
¹H NMR spektra látky 10

KAR-01-012-01
single_pulse



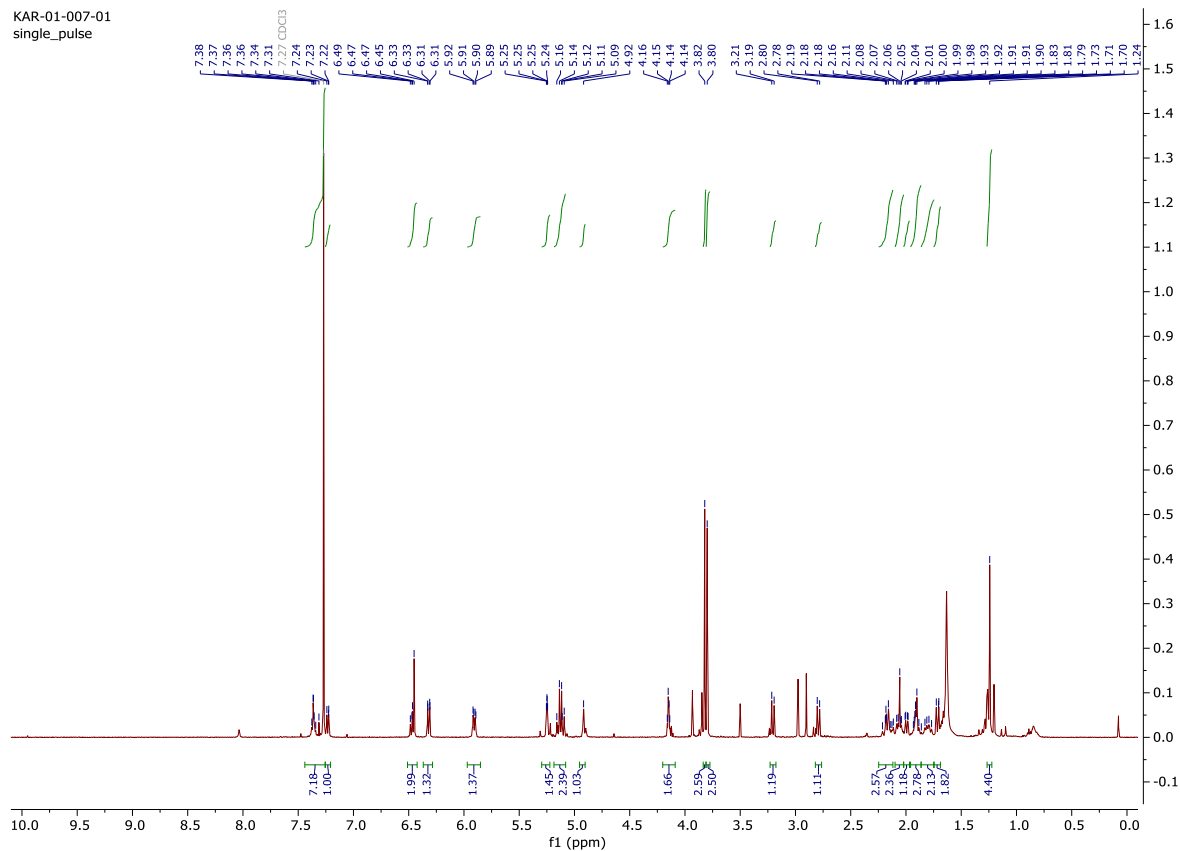
¹H NMR spektra látky 11

KAR-01-004-00B
single_pulse



^1H a ^{13}C NMR spektra látky 12

KAR-01-007-01
single_pulse



KAR-01-007-01
single_pulse decoupled gated NOE

