

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Příprava značených derivátů giberelinů:  
Předběžná studie**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                         |                                   |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Autor:                  | <b>Jan Skalík</b>                 |
| Studijní program:       | B1501 Experimentální biologie     |
| Studijní obor:          | Experimentální biologie           |
| Forma studia:           | Prezenční                         |
| Vedoucí práce           | <b>RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 2017                              |

## Bibliografická identifikace

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora | Jan Skalík                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Název práce             | Příprava značených derivátů gibberelinů: Předběžná studie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Typ práce               | Bakalářská                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Pracoviště              | Laboratoř růstových regulátorů                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Vedoucí práce           | RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Rok obhajoby práce      | 2017                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Abstrakt                | <p>Bakalářská práce je zaměřena na vytvoření literární rešerše o fluorescenčně značených růstových rostlinných hormonech – giberelinech a jejich chemických a fyzikálních vlastnostech. V experimentální části jsem se zaměřil na provedení prvních průzkumných experimentů zaměřených obecně na přípravu derivátů kyseliny salicylové a zavedené některých postranních řetězců, které mají za úkol imitovat fluorescenční značky. Tyto přípravné studie budou sloužit posléze k aplikaci při syntéze značených gibberelinů.</p> |
| Klíčová slova           | Fytohormony, gibereliny, fluorecein, značení signálních molekul                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Počet stran             | 67                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Počet příloh            | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Jazyk                   | Český                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

## **Bibliographical identification**

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Author's first name and surname | Jan Skalík                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Title of thesis                 | Labelled gibberelline-derivatives synthesis: Preliminary study                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Type of thesis                  | Bachelor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Department                      | Laboratory of Growth Regulators                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Supervisor                      | RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| The year of presentation        | 2017                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Abstract                        | <p>The bachelor consist of two main objectives. First, the literature research part that is focused on fluorescently labeled plant growth hormone – gibberellins and their chemical and physical properties. The second part, experimental, is focused on the first exploratory experiments that should pave our synthetic routes to the targeted labeled gibberellins. At this stage our focus is paid to the preparation of salicylic acid derivatives and the introduction of some side chains meant to mimic fluorescent labels.</p> |
| Keywords                        | Phytohormones, gibberellins, fluorescein, Labelling of signal molecules                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Number of pages                 | 67                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Number of appendices            | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Language                        | Czech                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

*/vlastnoruční podpis/*

## **Poděkování**

Rád bych upřímně poděkoval především vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. A to za jeho nezměrnou trpělivost, vstřícnost, odborné vedení, cenné rady a hlavně za čas, který mi věnoval. Dále bych rád poděkoval Prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za jeho pomoc a čas, který mi věnoval v rámci biologické rešerše. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat lidem z týmu Pospíšil Research group a také těm co pomohli s gramatickou stránkou této práce.

Také bych rád poděkoval Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého (granty číslo IGA\_PrF\_2017\_010 a IGA\_PrF\_2017\_013) za pomoc při financování zde prezentovaného výzkumu.

## Obsah

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Abecední seznam zkratk .....                                       | 8  |
| 1. Úvod a cíle práce .....                                         | 11 |
| 2. Současný stav řešené problematiky .....                         | 12 |
| 2.1. Rostlinné hormony .....                                       | 12 |
| 2.2. Gibereliny .....                                              | 13 |
| 2.2.1. Struktura giberelinů .....                                  | 13 |
| 2.2.2. Biosyntéza giberelinů .....                                 | 14 |
| 2.2.3. Deaktivace giberelinů .....                                 | 16 |
| 2.2.3.1. 2 $\beta$ -Hydroxylace .....                              | 16 |
| 2.2.3.2. ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI) .....                 | 16 |
| 2.2.3.3. Giberelin methyltransferasy (GAMT1, GAMT2) .....          | 17 |
| 2.2.3.4. Tvorba glukosyl esterů a glukosidů .....                  | 18 |
| 2.2.4. Biologicky aktivní gibereliny .....                         | 19 |
| 2.2.5. Fyziologické účinky giberelinů .....                        | 23 |
| 2.2.6. Mechanismus účinku giberelinů .....                         | 23 |
| 2.2.6.1. Překonání dormance a klíčení semen .....                  | 26 |
| 2.2.6.2. Stimulace růstu stonku .....                              | 27 |
| 2.2.6.3. Stimulace růstu hypokotylu .....                          | 28 |
| 2.2.6.4. Stimulace růstu kořenů .....                              | 29 |
| 2.2.6.5. Vývoj listů a jejich morfogeneze .....                    | 29 |
| 2.2.6.6. Indukce kvetení .....                                     | 29 |
| 2.2.6.7. Vývoj květu a pylu .....                                  | 31 |
| 2.2.6.8. Tvorba plodu a partenokarpie .....                        | 32 |
| 2.2.6.9. Vývin semen .....                                         | 32 |
| 2.3. Kyselina salicylová .....                                     | 33 |
| 2.3.1. Biosyntéza kyseliny salicylové .....                        | 33 |
| 2.3.2. SA v obraně proti patogenům .....                           | 34 |
| 2.3.3. Syntetické analogy SA aktivující SAR .....                  | 35 |
| 2.3.4. Identifikace SA receptoru .....                             | 35 |
| 2.4. Značené rostlinné hormony .....                               | 36 |
| 2.4.1. Značení signálních molekul .....                            | 37 |
| 2.4.2. Využití značených signálních molekul .....                  | 38 |
| 2.4.3. Typy značek – Fluorescenční vs. Radioznačené molekuly ..... | 38 |

|          |                                                                                                                        |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.3.1. | Radioaktivní značení.....                                                                                              | 38 |
| 2.4.3.2. | Detekce radioaktivně značených molekul.....                                                                            | 38 |
| 2.4.3.3. | Radioaktivně značené GA.....                                                                                           | 40 |
| 2.4.4.   | Fluorescenční značení .....                                                                                            | 40 |
| 2.4.4.1. | Detekce fluorescenčně značených molekul .....                                                                          | 40 |
| 2.4.4.2. | Fluorescenčně značené GA .....                                                                                         | 40 |
| 2.4.5.   | Biologická aktivita fluorescenčně značených derivátů giberelinů .....                                                  | 41 |
| 2.5.     | Shrnutí.....                                                                                                           | 41 |
| 3.       | Experimentální část.....                                                                                               | 42 |
| 3.1.     | Chemikálie.....                                                                                                        | 42 |
| 3.1.1.   | Vizualizační roztoky pro TLC.....                                                                                      | 42 |
| 3.2.     | Metody.....                                                                                                            | 42 |
| 3.3.     | Organická syntéza .....                                                                                                | 44 |
| 3.3.1.   | Methyl 2,5-dihydroxybenzoát (3) .....                                                                                  | 44 |
| 3.3.2.   | Příprava monoftalimid bromidů 6a-c.....                                                                                | 44 |
| 3.3.3.   | Substituční reakce mezi fenolem 3 a alkylbromidem 6 .....                                                              | 45 |
| 3.3.4.   | 5-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)hexyl)oxy)-2-hydroxybenzaldehyde (11c).....                                             | 46 |
| 3.3.5.   | 6-(3-carboxy-4-hydroxyphenoxy)hexan-1-aminium chloride (13c) .....                                                     | 47 |
| 3.3.6.   | tert-butyl (5-aminopentyl)karbamát (15) .....                                                                          | 48 |
| 3.3.7.   | 4-((6-((terc-butoxykarbonyl)amino)hexyl)karbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl) kyselina benzoová (17) .....    | 48 |
| 3.3.8.   | 5-(3-(6-((terc-butoxykarbonyl)amino)hexyl)thioureido)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl) kyselina benzoová (18) ..... | 49 |
| 4.       | Výsledky .....                                                                                                         | 51 |
| 4.1.     | Syntéza začínající z 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny založená na tzv. Gabrielově syntéze aminů 51                       |    |
| 4.2.     | Syntéza začínající z 2,5-dihydroxybenzaldehydu založená na tzv. Gabrielově syntéze aminů 54                            |    |
| 4.3.     | Příprava modifikovaných derivátů fluoresceinu k zavěšení na cílové molekuly.....                                       | 55 |
| 5.       | Diskuze .....                                                                                                          | 56 |
| 6.       | Závěr.....                                                                                                             | 61 |
| 7.       | Seznam použité literatury .....                                                                                        | 62 |

## Abecední seznam zkratk

|                  |   |                                                                                           |
|------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABA              | - | Kyselina abscisová                                                                        |
| AG               | - | AGAMOUS                                                                                   |
| AGL              | - | AGAMOUS-LIKE                                                                              |
| AP               | - | APETALA                                                                                   |
| ATP              | - | Adenosintrifosfát                                                                         |
| BA2H             | - | Kyselina benzoová 2-hydrolasa                                                             |
| BRs              | - | Brassinosteroidy                                                                          |
| BTH              | - | 7-karboxy benzo-1,2,3-thiodiazol                                                          |
| CC               | - | Sloupcová chromatografie                                                                  |
| CKs              | - | Cytokininy                                                                                |
| CPS              | - | <i>ent</i> -copalyl difosfát synthasa                                                     |
| DCM              | - | Dichlormethan                                                                             |
| DDF1             | - | DWARF AND DE-LAYED FLOWERING1                                                             |
| DELLA            | - | DELLA protein - represor GA signálu                                                       |
| DIPEA            | - | N,N-diisopropylethylamin                                                                  |
| DMF              | - | Dimethylformamid                                                                          |
| DMSO- <i>d</i> 6 | - | Deuterovaný dimethylsulfoxid                                                              |
| EtOAc            | - | Ethylacetát                                                                               |
| EUI              | - | ELONGATED UPPERMOST INTERNODE                                                             |
| <i>FT</i>        | - | <i>FLOWERING LOCUS T</i>                                                                  |
| GA               | - | Kyselina gibberelová, gibberelin                                                          |
| GAMT             | - | Gibberelin methyltransferasa                                                              |
| GAox             | - | GA-oxidasa                                                                                |
| GARE             | - | Gibberellic acid response element                                                         |
| GGDP             | - | Geranylgeranyl difosfát                                                                   |
| GAI              | - | GIBBERELIC ACID INSENSITIVE                                                               |
| GID1             | - | GIBBERELLIIN INTENSITIVE DWARF 1                                                          |
| GRAS             | - | Proteinová rodina GAI, RGA a SCARECROW                                                    |
| HATU             | - | 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorofosfát |
| IAA              | - | Kyselina indol-3-octová                                                                   |
| ICS              | - | Isochromát synthasa                                                                       |

|              |   |                                                             |
|--------------|---|-------------------------------------------------------------|
| INA          | - | 2,6-dichloroiso-nikotinová kyselina                         |
| IPL          | - | Isochromát pyruvát lyasa                                    |
| JA           | - | Kyselina jasmonová                                          |
| KAO          | - | Oxidáza <i>ent</i> -kaurenové kyseliny                      |
| KN1          | - | KNOTTED1                                                    |
| KO           | - | <i>ent</i> -Kauren oxidasa                                  |
| KS           | - | <i>ent</i> -Kauren synthasa                                 |
| LC           | - | Kapalinová chromatografie                                   |
| <i>LFY</i>   | - | <i>LEAFY</i>                                                |
| LHR          | - | Leucine heptad repeat                                       |
| LUE1         | - | LUCIFERASE SUPER-EXPRESSOR1                                 |
| MeOH         | - | Methanol                                                    |
| MS           | - | Hmotnostní spektrometrie                                    |
| NMR          | - | Nukleární magnetická rezonance                              |
| PAL          | - | Fenylalanin amoniák-lyasa                                   |
| PE           | - | Petrolether                                                 |
| PHOR1        | - | PHOTOPERIOD-RESPONSIVE1                                     |
| <i>PI</i>    | - | <i>PISTILLATA</i>                                           |
| <i>POTH1</i> | - | <i>POTATO HOMEODOMAIN1</i>                                  |
| PR           | - | Pathogenesis-Related protein                                |
| P450         | - | P450 monooxygenasa                                          |
| RGA          | - | REPRESSOR OF GAI                                            |
| <i>RGL</i>   | - | <i>RGA-like</i>                                             |
| RSG          | - | REPRESSION OF SHOOT GROWTH                                  |
| RT           | - | Laboratorní teplota                                         |
| RVO          | - | Rotační vakuová odparka                                     |
| SA           | - | Kyselina salicylová                                         |
| SABPs        | - | Salicyl acid binding proteins                               |
| SAR          | - | Systémově získaná resistance (Systemic Acquired Resistance) |
| SCR          | - | SCARECROW                                                   |
| SCF          | - | Skp1/Cullin/F-box                                           |
| Skp1         | - | S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1                          |
| <i>SLN1</i>  | - | <i>SLENDER 1</i>                                            |
| <i>SLR1</i>  | - | <i>SLENDER RICE 1</i>                                       |

|             |   |                                                   |
|-------------|---|---------------------------------------------------|
| SLs         | - | Strigolaktony                                     |
| SLY1        | - | F-box protein                                     |
| SNE         | - | SNEEZY                                            |
| <i>SOC1</i> | - | <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1</i> |
| SPY         | - | SPINDLY                                           |
| SVP         | - | <i>SHORT VEGETATIVE PHASE</i>                     |
| TBABr       | - | Tetrabutylamonium bromid                          |
| THF         | - | Tetrahydrofuran                                   |
| TLC         | - | Chromatografie na tenké vrstvě                    |
| TMV         | - | Tabákový mozaikový virus                          |
| TPSs        | - | Terpenová synthasa                                |
| 2ODDs       | - | 2-oxoglutarát-dioxygenasa                         |

## 1. Úvod a cíle práce

Gibereliny (GA) jsou rostlinné hormony ovlivňující řadu procesů probíhajících v tělech rostlin. Tyto hormony byly objeveny ve 30. letech 20. století v Japonsku (Taiz and Zeiger, 2010), kde byly také poprvé izolovány z parazitické houby *Gibberella fujikuroi* (podle nové klasifikace *Fusarium fujikoroii*). Tato houba je u rostlin zodpovědná za nemoc bakanae (Hedden and Sponsel, 2015). Rostliny rýže, které jsou touto nemocí postiženy, jsou nápadně vyšší rychlostí svého vzrůstu, a jejich fenotyp je celkově odlišný od fenotypu zdravých jedinců. Postižení jedinci jsou celkově vyšší, tenčí a světlejší než zdravé rostliny. Dalším symptomem nemoci jsou delší a tenčí listy, které nápadně přerůstají listy zdravých jedinců. U postižených jedinců se objevuje také tendence k poléhavosti a u některých dokonce i absence plodů.

To, že by nemoc mohla být způsobována parazitickou houbou bylo navrženo již roku 1912. Tato teorie byla ale experimentálně potvrzena až roku 1926, kdy Ewiti Kurosawa demonstroval, že pomocí sterilních filtrátů z výše zmíněné houby se dá iniciovat vznik symptomů bakanae u zdravých rýžových sazenic. Roku 1939 pak byla ve formě krystalů izolována látka, která byla pojmenována jako giberelin A. Dnes se již ví, že se jednalo o směs několika látek podporujících růst, které jsou dnes obecně označovány jako gibereliny (Raven and Peter, 1986).

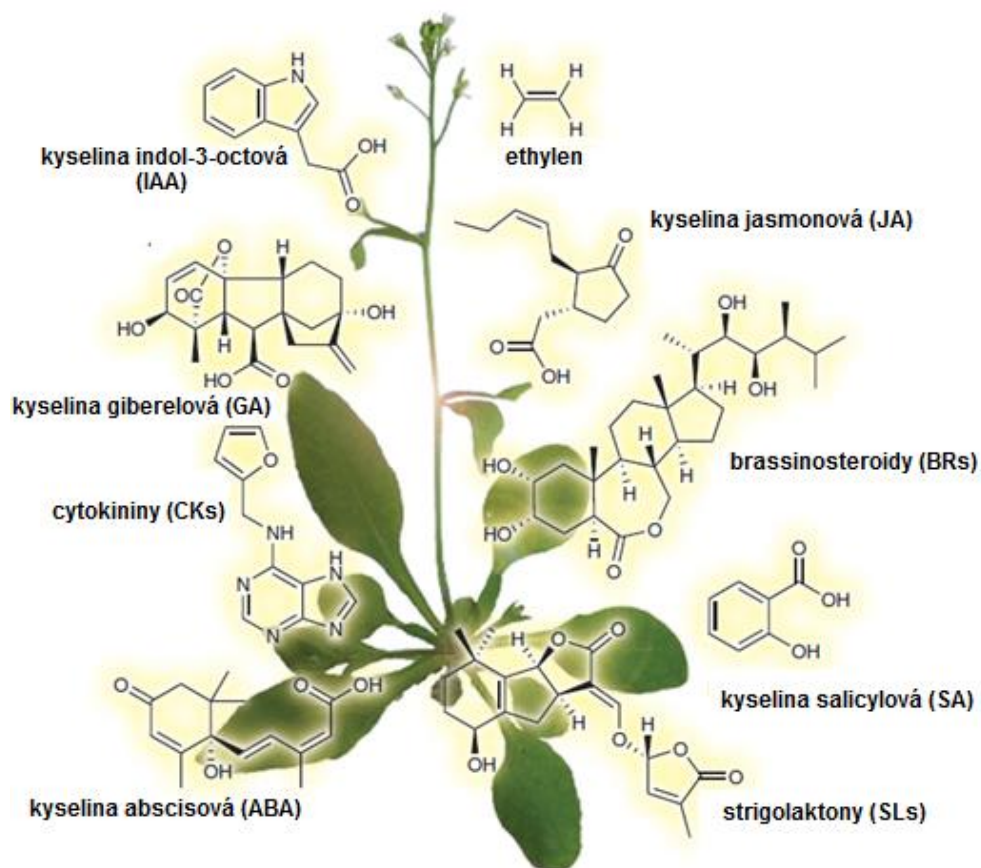
V současnosti je známo přes 130 různých GA, avšak pouze 4 z nich jsou biologicky aktivní (Shani et al., 2013). Mezi procesy regulované GA se řadí klíčení semen, prodlužování stonku, růst listů, vývoj semen, květů a indukce enzymu amylázy. Přestože GA jsou přítomny ve všech orgánech kvetoucích rostlin, jejich největší koncentrace se nachází v nezralých semenech (Taiz and Zeiger, 2010). Mezi další oblasti, které jsou bohaté na přítomnost těchto hormonů, patří mladé listy a kořeny.

Tato bakalářská práce se skládá ze dvou částí. První část je zaměřena na podrobnou literární rešerši s cílem pokrýt a popsat stav literatury zahrnující dnešní znalosti GA. Dále pak na možnosti jejich značení s ohledem na jejich biologickou aktivitu a následné využití značených GA při studiu biologických drah v rámci rostlin. Ve druhé části se za tuto práci zabývá možnost syntetických modifikací kyseliny salicylové opět s ohledem na její biologické vlastnosti. Účelem této práce je modifikace kyseliny salicylové (SA) tak, aby byla zachována její primární biologická funkce, ale zároveň i tak aby bylo možné na tuto látku navázat relevantní „značku“. V budoucnosti bychom pak této značené látky mohli využít ke sledování jejího osudu v tělech rostlin.

## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1. Rostlinné hormony

Rostlinné hormony jsou signální molekuly, jimiž jsou ovlivňovány procesy probíhající uvnitř buněk. V místě působení dochází k interakci mezi hormony a speciálními proteiny, které se nazývají receptory. Skrze receptory je do buňky přenášen hormonální signál, kterým jsou následně ovlivněny procesy zde probíhající. Rostlinné hormony, neboli fytohormony, jsou strukturně různě velké molekuly, syntetizované v různých esenciálních metabolických drahách. Tyto sloučeniny jsou důležité pro regulaci rostlinného růstu a vývoje, a také pro reakce na biotický i abiotický stres. V rostlinách se obecně vyskytují ve velmi nízkých koncentracích a působí lokálně v místě syntézy nebo v pletivech, která mohou být místu syntézy blízká i vzdálená (Santner et al., 2009). Jejich distribuce a rozložení jsou aktivně řízeny.



**Obrázek 1:** Rostlinné hormony regulují veškeré aspekty rostlinného růstu a vývoje (Adaptováno podle (Santner et al., 2009))

Dnes jsou mezi rostlinné hormony řazeny tyto látky: kyselina abscisová (ABA), kyselina indol-3-octová (IAA, jeden z auxinů), brassinosteroidy (BRs), cytokininy (CKs),

strigolaktony (SLs), ethylen, kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA) a kyselina gibberelová (GA) (Obrázek 1). Tato práce je detailněji zaměřena pouze na fytohormony, které jsou odvozené od kyseliny gibberelové, tedy na gibereliny.

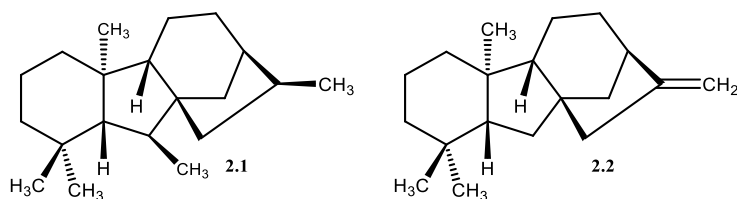
## 2.2. Gibereliny

Gibereliny jsou skupinou rostlinných hormonů, které jsou důležité pro klíčení semen, prodlužování stonku, růst a vývoj listů, dozrávání pylu a indukci kvetení, nasazení plodů a překonávání dormance. Po strukturní stránce jsou odvozeny od kyseliny gibberelové. V současné době je známo 136 GA, přičemž pouze čtyři z nich jsou biologicky aktivní. Mezi tyto čtyři biologicky aktivní GA se řadí GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub>. V přírodě se GA vyskytují v cévnatých rostlinách, houbách a některých bakteriích (Hedden and Sponsel, 2015).

Jak moc důležitá je role GA ve vývoji rostlin se ukázalo ve druhé polovině 20. století při tzv. „zelené revoluci“. Výsledkem této revoluce bylo zkrácení stonků obilí téměř o polovinu, což se podařilo vyšlechtěním nové trpasličí odrůdy. Kratší stonky byly oproti původním vysokým stonkům výhodnější hned z několika důvodů. U rostlin s kratším stonkem je více energie ukládáno do semen místo do prodlužování stonku, což se projevuje vyšší násadbou plodů. Kratší stonky jsou také mnohem méně náchylné k poléhavosti způsobené vlivem počasí. Tento významný šlechtitelský úspěch byl umožněn mutací v GA signální dráze (Band and Bennett, 2013), konkrétně v mutaci proteinu DELLA. Výsledkem této mutace byla resistance DELLA proteinu k GA indukované degradaci (Davière and Achard 2013; Eckardt, 2007).

### 2.2.1. Struktura giberelinů

Po strukturní stránce jsou GA tetracycké diterpenoidy, které se skládají ze čtyř pěti uhlíkatých isoprenoidních podjednotek. Jejich základní kostra je tvořena dvaceti uhlíkatým tetracyckým *ent*-giberelanovým skeletem nebo devatenácti uhlíkatým 20-nor-*ent*-giberelanovým skeletem, tzv. *ent*-kaurenem. U biologicky aktivních GA je pak ještě na uhlíku C-3 navázána  $\beta$ -hydroxylová skupina, na uhlíku C-6 karboxylová skupina a laktonový kruh mezi uhlíky C-4 a C-10.



Obrázek 2: *Ent*-giberelan (2.1) a *ent*-Kauren (2.2)

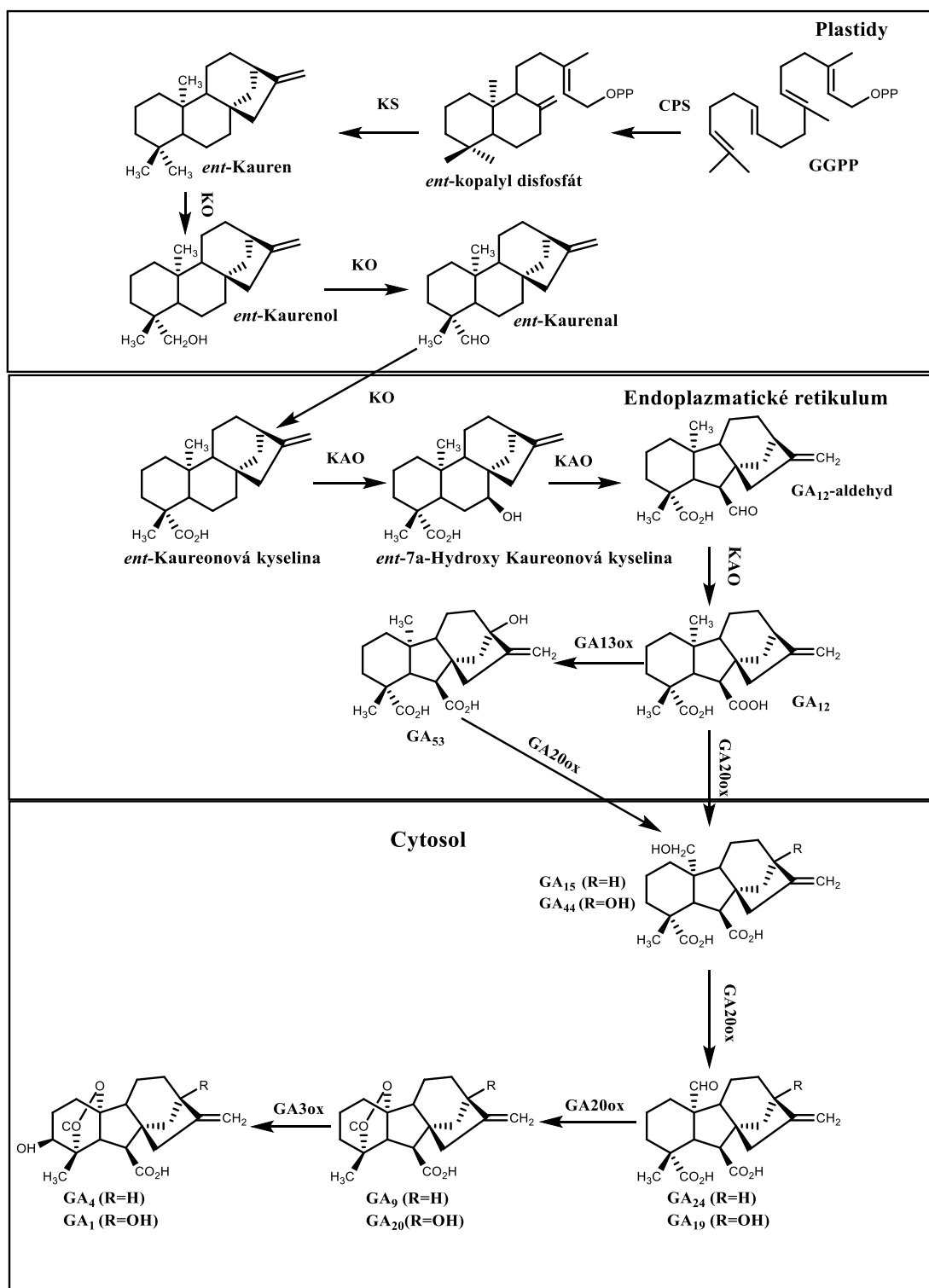
### 2.2.2. Biosyntéza giberelinů

GA jsou biosyntetizovány (Obrázek 3) z geranygeranyl difosfátu (GGDP) za přítomnosti tří rozdílných tříd enzymů, a to terpenových synthas (TPSs), P450 monooxygenas (P450s) a 2-oxoglutarát-dependentních dioxygenas (2ODDs) (Yamaguchi, 2008). Dvě TPSs, *ent*-copalyl difosfát synthasa (CPS) a *ent*-Kauren synthasa (KS), jsou zapojeny do dvoukrokové reakce, při které se z GGDP tvoří tetracyklický *ent*-kauren. Tyto reakce jsou lokalizovány v plastidech. Vzniklý *ent*-kauren je v následující reakci využit ke tvorbě GA<sub>12</sub>, což je obecný prekurzor ostatních GA. GA<sub>12</sub> se z *ent*-kaurenu formuje postupně v šesti oxidačních krocích. Celá přeměna je katalyzovaná dvěma enzymy ze třídy P450 monooxygenas, *ent*-kauren oxidasou (KO) a oxidasou kyseliny *ent*-kaureonové (KAO). KO je katalyzována sekvenční oxidací na uhlíku C-19. Výsledkem této reakce je *ent*-kaureonová kyselina, která je následně převedena na GA<sub>12</sub> pomocí KAO. KO je lokalizována ve vnější membráně plastidů a KAO v endoplazmatickém retikulu.

Ze šesti výše zmíněných biosyntetických kroků se první tři odehrávají v plastidech a jsou katalyzované *ent*-kauren oxidasou. *Ent*-kauren je zpracováván za vzniku *ent*-kaurenalu a následně kyseliny *ent*-kaureonové. Princip jednotlivých reakcí je totožný, vždy se jedná o hydroxylaci na uhlíku C-19. Druhá trojice oxidací je katalyzována oxidasou kyseliny *ent*-kaureonové za vzniku GA<sub>12</sub>. Substrátem pro první oxidaci z této trojice je kyselina *ent*-kaureonová. Produktem první oxidace je *ent*-7 $\alpha$ -hydroxy kaureonová kyselina, která je další oxidací využita pro vznik GA<sub>12</sub>-aldehydu. Ze vzniklého aldehydu se při finální oxidaci tvoří GA<sub>12</sub> (Hedden and Thomas, 2012).

V dalších krocích je GA<sub>12</sub> převeden na GA<sub>4</sub>, což je biologicky aktivní GA. Přeměna GA<sub>12</sub> na GA<sub>4</sub> je katalyzována dvěma oxidasami, GA<sub>20</sub>-oxidasou (GA<sub>20</sub>ox) a GA<sub>3</sub>-oxidasou (GA<sub>3</sub>ox). Tato přeměna je lokalizována na uhlících C-20 a C-3. GA<sub>20</sub>ox se katalyzuje sekvenční oxidací na uhlíku C-20, který se následně odštěpuje za vzniku CO<sub>2</sub> a  $\gamma$ -laktonu. GA<sub>20</sub>ox je tedy zodpovědná za produkci C<sub>19</sub>-GA, přičemž pro jejich tvorbu se jako substrátu využívá C<sub>20</sub>-GA.

Další biologicky aktivní GA<sub>1</sub> je syntetizován z GA<sub>53</sub> hydroxylací v pozici 13. GA<sub>53</sub> je tvořen činností enzymu GA<sub>13</sub>ox. V rýži je tento enzym kódován dvěma geny cytochromů P450 označovaných jako *CYP714B1* a *CYP714B2* (Magome et al., 2013). Pro tvorbu GA<sub>53</sub> se jako substrátu využívá GA<sub>12</sub> (Yamaguchi, 2008).



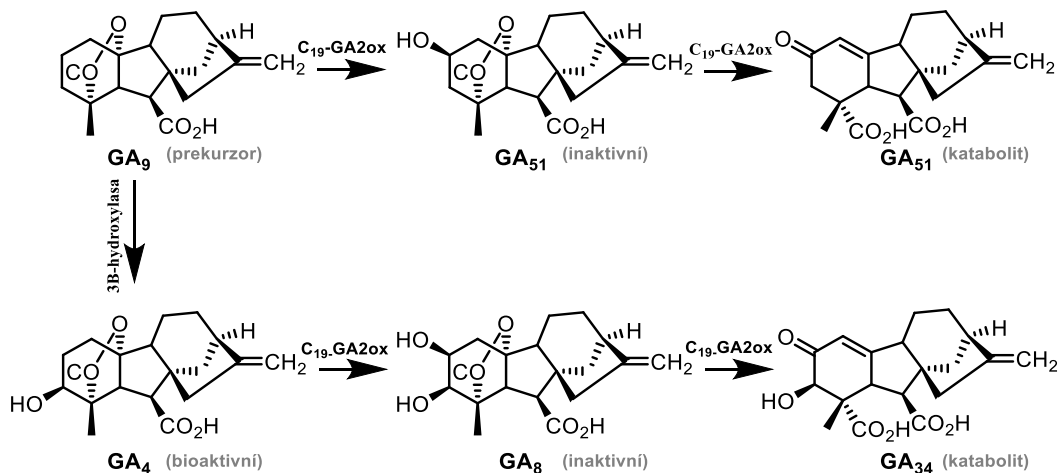
**Obrázek 3:** Schéma biosyntézy giberelinů, (GGDP = Geranylgeranyl-difosfát, CPS = ent-Copalyl difosfát, KS = ent-Kauren synthasa, KO = ent-Kauren oxidasa, KAO = oxidasa kyseliny ent-Kaureonové, GA3ox = GA3-oxidasa, GA13ox = GA13 oxidasa, GA20ox = GA20-oxidasa) (adaptováno podle (Urbanová et al., 2012))

### 2.2.3. Deaktivace giberelinů

Pro správnou regulaci koncentrace biologicky aktivních GA je nesmírně důležitý proces jejich deaktivace. Deaktivace je zprostředkována několika různými mechanismy, kterým jsou věnovány následující podkapitoly.

#### 2.2.3.1. 2 $\beta$ -Hydroxylace

Prvním způsobem deaktivace je 2 $\beta$ -hydroxylace (Obrázek 4), která je katalyzována enzymy 2ODDs, neboli GA2-oxidasy (GA2oxs). GA2-oxidasy jsou rozděleny do dvou skupin podle toho, jestli jsou jako substrát využívány GA s 19 či 20 uhlíky. Enzymy C<sub>20</sub>-GA2ox se od C<sub>19</sub>-GA2ox liší přítomností proteinové domény, která není přítomná u C<sub>19</sub>-GA2ox (Giacomelli et al., 2013). GA2oxs jsou tedy využívány jak biologicky aktivní GA, tak i jejich bezprostřední prekurzory (GA<sub>9</sub> a GA<sub>20</sub>). Tyto enzymy jsou podle fylogenetického příbuzenství děleny na třídy I, II a III. Třída III byla objevena teprve nedávno a využívá pouze GA s 20 uhlíky. Enzymy třetí třídy jsou pravděpodobně důležité ve vyčerpávání zásob prekurzorů GA (například GA<sub>12</sub> a GA<sub>53</sub>), které by jinak byly využity pro biosyntézu biologicky aktivních forem (Yamaguchi, 2008). Je důležité také zmínit, že dvojná vazba GA v pozici C-2 brání v inaktivaci GA2oxs (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Dvojná vazba v této pozici se vyskytuje například u GA<sub>3</sub>.

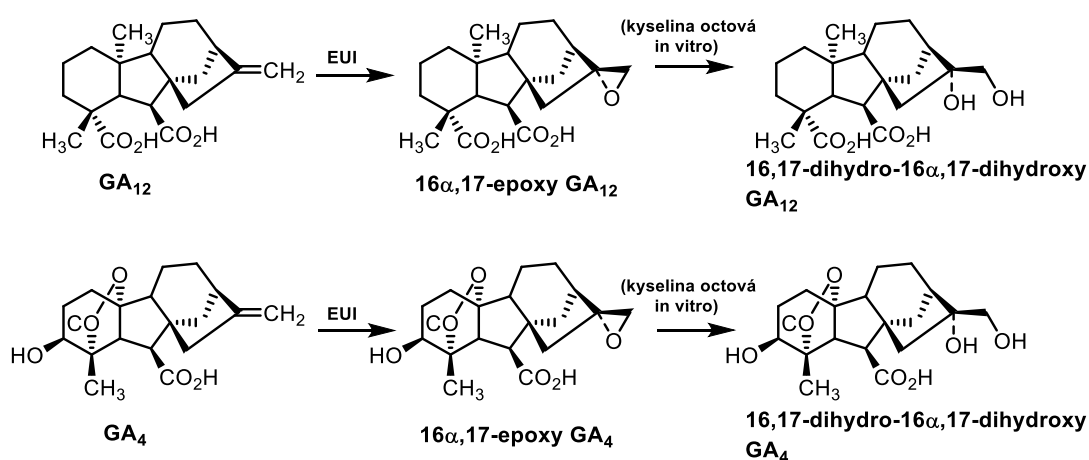


**Obrázek 4:** Deaktivace GA pomocí GA2-oxidasy (GA2ox), konkrétně pomocí C<sub>19</sub>-GA2ox (Adaptováno podle (Nakaminami et al., 2014)).

#### 2.2.3.2. ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI)

Ve druhém deaktivčním mechanismu (Obrázek 5) je využito enzymu ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI). Tento enzym je řazen mezi skupinu enzymů P450 monooxygenas a je označován jako CYP714D1. Důsledkem deaktivace pomocí EUI je vznik epoxidu v pozici 16,17 na GA bez OH skupiny v pozici 13 (GA<sub>4</sub>, GA<sub>9</sub> a G<sub>12</sub>). Příklad

této deaktivace může být nalezen v horních internodiích rýže, kde je enzymem EUI negativně působeno na GA řízenou regulaci prodlužování buněk (Luo et al., 2006). EUI je zde hlavním deaktivčním enzymem GA, což je také podloženo faktem, že se v těchto rostlinných orgánech, obsahují-li mutaci genu pro tento enzym, ve vysokých koncentracích akumulují biologicky aktivní GA. U rostlin rýže, s nadměrnou expresí genu EUI, se v této oblasti nachází velké množství 16 $\alpha$ ,17-dihydrodiolů, které vznikají z 16 $\alpha$ ,17-epoxidů (Obrázek 5). Objevem tohoto enzymu byla vysvětlena přítomnost GA 16 $\alpha$ ,17-dihydrodiolů v mnoha rostlinných druzích. Tato skutečnost poukazuje na to, že 16 $\alpha$ ,17-epoxidace GA by mohla být jejich hlavním deaktivčním mechanismem (Yamaguchi, 2008).

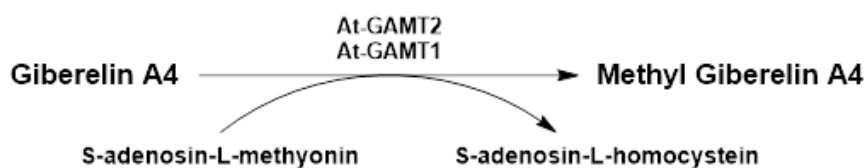


**Obrázek 5:** Deaktivace GA pomocí enzymu ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI) (Adaptováno podle (Zhu et al., 2006))

### 2.2.3.3. Giberelin methyltransferasy (GAMT1, GAMT2)

Třetím deaktivčním mechanismem je regulace hladiny GA skupinou enzymů giberelin methyltransferas (GAMT1,2) (Obrázek 6). Těmito enzymy je katalyzována methylace karboxylové skupiny na uhlíku C-6 GA. Lokalizovány tyto enzymy jsou ve vyvíjejících se semenech. K methylaci se využívá s-adenosin-L-methioninu (SAM) jako methylového donoru pro methylaci karboxylové skupiny GA za tvorby GA methyl esterů (MeGAs) (Varbanova et al., 2007). V rostlině *Arabidopsis thaliana* jsou tyto enzymy kódovány geny *GAMT1* a *GAMT2*, jež jsou součástí genové rodiny SABATH methyltransferas. Zmiňovaná rostlina je vzhledem ke své krátké generační době a malému jadernému genomu využívána jako modelový organismus. *GAMT2* se exprimuje hlavně ve vyvíjejících se semenech a obdobně je zde lokalizována i exprese *GAMT1*. Enzymy *GAMT1* a *GAMT2* jsou využívány biologicky aktivní GA a také jejich prekurzory, jakožto substráty pro produkci příslušných methyl esterů. Expres příslušných genů se v semenech odehrává během vývoje rostliny.

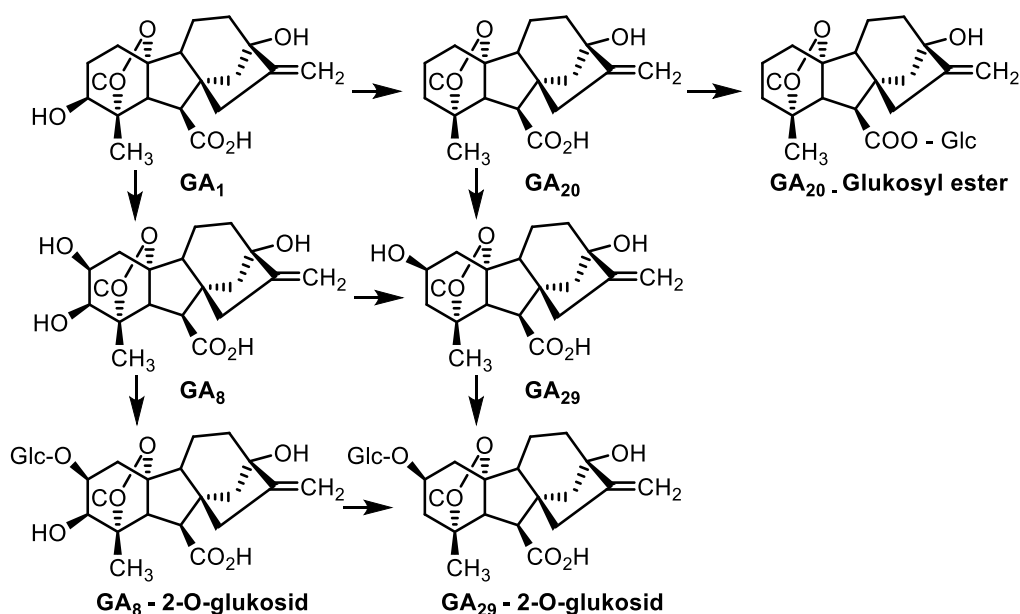
U mutantů, s defektními geny těchto enzymů, byl ve vyvíjejících se semenech pozorován nárůst biologicky aktivních GA. Oproti semenům wild type rostlin jsou během klíčení semena těchto mutantů více tolerantní vůči inhibitorům biosyntézy GA. (Yamaguchi, 2008). Nejnovějšími výzkumy je poukázáno na možnost zapojení methylace GA v mechanismu odpovědi na nedostatek vody. Zvýšená exprese genu *AtGAMT1*, genu methyltransferasy 1, je zodpovědná za snížení GA aktivity, následkem čehož je inhibice expanze listových epidermálních buněk. Výsledkem inhibice expanze zmiňovaných buněk je pak nižší tvorba svěracích buněk, což vede ke vzniku menších průduchů s menšími póry a sníženou propustností (Nir et al., 2014).



**Obrázek 6:** Deaktivace GA pomocí enzymu giberelin methyltraseras (GAMT1,2) (adaptováno podle internetového zdroje 1)

#### 2.2.3.4. Tvorba glukosyl esterů a glukosidů

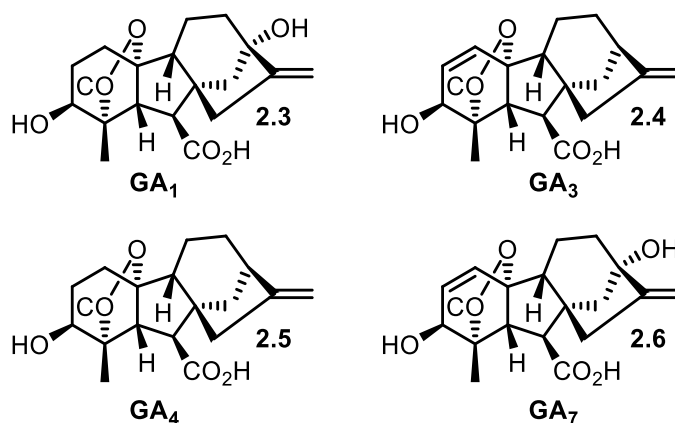
Zatím poslední známou možností deaktivace GA je tvorba GA-glukosyl esterů a GA-glukosidů (Obrázek 7). Tvorba glukosidů je způsobena konjugací GA s glukosou přes hydroxylovou skupinu GA. Podobná je i cesta vzniku esterů. Cílem esterifikace je 6-karboxylová skupina GA, výsledným produktem je tedy GA-glukosyl ester. Glukosidy GA jsou zcela biologicky inaktivní, kdežto glukosyl-estery nikoliv. Vzniklé estery je možné pomocí enzymů převést zpět na biologicky aktivní volnou kyselinu. Tímto způsobem jsou použitelné jako zásoba GA. Tato hypotéza je potvrzena tím, že při biologickém testování byla estery, v závislosti na druhu konjugátu a druhu testu, vykazována biologická aktivita. Z rostlin použitých při testování byly po ukončení testů extrahovány biologicky aktivní GA, které byly výsledkem hydrolýzy použitých konjugátů (Schneider et al., 1992).



**Obrázek 7:** Deaktivace GA pomocí tvorby glukosyl – esterů a glukosidů (adaptováno podle (Schneider et al., 1992))

#### 2.2.4. Biologicky aktivní gibereliny

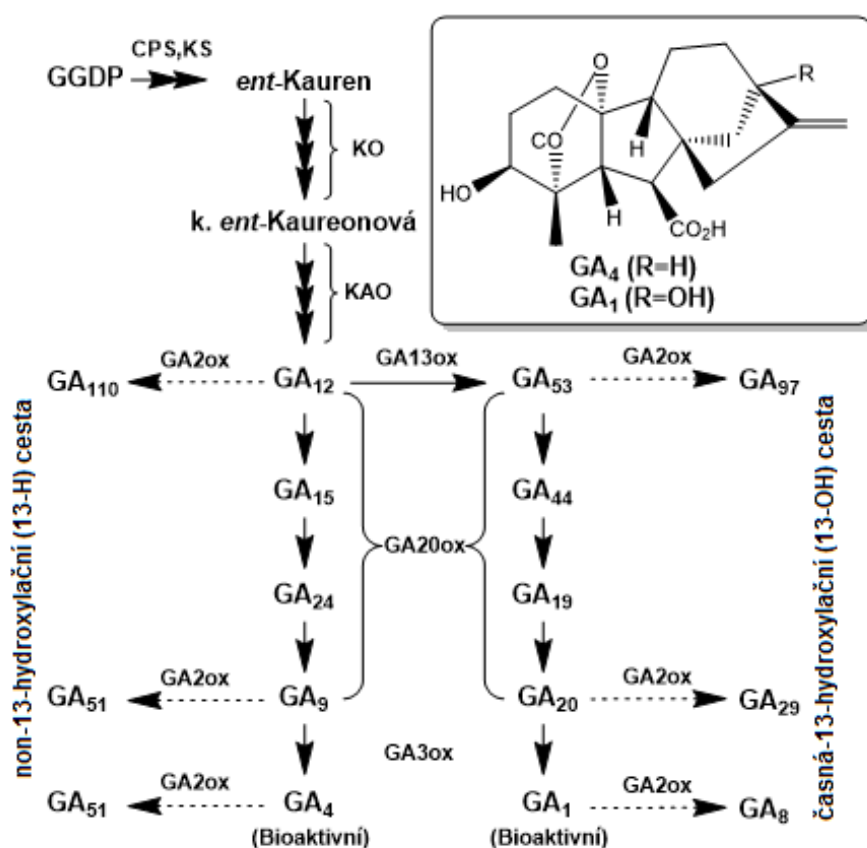
Mezi biologicky aktivní GA jsou řazeny GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub> (Obrázek 8), ostatní GA se v rostlinách vyskytují pouze jako prekuzory biologicky aktivních forem, případně jako jejich deaktivované metabolity. Všechny čtyři biologicky aktivní GA se řadí mezi C<sub>19</sub>-GA, u všech se vyskytuje 4,10-laktonový kruh, karboxylová kyselina na uhlíku C-6 a hydroxylová skupina na C-3 v β-orientaci.



**Obrázek 8:** Biologicky aktivní gibereliny

Tyto čtyři biologicky aktivní GA se dělí na dvě dvojice podle substituentu, který je navázaný na uhlíku C-13. Podle tohoto způsobu je můžeme rozdělit na 13-OH GA (GA<sub>1</sub> a GA<sub>7</sub>) a 13-H GA (GA<sub>3</sub> a GA<sub>4</sub>). Rozdíl v biosyntéze těchto dvou skupin je, že 13-H GA jsou

syntetizovány non-13-hydroxylační cestou, kdežto u 13-OH GA je tomu naopak (Obrázek 9). 13-OH GA jsou syntetizovány tzv. časnou 13-hydroxylační cestou. Obě skupiny GA se vyskytují spolu v rostlinách ve stejných orgánech, ale v různé koncentraci. Například GA<sub>4</sub> se vyskytuje v poměrně nízké koncentraci ve vegetativních orgánech, zatímco v prašnících je jeho koncentrace podstatně vyšší (Magome et al., 2013). Při zkoumání terciární struktury GA receptoru byly odhaleny zbytky aminokyselin v místě, které je důležité pro svou interakci s jednotlivými funkčními skupinami biologicky aktivních GA. Díky této interakci jsou GA vázány ve vazebném místě receptoru. Toto místo je po navázání GA uzavřeno pomocí tzv. víčka “(Obrázek 10).

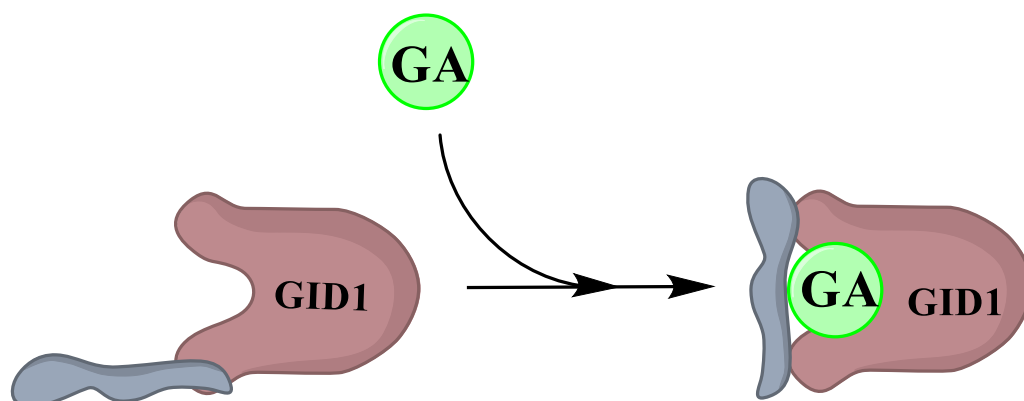


**Obrázek 9:** Schéma biosyntézy 13-H a 13-OH GA. (CPS = *ent*-copalyl difosfát syntasa, KS = *ent*-Kauren syntasa, KO = *ent*-Kauren oxidasa, KAO = oxidasa *ent*-kaurenonové kyseliny, GA2ox = GA2-oxidasa, GA13ox = GA13-oxidasa, GA20ox = GA20-oxidasa, GA3ox = GA3-oxidasa) (adaptováno podle (Magome et al., 2013))

Ačkoliv biologicky aktivní GA jsou schopny nést i další znaky, například dvojnou vazbu mezi uhlíky C-1 a C-2 (GA<sub>7</sub> a GA<sub>5</sub>) nebo –OH skupinu na uhlíku C-13 (GA<sub>1</sub> a GA<sub>3</sub>), nebyl pozorován žádný efekt těchto odlišností na navázání GA do receptoru. Na druhou

stranu přítomností 2 $\beta$ -hydroxylové skupiny je zabráněno v uzavření hydrofobního povrchu receptorového víčka, čímž se GA stává biologicky inaktivním (Taiz and Zeiger, 2010).

Biologická aktivita GA je přímo úměrná jejich afinitě k receptoru, který je označován jako GIBBERELLIN INTENSITIVE DWARF 1 (GID1). Afinita GA<sub>1</sub> je vůči tomuto receptoru nižší, než afinita GA<sub>4</sub> (Nakajima et al., 2006; Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Tento receptor byl poprvé objeven v rostlině rýže seté (*Oryza sativa*) a následně byl nalezen i jeho homolog v rostlině *Arabidopsis*.

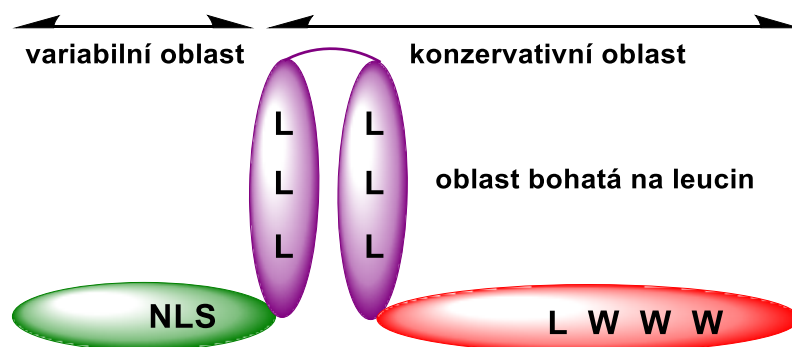


**Obrázek 10:** Vazebné místo pro biologicky aktivní GA na receptoru GID1 (GA – Giberelin, GID1 – Giberelin Intensitive Dwarf 1)

Biologická aktivita GA je dále závislá na jejich schopnosti tvořit komplex složený z GID1, GA a proteinu DELLA. Jako DELLA proteiny je označována proteinová podrodina transkripčních regulátorů GA signálu s represorovou funkcí tohoto signálu. Protein DELLA je po interakci s GID1-GA komplexem degradován ve 26S-proteasomu (Yamaguchi, 2008). Název DELLA proteinů je odvozen z počáteční sekvence aminokyselin D, E, L, L, A (Srikanth and Schmid, 2011).

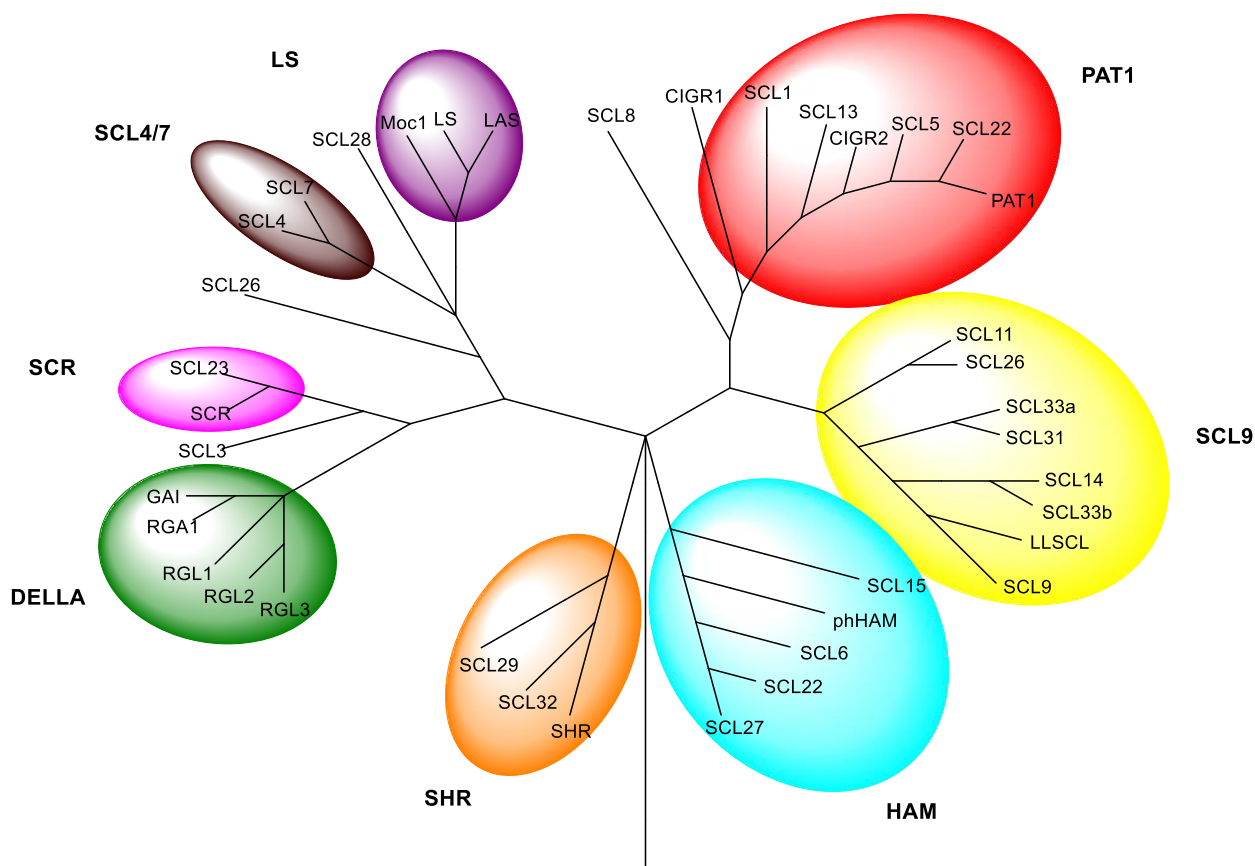
DELLA proteiny jsou součástí širší proteinové rodiny označované jako GRAS proteiny. Název této proteinové rodiny je odvozen ze zkratk prvních tří členů, GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GAI (RGA) a SCARECROW (SCR) (Hedden and Sponsel, 2015; Hirsch and Oldroyd, 2009). Proteiny této rodiny (Obrázek 11) jsou převážně tvořeny řetězci 400-700 aminokyselin se specifickými motivy na C-konci. Těmito motivy jsou: leucine heptad repeat I (LHR I), VHIIID, Leucine heptad repeat II (LHR II), PFYRE a motiv SAW. Na N-konci GRAS proteinů se v rámci této proteinové rodiny žádné významnější podobnosti nevyskytují (Hirsch and Oldroyd, 2009).

Oproti tomu N-konce DELLA proteinů jsou vyznačeny specifickou terminální sekvencí. V této sekvenci jsou obsaženy DELLA a TVHYNP motivy, které jsou pro regulaci GA důležité (Hirano et al., 2008). DELLA proteiny jsou dále nositeli dimerizační/transkativační domény, C-terminální represorové domény a regulační domény bohaté na serin a threonin (Hirsch and Oldroyd, 2009).



**Obrázek 11:** Obecná struktura GRAS proteinu (L=Leucin, N = Asparagin, S= Serin, Y= Tyrosin, W= Tryptofan) (adaptováno podle Internetového zdroje 2)

GRAS proteinová rodina se dělí do osmi menších podskupin (Obrázek 12), které jsou pojmenovány podle jejich členů či podle určitého motivu aminokyselin v jejich struktuře. Jednotlivými podskupinami jsou DELLA, HAM, LS, PAT1, SCL4/7, SCL9, SCR, SHR. GRAS proteiny se v rostlinném organismu zpravidla objevují ve formě transkripčních regulátorů. Geny těchto proteinů jsou umístěny v jádře, kde jsou dokonce umístěny i některé samotné proteiny této rodiny.



**Obrázek 12:** Fylogenetický strom GRAS proteinů (adaptováno podle Internetového zdroje 2)

### 2.2.5. Fyziologické účinky giberelinů

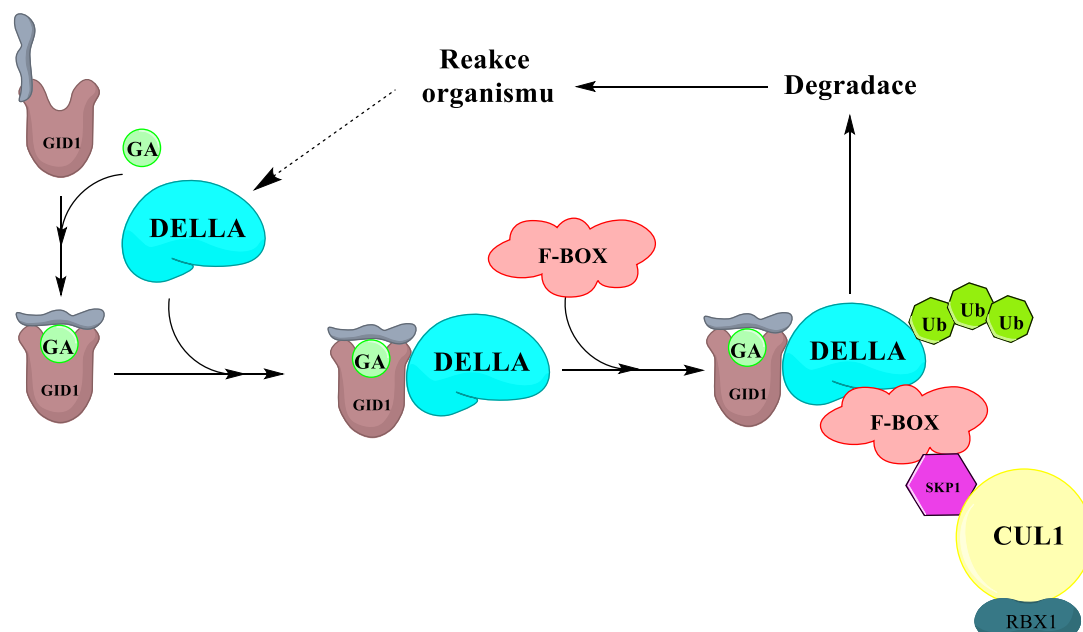
Účinky GA je ovlivněn široký okruh rostlinného růstu, vývoje a také odpovědi na okolní prostředí. Konkrétně se jedná o klíčení semen, prodlužování stonku, růst listů, dozrávání pylu a indukci kvetení. Po jejich aplikaci se navyšuje a urychluje tvorba plodů a v neposlední řadě se také usnadňuje překonávání dormance. V tomto případě je ovšem nutné ozáření světlem o určité vlnové délce, či vystavení nízké teplotě po určitou dobu (Ueguchi-Tanaka et al., 2007).

### 2.2.6. Mechanismus účinku giberelinů

Jak již bylo několikrát zmíněno, pomocí GA je ovlivněna řada procesů probíhajících v rostlinách. Důkazem tohoto tvrzení je fakt, že u mutantních rostlin, postižených defektem genů důležitých pro biosyntézu GA nebo pro odezvu na jejich signál, se vyskytují malé a tmavě zeleně zbarvené listy na výrazně kratších stoncích. U některých z nich se také vyskytuje defekt v klíčení semen, vývoji květů, či celkově opožděné tvorbě květů. Vyšší koncentrace GA oproti normální se pak projevuje vyšším a tenčím fenotypem.

Obečným mechanismem hormonální regulace rostlin je degradace proteinů v proteasomu 26S, jejíž důsledkem je inaktivace represorových proteinů. Příkladem tohoto systému je právě DELLA protein, což je negativní regulátor aktivity GA (Obrázek 13). Degradční mechanismus byl prvně popsán u auxinů, časem se ale ukázalo, že ubiquitin-proteasomová dráha je centrální pro většinu, ne-li pro všechny signální dráhy rostlinných hormonů. Mechanismus regulace je založen na malém proteinu, ubiquitinu, pomocí kterého jsou označovány proteiny, které mají být degradovány v proteasomu. Ubiquitin je prvně aktivovaný enzymem, který se označuje jako E1 ubiquitin-aktivační enzym. K aktivaci tohoto enzymu, je potřeba navázání ATP. Ubiquitinová značka se následně přenesse na druhý enzym, E2 ubiquitin-konjugační enzym. Tento enzym se následně asociuje s některým proteinem z velké rodiny proteinových komplexů označovaných S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (Skp1)/Cullin/F-box (SCF) komplex. Funkce tohoto komplexu je stejná jako funkce E3 ubiquitin ligasy. Pomocí F-box proteinů se obvykle váže velké množství proteinů do SCF komplexu, které následně mohou být označeny velkým množstvím kopií ubiquitinu E3 ligázy. Funkcí takto vzniklého polyubiquitinového řetězce je označení proteinu pro 26S proteasom, což je velký multiproteinový komplex, jehož funkcí je proteinová degradace. F-box proteiny jsou v rostlinách kódovány velkým množstvím genů a pravděpodobně jsou také zapojeny do degradace podobného množství cílů.

Část SCF komplexu je zahrnuta v signální dráze GA. Nicméně funkce receptoru GID1 není stejná jako funkce F-box proteinů. Pokud je GA navázán na GID1, projde receptor konformační změnou. Díky této změně je následně umožněno navázání DELLA represorových proteinů. Tímto krokem je iniciována konformační změna samotného



**Obrázek 13:** Obecný mechanismus transdukce signálu GA (adaptováno podle (Hedden and Sponsel, 2015) (GA – Giberelin; GID1 – Gibberellin Intensitive Dwarf 1; DELLA – DELLA protein obsahující motiv složený z aminokyselin D, E, L, L, A; F-BOX, SKP1, CUL1, RBX1 – proteinový komplex)

proteinu DELLA a následná vazba vzniklého komplexu k  $SCF^{SLY1}$ , ve kterém je obsažen F-box protein SLY1. Po ubiquitinaci je DELLA protein degradován v proteasomu 26S.

V hormonální signální dráze se často uplatňuje mechanismus negativní zpětnovazebné regulace. Dobrým příkladem je právě GA dráha. Biologicky aktivní GA jsou syntetizovány pomocí mnoha enzymaticky katalyzovaných reakcí, přičemž poslední dva enzymy této dráhy jsou kódovány geny *GA20ox* a *GA3ox*. V případě nedostatku GA, se pomocí proteinu DELLA spustí exprese zmiňovaných genů, což se projeví zvýšenou biosyntézou GA. Pomocí DELLA proteinů je zároveň inhibována exprese genů enzymů GA katabolismu, například *GA2ox*. Inhibicí exprese genů pro *GA2ox* se snižuje degradace GA. Výsledkem těchto dvou procesů je narůstající koncentrace GA, která se projevuje degradací DELLA proteinu v proteasomu 26S. Touto cestou je tedy negativně regulována vlastní koncentrace GA v tělech rostlin (Taiz et. All, 2015).

Signalizace GA je založena na mechanismu, který je řízen pomocí DELLA proteinů. DELLA proteiny se jako transkripční regulátory zapojují v potlačování signálu GA. U rýže a ječmene setého (*Hordeum vulgare*) je přítomen jeden gen proteinu DELLA, *SLENDER RICE1* (*SLR1*) a *SLENDER1* (*SLN1*), jehož funkcí je potlačení veškerých aspektů GA odpovědi v těchto druzích. V *Arabidopsis* se překvapivě vyskytuje pět různých DELLA proteinových genů. Těmito geny jsou: *GA-insensitive* (*GAI*), *Represor ga1-3* (*RGA*), *RGA-*

*like1 (RGL1)*, *RGL2* a *RGL3*. *RGA* a *GAI* jsou nejdůležitější během vegetativního růstu a indukce kvetení, *RGL2* pak pro klíčení semene. *RGA*, společně s *RGL1* a *RGL2* jsou potřebné taky pro správný vývoj květů.

Další možný způsob degradace proteinů DELLA je skrze pozitivní regulátor GA odpovědi PHOTOPERIOD-RESPONSIVE1 (PHOR1), který se nachází u rostliny Lilek brambor (*Solanum tuberosum*). Tento regulátor se podobá U-box ubiquitin E3 ligáze.

U *Arabidopsis* byla nalezena ještě jedna možná cesta regulace, a to přes negativní regulátor SPINDLY (SPY), který byl jinak identifikován také u ječmene a petúnií (*Petunia hybrida*). Tímto regulátorem by hypoteticky mohly být modifikovány či aktivovány DELLA proteiny (Fleet and Sun, 2005).

#### **2.2.6.1. Překonání dormance a klíčení semen**

V případě nepříznivých podmínek pro klíčení jsou zralá semena mnoha druhů rostlin schopna započít tzv. dormanci. Dormance je proces, při němž jsou dočasně pozastaveny či omezeny fyziologické procesy živých organismů, v tomto konkrétním případě v semenech rostlin. Doba po kterou je tento stav udržován, je různá, její délka je závislá na genotypu dané rostliny a také na vnějších podmínkách. (Dubreucq et al., 2000).

Dormance a klíčení jsou procesy ovlivňované velkým množstvím genů. Tyto dva procesy jsou závislé na strukturách semene, obzvláště pak na těch, které jsou nejbližší embryu, a dále pak na faktorech, které jsou schopny ovlivňovat růst samotného embrya. Vývojové faktory mohou pocházet již z mateřské rostliny, ale také mohou být produkovány samotným embryem (Koornneef et al., 2002). Dormance je pak definovaná jakožto selhání zdravých životaschopných semen při dokončení klíčení za vhodných podmínek.

Semena obilovin jsou složena ze tří částí: embrya, endospermu a obalu, perikarpu. U embrya se vyskytuje speciální orgán s absorpční funkcí, který se nazývá scutellum. Endosperm je složen ze dvou vrstev, první je škrobová a druhá aleuronová. Škrobová vrstva je umístěna centrálně a je tvořena mrtvými silnostěnnými buňkami se škrobovými zrny. Její obal je tvořen aleuronovou vrstvou, která je tvořena ze živých buněk, jejichž funkcí je produkce hydrolytických enzymů do endospermu během klíčení. Buňky této vrstvy jsou citlivé na GA. Funkcí produkováných hydrolytických enzymů je rozklad skladovaných zásob energie na jednoduché cukry a aminokyseliny, které jsou následně transportovány do embrya skrze scutellum.

Klíčení semen je podmíněno vhodnými podmínkami. Jednou z těchto podmínek je dostatek vody, při kterém se uvolňují GA z embrya, ve kterém jsou syntetizovány. Jak již

bylo výše zmíněno, buňky aleuronové vrstvy jsou citlivé na GA, přičemž pozitivní reakce se vyskytuje hlavně u GA<sub>3</sub>. V odpověď na tyto hormony se začínou v buňkách této vrstvy produkovat hydrolytické enzymy. Nejvýznamnějším z nich je  $\alpha$ -amyláza. Činností GA je tento enzym ovlivněn hned dvěma způsoby. Prvním účinkem GA je blokáce inhibitorů transkripce a translace genů pro  $\alpha$ -amylázu. Druhým účinkem je stimulace  $\alpha$ -amylázové aktivity pomocí biologicky aktivních GA. Touto cestou je iniciována nová syntéza enzymu z aminokyselin, místo toho aby byl aktivován již existující enzym. Mechanismus účinku GA na  $\alpha$ -amylázu je založen opět na degradaci DELLA proteinů. Po jejich degradaci se zvyšuje exprese GAMYB proteinů. MYB proteiny jsou jednou ze tříd transkripčních faktorů všech eukaryotů. GAMYB se následně váží na receptor GARE (Gibberellic Acid Response Element), který je přítomen v promotoru genu  $\alpha$ -amylázy, čímž se aktivuje jeho exprese.  $\alpha$ -amyláza je po své syntéze transportována z aleuronových buněk cestou s vyšší koncentrací Ca<sup>2+</sup> iontů. Činností  $\alpha$ -amylázy a ostatních hydrolas se rozkládají škrobová zrna na jednodušší látky. Získané živiny jsou následně pohlceny scutellem a poté transportovány do růstových oblastí embrya, kde jsou využity pro jeho vývoj (Taiz and Zeiger, 2010).

Roku 2012 byla na semenech GA-deficientního mutantu *Arabidopsis ga1*, provedena proteomická studie se zajímavými výsledky. Touto studií se prokázalo, že ačkoliv GA jsou důležité pro dokončení klíčení, nejsou již přímo zapojeny do dalších procesů v jeho průběhu. Během experimentu bylo v průběhu klíčení detekováno celkově 46 proteinových změn, ale pouze jedna z nich byla závislá na GA. Konkrétně se jednalo o změnu v cytoskeletálním komponentu  $\alpha$ -2,4-tubulinu, což je považováno za důkaz toho, že semena mutantu *ga1* jsou metabolicky aktivní i přesto, že klíčení není úplně dokončeno (Rajjou et al., 2012).

#### **2.2.6.2. Stimulace růstu stonku**

Dalším účinkem GA na vývoj rostlin je stimulace dlouhivého růstu stonku. Důkazem pro toto tvrzení je to, že mutanti s GA deficitem jsou trpasličího vzrůstu a naopak jedinci s vyšší koncentrací GA oproti normálu jsou podstatně vyššího vzrůstu. Deficit bývá velmi často způsobován mutací v biosyntetických enzymech, anebo overexpresí genů katabolických enzymů GA, jakým je třeba GA2-oxidas .

Do samotné stimulace růstu stonku je zapojeno mnoho transkripčních faktorů. Jedním z nich je tabákový protein REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG). Funkcí tohoto faktoru je aktivace transkripce genu pro kauren oxidasu. Nadprodukce dominantní negativně mutované formy RSG se pak projevuje deficitem v biosyntéze GA. Následkem deficitu

je trpasličí fenotyp postižené rostliny. Pomocí RSG je také zabráněno overexpresi genů pro GA2-oxidasy. RSG se tedy podílí na zpětnovazebné regulaci těchto enzymů.

Dalším proteinem zapojeným do prodlužování stonku je protein APETALA2 (AP2), což je typ transkripčního faktoru DWARF AND DE-LAYED FLOWERING1 (DDF1) a MADS-boxprotein AGAMOUS-LIKE15 (AGL15). Overexprese faktoru DDF1 nebo AGL15 se projevuje GA deficifentním trpasličím fenotypem rostlin. Při overexpresi *DDF1* se snižuje akumulace GA, což potvrzuje, že je tento faktor zodpovědný za potlačení exprese genů pro biosyntézu GA. Faktor AGL15 se váže na promotor genu *AtGA2ox6*, čímž je poukázáno na to, že by tento faktor mohl být také zapojen do regulace hladiny GA.

Posledními dvěma transkripčními faktory jsou SNEEZY (SNE) a *LUCIFERASE SUPER-EXPRESSOR1* (*LUE1*), oba byly identifikované v *Arabidopsis*. První zmiňovaný faktor, SNE je homologem F-box proteinu SLY1 a jeho funkcí je podpora degradace proteinu DELLA. Druhý zmiňovaný je gen *LUE1*. *Tímto genem je kódován ortolog kataninu p60*, přičemž ztráta funkce genu *LUE1* se projevuje změnou orientace mikrotubulů a následně i kratší délkou stonku. Obdobně se projevuje i zvýšená exprese genu *AtGA20ox* (Fleet and Sun, 2005).

#### **2.2.6.3. Stimulace růstu hypokotylu**

GA jsou také zapojeny do prodlužování hypokotylu. V současné době je známo, že prodlužování buněk a délka hypokotylu *Arabidopsis* je ovlivněna několika různými faktory. Těmito faktory jsou ethylen, auxiny a brassinosteroidy.

Všeobecně jsou rostliny závislé na denním světle, přičemž se tato závislost projevuje již u sazenic. Hypokotyl fotomorfogenních sazenic rostoucích za vhodných podmínek nabývá sytě zelené barvy s plně vyvinutými dělohami, kdežto etiolizovaní jedinci rostoucí při nedostatku denního světla se vyznačují relativně dlouhým a světlým hypokotylem, jenž bývá zakončen apikálním vrcholem. Kotyledon u etiolizovaných jedinců nebývá vůbec vyvinutý a hladina GA je u těchto rostlin vyšší, než u jedinců rostoucích za příhodných podmínek.

U etiolizovaných jedinců se sníženou hladinou GA, se zvyšuje exprese světlem indukovaných genů a jejich fenotyp je blíže fenotypu fotomorfogenních rostlin. Tento jev je způsobem DELLA proteiny RGA a GAI, jejichž činností je potlačena GA inhibice fotomorfogeneze. Proteiny RGA a GAI jsou také podpořeny činností ethylenu a auxinu, jejichž společná integrace s GA signální dráhou je zapojena v působení proti DELLA

proteinů a zároveň je jejich činnost potřebná pro tvorbu apikálního vrcholu (Fleet and Sun, 2005).

#### **2.2.6.4. Stimulace růstu kořenů**

Dalším předpokládaným účinkem GA na vývoj rostlin, je stimulace růstu kořenů. V případě nedostatku GA bývají kořeny postižených jedinců výrazně kratší než je tomu u wild type jedinců stejného druhu. Po cílené mutaci genů pro DELLA proteiny RGA a GAI se jejich délka obnovuje. Kořenový růst je podporován degradací právě těchto proteinů, přičemž degradace RGA je navíc podnícena i auxiny. Ethylen se v tomto případě projevuje jako inhibitor kořenového dloužení (Fleet and Sun, 2005).

#### **2.2.6.5. Vývoj listů a jejich morfogeneze**

GA jsou zapojeny i do vývoje listů a jejich morfogeneze. Udržování růstového apikálního meristému a iniciace listových primordií je primárně řízeno pomocí KNOTTED1 (KN1), což je homeoboxový (KNOX) transkripční faktor, a dále pak pomocí GA. U rostlin s jednoduchými listy, jako jsou třeba druhy *Arabidopsis* nebo tabák (*Nicotiana*), je exprese KNOX genů lokalizována v meristému, ve kterém je vyloučena exprese genů *GA20ox*. GA jsou místo toho akumulovány v listových primordiích těchto druhů, kde se také podílejí na podpoře růstu. Interakcí mezi KNOX geny a GA bývá postižen tvar listů. Dobrým příkladem je rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L), které se vyznačuje členitými listy. KNOX geny jsou zde exprimovány v meristémech stejně jako v listových primordiích. V těchto rostlinných orgánech je snižena hladina GA, což se projevuje vyšší členitostí listů. Overexpresí KNOX genů je v rostlinách tabáku, *Arabidopsis* a rajčat potlačena exprese genu *GA20ox*, což je důvodem tvorby laločnatých listů s ektopickým meristémem.

Overexprese KNOX genu *POTATO HOMEBOX1 (POTH1)* v bramborách se neprojevuje pouze potlačením exprese *GA20ox*, což je důvodem vzniku malých vrásčitých listů, ale také podporou tvorby hlíz. GA v tomto případě slouží jako inhibitory tvorby hlíz. Represí *GA20ox* se ukazuje, že regulace GA biosyntézy pomocí homeoboxových genů se nevztahuje pouze na listy (Fleet and Sun, 2005).

#### **2.2.6.6. Indukce kvetení**

Kvetení je důležitým mezníkem ve vývoji rostlin. Vegetativní fáze života rostliny se během tohoto procesu mění na fázi reprodukční. Indukce kvetení je nejdůležitější částí z hlediska reprodukční strategie a také z hlediska využití omezených zdrojů (Komeda, 2004).

To, že je rostlina připravena ke kvetení se dá rozpoznat již před samotnou tvorbou květů. Jedním z typických znaků je tvorba květního stonku. I když během tohoto procesu může dále docházet k vegetativnímu růstu rostliny, považuje se jeho vznik za náznak reprodukčního růstu. Přechod z vegetativního do reprodukčního stavu bývá doprovázen tvorbou květního meristému. U *Arabidopsis* se vegetativní meristém mění na meristém květenství a ten následně na meristém květní (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009).

Přechod do reprodukčního stavu rostlin je spojený s překonáním juvenilního stádia rostliny a tedy dospíváním. Tento proces je často spojován se změnami v morfologii listů, tvorbou povrchových struktur (trichomy) a rozvojem cévních svazků v listech. Přechod z juvenilního stádia je iniciovan pomocí GA a je ovlivňován pomocí *miRNA172* a květního integrátoru *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Davière et al., 2008). První zmiňovaný regulátor je zapojený v regulaci homeotických genů. Druhý pak přímo v přechodu do dospělého stádia rostliny (Chen, 2004; Lauter et al., 2005).

U některých druhů rostlin je pro přechod z juvenilního stádia nutné vystavení nižším teplotám. Tento proces se označuje jako vernalizace. Příkladem může být druh *Lolium perenne*, která se řadí mezi tzv. dlouhodobní rostliny. U těchto rostlin se dá urychlit nástup kvetení tím, že se uměle prodlouží doba po kterou jsou během dne vystaveny světlu. U zmiňovaného druhu je možno dosáhnout přechodu z juvenilního stadia i pokud nebyla vystavena dennímu světlu po dostatečně dlouhou dobu. Přechod je možné iniciovat aplikací GA, ale to pouze v případě, že rostlina byla vystavena vernalizaci. Vernalizace je zde pro přechod z juvenilního stádia nezbytná, pokud jí rostlina nebude vystavena, nebude fungovat ani aplikace GA ani dostatečné vystavení světlu (Macmillan et al., 2005).

Jak již bylo psáno výše, tvorba květů je spojena s přechodem vegetativního meristému v meristém květenství a následně květní meristém. Přechod z vegetativního meristému je spojen s expresí několika různých genů, která je regulována pomocí GA. Geny meristému květenství jsou *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* a *AGAMOUS Like 24 (AGL24)*. Tvorba květního meristému je pak umožněna díky expresi genů *LEAFY (LFY)* a *APETALA 1 (AP1)*, které jsou mimo jiné zodpovědné za potlačení aktivity genů meristému květenství (Liu et al., 2007). Exprese genů *SOC1* i *LFY* je podporována GA. Obě exprese jsou ovlivňovány přímo proteiny DELLA (GAI/RGA), nebo nepřímo skrze GAMYB (Achard et al., 2004; Gocal et al., 2001). Gen *LFY* je z hlediska kvetení podstatný pro propojení indukce kvetení pomocí GA a působení světla po delší časový úsek (viz. dlouhodobní rostliny). Gen *SOC1* je pak důležitý pro propojení působení GA, vernalizace a autonomní cesty kvetení (Fleet and Sun, 2005;

Moon et al., 2003). SOC1 ve spojení s AGL24 je také potřebný pro transkripci *LFY*. GA jsou také zapojeny v kontrole hladiny *LFY* pomocí proteinu DELLA, a to skrze regulaci *miRNA159*, kterou je negativně regulován *MYB33* (součást transkripčního faktoru GAMYB), jenž je potřeba pro transkripci *LFY*.

Aktivace genů *LFY* je nejvíce ovlivňována GA<sub>3</sub> a GA<sub>4</sub>. GA<sub>4</sub> je mimo jiné také hlavním biologicky aktivním GA v *Arabidopsis*, což je prokázáno faktem, že během přípravy na kvetení se jeho koncentrace ve stonkovém vrcholu podstatně zvyšuje (Srikanth and Schmid, 2011).

#### 2.2.6.7. Vývoj květu a pylu

Ačkoliv GA nejsou přímo potřebné pro diferenciaci či specializaci květních orgánů, jsou i tak důležité pro jejich správný vývoj, ba dokonce jsou pro tento proces přímo nepostradatelné (Griffiths et al., 2006). Rostliny *Arabidopsis* s mutací v GA dráze jsou často sterilní. Částečný deficit v této dráze se projevuje samčí sterilitou, která je způsobena abnormálním vývojem tyčinek a prašníků (Hu et al., 2008; Chhun et al., 2007) a extrémní deficit GA je pak důvodem sterility samičí (Goto and Pharis, 1999). Pro správný vývoj prašníků je třeba vyšší koncentrace GA, než pro vývoj pestíků, okvětních a kališních lístků. U jedinců s GA deficitem, či s chybou v signální dráze, se obvykle objevují kratší prašníky, než u jedinců bez deficitu. Kratší vzrůst je způsoben redukcí prodlužování buněk nitky v důsledku nedostatku GA (Cheng et al., 2004).

Kromě správného vývoje prašníků, jsou GA důležité pro tvorbu životaschopného pylu. U mutantů *Arabidopsis* s deficitem GA je pozastavena mikrosporogeneze (Cheng et al., 2004). Tvorba pylu je GA ovlivněna také přes výstelku prašných pouzder (tapetum), jejíž vývoj je u deficientních jedinců narušen. Předčasná degenerace výstelky bývá spojena právě se zastavením mikrosporogeneze. Tapetum je zcela zásadní pro správný vývoj pylu. Jeho prostřednictvím jsou vyživována pylová zrna, je součástí jejich obalu a v neposlední řadě se uplatňuje při dehescenci (pukání prašných vaků) (Goldberg et al., 1993). Dále je tapetum považováno za hlavní zdroj produkce GA během vývoje prašníků. V průběhu tohoto vývoje se zde ve vysoké míře exprimují biosyntetické geny, přičemž nejvyšší hodnoty exprese se dají naměřit těsně před dehescencí. Po jejím ukončení se míra exprese rapidně snižuje, ne však v samotných pylových zrnech. Tam je míra exprese stále vysoká (Hu et al., 2008). Expres biosyntetických genů se v prašnicích spouští až po ukončení meiozy, kdežto geny signální kaskády jsou exprimovány ještě před jejím zahájením (Chhun et al., 2007).

Vývoj květů a pylu u rostlin je ovlivněn degradací DELLA proteinů RGA, RGL1 a RGL2 (Cheng et al., 2004). GA ale nejsou zapojeny do samotné specifikace květních orgánů, ta je ovlivněna homeotickými geny. Expresí těchto genů je podnícena pomocí genu *LFY* (Yu et al., 2004). Nicméně, expresí homeotického genu *AGAMOUS* (*AG*), který je důležitý pro tvorbu tyčinek a pestíku, se spouští exprese GA-biosyntetického genu *AtGA3ox1* v květním meristému (Gómez-Mena et al., 2005). V pozdějších stádiích vývoje se pomocí GA spouští exprese genů *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) a *AG*.

Bližší studií vlivu RGA na vývoj květů u *Arabidopsis* bylo zjištěno, že stejné množství genů je up i down regulováno pomocí tohoto DELLA proteinu. Velké množství RGA-regulovaných genů je exprimováno v tyčinkách a část těchto genů je mimo jiné regulována kyselinou jasmonovou, která je potřebná pro správný vývoj prašníků a dozrávání pylu. (Hou et al., 2008).

Do vývoje pylu je zapojen i transkripční faktor *GAMYB*. V primordiích tyčinek, a pak také ve výstelce prašných pouzder, je vysoce exprimován gen *OsGAMYB*. Výsledkem mutace vedoucí ke ztrátě *OsGAMYB* jsou vady v prašnících a premeiotickém vývoji pylu (Fleet and Sun, 2005).

#### **2.2.6.8. Tvorba plodu a partenokarpie**

GA se do vývoje plodů zapojují primárně až po úspěšném opylení. Jejich umělou aplikací je však možné iniciovat tvorbu plodů i bez něj, takto vzniklé plody jsou ale partenokarpní a tedy bez semen.

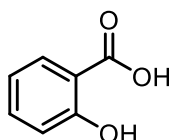
Výsledkem exogenní aplikace GA na zrající ovoce je jeho poměrně velký vzrůst a prodloužení stopky, což se ukázalo jako dobrá obrana proti napadení houbovou infekcí, která je zvláště problematická při těsném kontaktu jednotlivých plodů (například u révy vinné).

#### **2.2.6.9. Vývin semen**

Zajímavým jevem, vyskytujícím se u mutantů s nedostatečnou tvorbou GA či případně u transgenních rostlin se zvýšenou inaktivací GA, jsou neplodná, neboli hluchá, semena. Tento jev by ve velmi mladých semenech mohl být způsobený nízkou koncentrací biologicky aktivních GA. Exogenní aplikace je v tomto případě neúčinná, aplikovaný GA se totiž nedostává dovnitř semen. Nedostatečné tvorby GA se dá zbavit opakovanou mutací genů GA signální dráhy (Swain and Singh, 2005)

### 2.3. Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) patří k jednomu z nejjednodušších rostlinných hormonů (Obrázek 14). Její primární funkcí v rostlinném organismu je endogenní signalizace. Konkrétně SA hraje nezanedbatelnou roli při obraně organismu proti patogenům a škůdcům. Další funkcí SA v některých rostlinných organismech je fyziologická modifikace těchto rostlin a reprodukční vývoj (Raskin et al., 1995).



kyselina salicylová (SA)

**Obrázek 14:** Kyselina salicylová (SA)

Z pohledu lidského pokolení je SA využívanou látkou již od počátku věků. Tím, že se hojně vyskytuje v kůře vrby (*Salix* ssp.), nebylo pro naše prapředky těžké zjistit její blahodárné účinky na lidský organismus – schopnost snižovat horečku (antipyretické vlastnosti) a bolest (analgetikum). Je tedy až s podivem, že nám zabralo více jak 3000 let (první doložené užívání kyseliny salicylové) než jsme zjistily, že pouhou acetylací volné hydroxy skupiny prudce zvýšíme farmakodostupnost této kyseliny (výroba Aspirinu®, Bayer 1895).

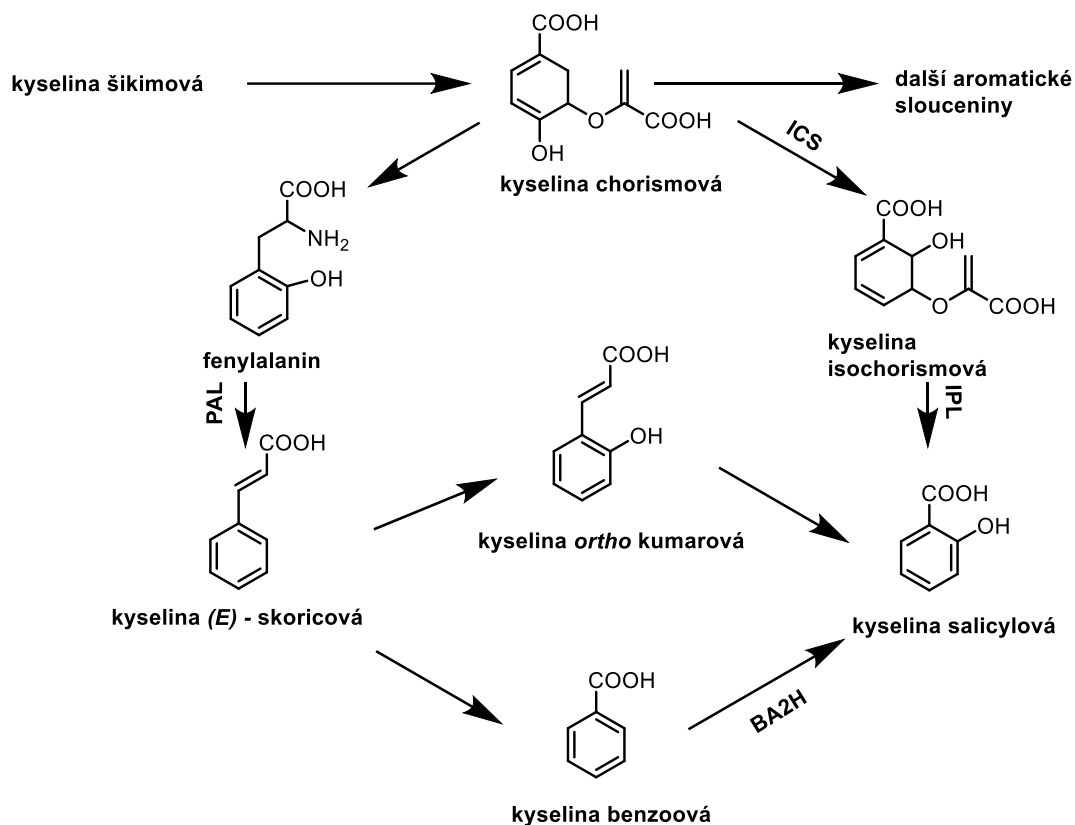
#### 2.3.1. Biosyntéza kyseliny salicylové

V rostlinách je SA biosyntetizována několika různými cestami (Obrázek 15). Syntéza vždy začíná u kyseliny šikimové, která je transformována na kyselinu chorismovou, což je obecný prekurzor pro aromatické sloučeniny a to včetně esenciálních aromatických aminokyselin.

V jedné z možných biosyntéz SA se kyselina chorismová přetvoří na fenylalanin, a ten je následně pomocí PAL (fenylalanin amoniak-lyázy) transformován na kyselinu (*E*)-skořicovou. Z kyseliny skořicové se mohou vytvořit hned dva SA prekurzory, kyselina *ortho*-kumarová a kyselina benzoová. Kyselina benzoová je následně převedena na kyselinu salicylovou pomocí enzymu BA2H (kyselina benzoová 2-hydroláza).

Druhá biosyntetická možnost vedoucí k syntéze SA je transformace kyseliny chorismové na kyselinu isochorismovou s využitím enzymu ICS (isochorismát syntázy). Kyselina isochorismová je následně převedena na kyselinu salicylovou pomocí enzymu IPL (isochorismát pyruvát lyázy). Geny spojené s tvorbou enzymu ICS se nachází u různých rostlinných druhů, a to ve velkém množství. Z tohoto důvodu se dá předpokládat, že je tato

biosyntetická dráha tou hlavní biosyntetickou drahou využívanou rostlinami při biosyntéze SA (Wildermuth et al., 2001).



**Obrázek 15:** Biosyntéza kyseliny salicylové (BA2H = kyselina benzoová 2-hydroláza. ICS = isochromismát synthasa, IPL = isochromát pyruvát lyáza, PAL = fenylalanin amoniak lyáza)

### 2.3.2. SA v obraně proti patogenům

V minulém století bylo zjištěno, že vystavení rostliny určitému patogenu může vést ke tvorbě resistance vůči sekundární infekci. Roku 1960 se prokázalo, že rostlina tabáku nakažená tabákovým mozaikovým virem (TMV) vykazuje jak lokální, tak i systémovou resistenci vůči sekundárnímu nakažení pomocí TMV. Schopnost rezistentní odpovědi celé rostliny se nazývá systémově získaná resistance (Systemic Acquired Resistance – SAR). SAR byla pozorována i v listech tabáku, které byly místu primárního výskytu viru poměrně vzdálené (Ryals et al., 1994).

Pakliže je rostlina vystavena jednomu patogenu z velké rodiny různých patogenů, dochází k aktivaci SAR. Je zajímavé, že následná rezistentní odpověď organismu bude efektivní i vůči všem ostatním patogenům, jako jsou bakterie, viry, houby i oomyceta (Ryals et al., 1996). Tato resistance je spojena s produkcí Pathogenesis-Related (PR) proteinů, a geny kódující syntézu těchto proteinů jsou nejvíce indukovány pomocí SA. Klíčem globální

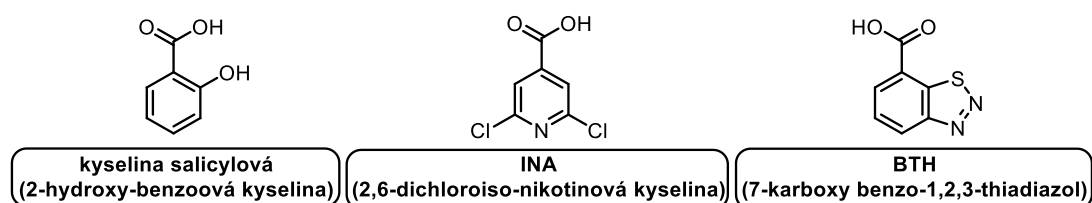
rezistence rostliny se tak tedy stává kaskáda iniciací syntézy různých PR proteinů a tato odpověď rostlinného organismu se nazývá SAR.

Roku 1979 bylo zjištěno, že stejné PR proteiny jako ty indukované pomocí TMV, mohou být indukovány aplikací SA. Pomocí aplikace SA se tak dá napodobit napadení rostliny virem TMV, což se projeví hromaděním produktů *PR* genů shodných s těmi, které se hromadí v případě napadení reálným patogenem (Ryals et al., 1996).

Další experimenty prokázaly, že SA je pro aktivaci SAR velmi důležitá. U Rostlin, které jsou deficientní při tvorbě SA k aktivaci SAR nedochází. U takto postižené rostliny se naopak objevuje zvýšená citlivost vůči virulentním patogenům. SA je tedy pro obranu rostlin klíčová.

### 2.3.3. Syntetické analogy SA aktivující SAR

Schopnost SAR rozvíjet rostlinnou rezistenci vůči velkému množství různých patogenů je velice atraktivní z pohledu zemědělství. Bohužel čistá SA není vhodným kandidátem pro svou fytotoxicitu a také kvůli nevhodnému profilu k využití v polních podmínkách. Jako vhodné náhražky se ukázaly dvě látky označované jako *INA* (2,6-dichloroiso-nikotinová kyselina) a *BTH* (7-karboxy benzo-1,2,3-thiadiazol). S využitím těchto dvou strukturních analogů SA dochází k indukci SAR a zároveň je získáno podobné spektrum rezistence proti patogenům jako při použití SA. Navíc tyto dvě látky nejsou toxické vůči mikroorganismům (Kessman et al., 1994).



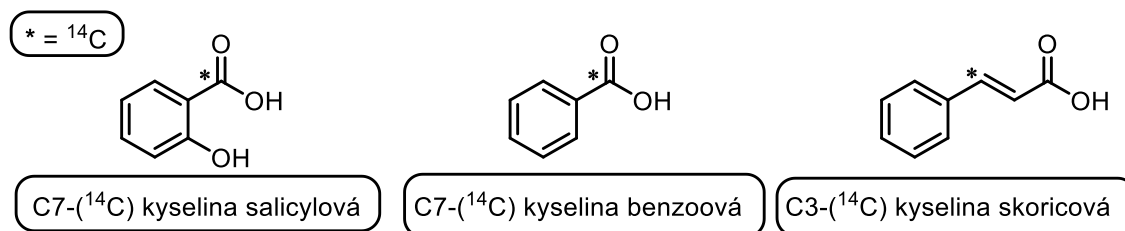
**Obrázek 16:** Struktura kyseliny salicylové a jejích funkčních analog

Obě tyto látky (Obrázek 16) mají podobnou strukturu jako SA, která se skládá z planárního aromatického kruhu s karboxylovou skupinou. Na základě této analogie si lze představit, že všechny tyto látky jsou schopné interakce se společným receptorem.

### 2.3.4. Identifikace SA receptoru

K identifikaci potenciálního receptoru SA bylo využito radioznačené kyseliny salicylové a jejích biosyntetických prekurzorů (Obrázek 17). Pomocí této metody se povedlo v rostlině tabáku najít hned několik proteinů vázajících SA (SABPs – Salicyl acid binding proteins),

lišících se jak svými vlastnostmi tak i strukturou. Nejlépe popsané jsou zatím pouze dva - SABP1 a SABP2.



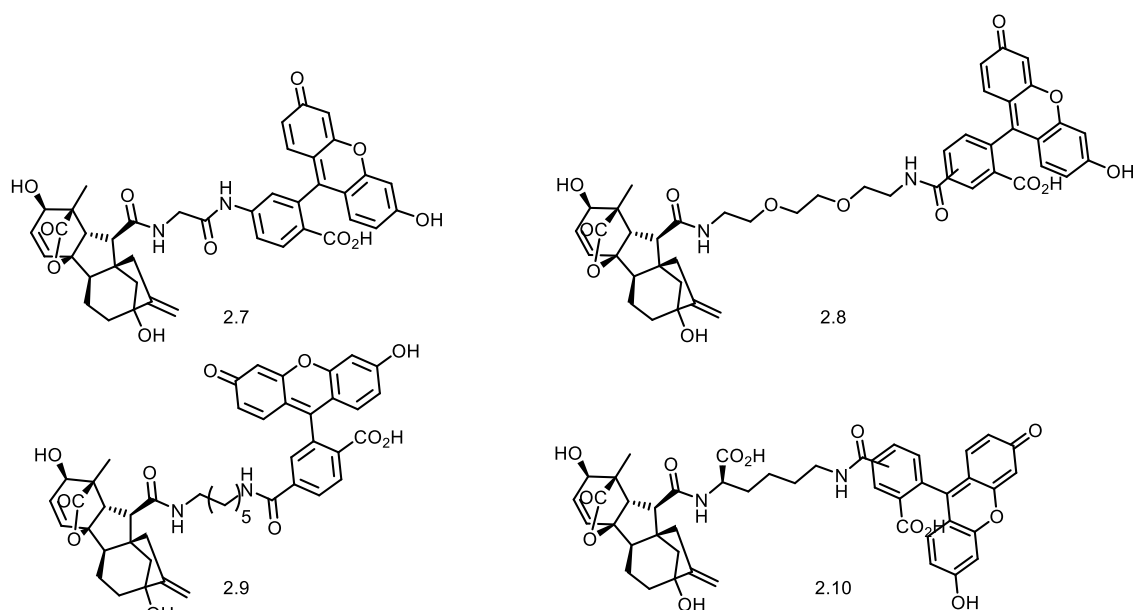
**Obrázek 17:**  ${}^{14}\text{C}$  značená kyselina salicylová a její biosyntetické prekurzory využitě k identifikaci SA receptoru

Při bližším prozkoumání se ukázalo, že SABP1 je enzym s katalázovou aktivitou. Tedy, že SA po svém navázání snižuje jeho aktivitu. Toto se následně projevuje nahromaděním  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který je také signální molekulou aktivující SAR (Chen et al., 1991). Tato hypotéza, i když hojně diskutována byla nedávno podrobně prozkoumána, a jako taková vyloučena kvůli relativně nízké afinitě tohoto enzymu k SA (Hunt et al., 1996).

Druhým možným a zároveň popsaným vazebným proteinem pro SA, je protein SABP2. Tento protein po navázání SA vykazoval značnou lipázovou aktivitu. To, že je tento enzym zapojen do rostlinné obrany dokazuje fakt, že u rostlin tabáku s umlčeným genem kódující tento protein dochází ke zvýšení citlivosti rostliny vůči TMV a zároveň tyto rostliny nejsou schopny aktivovat SAR (Kumar et al., 2003).

## 2.4. Značené rostlinné hormony

Hlavním důvodem pro syntézu značených rostlinných hormonů je touha znát způsob jejich transportu v tělech rostlin. V současné době je známý pouze způsob transportu auxinů. Transport ostatních rostlinných hormonů je stále neznámý. Roku 2013 byly připraveny čtyři fluorescenčně značené deriváty biologicky aktivních GA (Obrázek 18). Tyto značené molekuly byly použity pro výzkum distribuce GA v kořenovém systému *Arabidopsis*.



**Obrázek 18:** Fluorescenčně značené deriváty GA<sub>3</sub> (Shani et al., 2013)

Jednotlivé deriváty byly aplikovány na šest dní staré sazeničky *Arabidopsis* skrze růstové médium na bázi agaru. Připravené deriváty byly aplikovány po dobu dvou hodin. Přestože takto byly testované látky aplikovány na celý povrch kořenů, byla při následné detekci nejvyšší koncentrace značeného GA<sub>3</sub> nalezena v endodermálních buňkách prodlužovací zóny kořene. V Meristematické a diferenciační zóně kořene pak byla lokalizována pouze velmi nízká koncentrace značeného derivátu. Bližší analýzou bylo zjištěno, že hromadění značených molekul v endodermálních buňkách je lokalizováno ve vakuolách a v menším rozsahu také v jádře. Značený derivát GA<sub>4</sub> byl v kořenovém systému distribuován obdobně jako GA<sub>3</sub>, ale na rozdíl od něj, byl dvě hodiny po aplikaci také detekován ve stélé. Dále pak byla jeho akumulace vyšší v endodermálních buňkách hlavního kořene než v kořenech postranních. Značené deriváty aplikované po delší časový úsek se akumulovaly v tranzitních oblastech mezi prodlužovací a meristematickou zónou. V případě použití značeného derivátu GA<sub>4</sub> byla také nalezena velmi malá koncentrace v primární kůře meristému (Shani et al., 2013).

#### 2.4.1. Značení signálních molekul

Signální molekuly je možné značit pomocí dvou různých způsobů. Prvním způsobem je značení pomocí radioaktivních izotopů a druhým způsobem pomocí fluorescenčně vázané sondy. Experimenty s radioaktivně značenými GA se prokázalo, že se tyto hormony v tělech rostlin k pohybují. O samotném mechanismu transportu či o mechanismu distribuce GA je zatím známo jen málo (Shani et al., 2013).

O objasnění toho mechanismu se pokusil Dr. Eilon Shani roku 2013. Pro tento experiment byly použity fluorescenčně značené biologicky aktivní deriváty GA. Fluorescenční sonda byla navázána přes amidovou formaci na uhlík C-6 (Shani et al., 2013). Karboxylová skupina v této pozici by však podle doposud zjištěných informací měla být esenciální pro biologickou aktivitu GA.

#### **2.4.2. Využití značených signálních molekul**

Značené signální molekuly se využívají pro zjištění zda-li, případně jakým mechanismem, se transportují v tělech organismů. Dá se tak též zjistit, jestli se zkoumané látky hromadí v některé konkrétní tkáni či pletivu.

#### **2.4.3. Typy značek – Fluorescenční vs. Radioznačené molekuly**

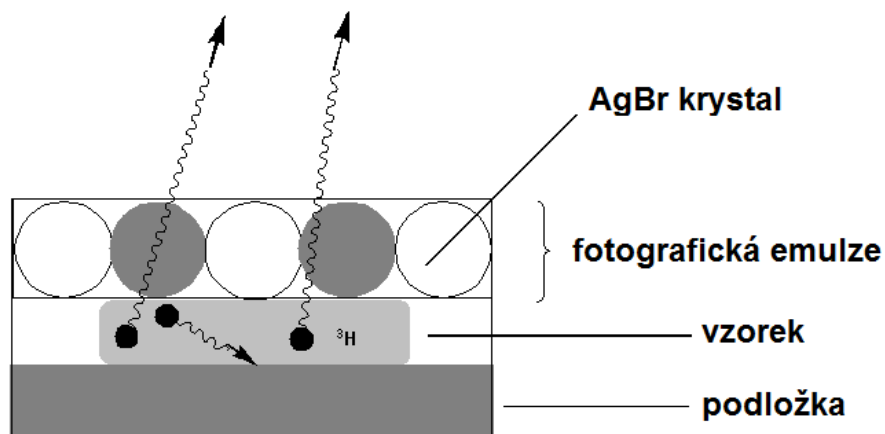
V této podkapitole budou stručně popsány obecné způsoby značení signálních molekul, jejich následná detekce a konkrétní použití na GA. Budou zde zmíněny oba způsoby značení, radioaktivní i fluorescenční.

##### **2.4.3.1. Radioaktivní značení**

Radioaktivní značení signálních molekul se provádí pomocí radioaktivních izotopů. Mezi používané izotopy se řadí například izotop vodíku  $^3\text{H}$  nebo izotop uhlíku  $^{14}\text{C}$ . Značení GA tritiem bylo využito například při zkoumání receptorových genů *AtGID1* pro receptor GID1. Při výzkumu těchto genů se používal derivát GA<sub>4</sub>, 16,17-Dihydro-GA<sub>4</sub> (Nakajima et al., 2006). V praxi je dostačující, pokud je na sledované molekule přítomen alespoň jeden radioizotop. Důležité je, aby použitým radioizotopem nebyly ovlivněny vlastnosti sledované látky, jako jsou například chemické vlastnosti či biologická aktivita enzymu, homornu nebo jakékoliv jiné sledované látky (Internetový zdroj 3).

##### **2.4.3.2. Detekce radioaktivně značených molekul**

Při detekci značených látek se využívá snadno detekovatelných částic, které jsou emitovány radioizotopy. Emitované částice je poměrně snadné sledovat ve zkoumaných tkáních nebo tkáňových extraktech. Nejčastěji využívanou metodou detekce je tzv. autoradiografie. V této metodě se radioaktivně značené buňky, nebo buněčné části, překryjí fotografickou emulzí, která je citlivá na radiaci. V této emulzi jsou obsaženy částice stříbra, jejichž distribuce je stejná jako distribuce radioaktivního materiálu ve vzorku. Autoradiografické studie jsou klíčové pro určení intracelulární lokalizace místa syntézy. Dalším využitím je sledování pohybu značených molekul.



**Obrázek 19:** Autoradiografie – radioaktivní fotografická emulze obsahujících stříbrné soli ( $\text{AgBr}$ ) je umístěna na tritiem značené buňky, které jsou přichycené na vrstvě skla (v případě světelné mikroskopie) nebo na mřížku potaženou vrstvou uhlíku. Oblastí buňky, které obsahují značené molekuly, jsou emitovány radioaktivní částice. Ty jsou pak vychytávány stříbrem obsaženým v emulzi. Ve chvíli, kdy se vyvolává fotografické emulze, se místa, kde se nachází stříbro, zabarví do černa – v případě světelné mikroskopie. Pokud je využívána elektronová mikroskopie, jeví se místa emitující záření jako malá vlnitá vlákna (převzato z Internetového zdroje 3)



**Obrázek 20:** Zařízení pro autoradiografii Storm 820 Phosphor Imager (převzato z internetového zdroje 4)

#### 2.4.3.3. Radioaktivně značené GA

Radioaktivně značené deriváty GA byly využity pro studium enzymů biosyntézy GA<sub>1</sub> v rostlině hrachu setého (*Pisum sativum*). Pomocí této studie bylo zjištěno, že jednotlivé enzymy zapojené do biosyntézy jsou prostorově oddělené. Dále bylo zjištěno, že apikální vrcholy zřejmě nejsou zapojeny v produkci GA<sub>1</sub> či jeho nejbližších prekurzorů. Přestože se v době provedení tohoto pokusu ještě mnoho nevědělo o účincích GA v ostatních orgánech, byla přítomnost radioaktivně značených GA v dalších místech jasným důkazem existence pohybu GA v rostlinách. Pro tento pokus bylo využito derivátů [17-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>1</sub> a [17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub> (Smith, 1992).

#### 2.4.4. Fluorescenční značení

Fluorescenční značení se na rozdíl od radioaktivního značení provádí tak, že se sledovaná molekula označí pomocí fluorescenční sondy. Fluorescenční sonda je látka, kterou je po ozáření světlem o konkrétní vlnové délce emitováno záření o jiné vlnové délce. Jedná se o typ luminiscence, při kterém je záření emitováno pouze krátký časový úsek po ozáření. Sledovaná molekula se fluorescenčně značí přes krátký řetězec atomů, tzv. linker. Délka zvoleného linkeru je důležitá pro její vliv na biologickou aktivitu sledované látky. V případě pozorování biologicky aktivní látky je nutné, aby navázanou fluorescenční sondou nebyla narušena biologická aktivita této látky. Velkou výhodou oproti radioaktivnímu značení je možnost sledování molekul v reálném čase

##### 2.4.4.1. Detekce fluorescenčně značených molekul

Detekce fluorescenčně značených derivátů se provádí například pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie. Touto metodou je možné vizualizovat specifické proteiny v živých i fixovaných buňkách. Excitace fluorescenčně značených molekul se provádí ozářením pomocí světla o vlnové délce 494 nm. Vlnová délka vyzářené emise je 521 nm.

##### 2.4.4.2. Fluorescenčně značené GA

V roce 2013 byly připraveny a otestovány čtyři fluorescenčně značené deriváty GA<sub>3</sub> (Obrázek 18). Syntetizované látky se lišily hlavně v délce linkeru, přes který byla ke GA<sub>3</sub> připojena fluorescenční sonda. I přesto, že sonda byla navázána přes karboxylovou skupinu na uhlíku C6, byla údajně zachována biologická aktivita vzorku. Po úspěchu s tímto derivátem byl stejným způsobem připraven derivát GA<sub>4</sub> (Shani et al., 2013).

#### 2.4.5. Biologická aktivita fluorescenčně značených derivátů giberelinů

Deriváty zmiňované v předchozí podkapitole byly testovány ohledně jejich biologické aktivity. Pro testování byla použita mutantní rostlina *Arabidopsis*, *ga1*, jejíž semena se vyznačovala nízkou klíčivostí. Po exogenní aplikaci derivátu GA<sub>3</sub>, došlo k obnově klíčení. Efektivita derivátů GA<sub>3</sub> (Obrázek 18) **2.7** a **2.10** byla na klíčení semen *ga1* malá, oproti tomu efektivita druhých dvou derivátů **2.8** a **2.9** byla podstatně vyšší. Aplikací samotného fluoresceinu nebylo dosaženo žádného efektu.

Na čtyř denní sazenice wild type *Arabidopsis* bylo působeno pomocí paclobutrazolu, čímž došlo k zastavení biosyntézy GA. Paclobutrazol je inhibitorem cytochromu P450 dependentní monooxygenasy, katalyzující oxidační syntézu ent-kaurenové kyseliny z ent-kaurenu (Rademacher, 2000). Aplikací paclobutrazolu je tedy inhibovaná biosyntéza již v jednom ze základních kroků. Na takto ovlivněné rostliny se následně aplikovaly 4 deriváty GA z předchozího příkladu. Výsledek byl podobný, jako u obnovy klíčení semen. Molekuly **2.7** a **2.10** se projevily jen malým efektem, zatímco při aplikaci **2.8** a **2.9** se částečně obnovila elongace hypokotylu a zcela i elongace kořene. Těmito údaji se potvrdilo, že GA<sub>3</sub> může být označen fluoresceinem a zároveň bude zachována jeho biologická aktivita.

Obdobně byl testován i stejně značený derivát GA<sub>4</sub>. Při testech byla značeným derivátem vykazována srovnatelná aktivita s neznačeným GA<sub>4</sub>. Fluorescenční značení je tedy možné s úspěchem aplikovat i na ostatní deriváty GA. (Shani, 2013).

#### 2.5. Shrnutí

Teoretická část byla zaměřena na shrnutí dosavadních znalostí o fytohormonech giberelinech. Tato část měla dva hlavní úkoly. Prvním z nich bylo pokrytí znalostí týkajících se historie, struktury, biosyntézy, deaktivace, mechanismu účinku a fyziologického působení GA v tělech rostlin. Druhým úkolem bylo poskytnutí informací o možnostech značení a následného využití těchto molekul. V první části práce bylo zmíněno, že v současné době jsou známy celkem 4 biologicky aktivní GA (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub>), přičemž veškeré jsou syntetizovány z geranylgeranyl difosfátu přes ent-kauren a kyselinu ent-kaureonovou. Dále byly zmíněny způsoby deaktivace GA a jejich mechanismus účinku skrze degradaci proteinu DELLA v návaznosti na fyziologické účinky těchto hormonů na růst a vývoj rostlin. V neposlední řadě byly popsány možnosti a využití radioaktivního značení GA pomocí izotopu vodíku <sup>3</sup>H a uhlíku <sup>14</sup>C. Nakonec bylo zmíněno značení GA pomocí fluoresceinu a následné využití značených derivátů k výzkumu pohybu a akumulace těchto molekul v rámci rostlin.

### 3. Experimentální část

V této části se nachází přehled použitých chemických látek využitých při syntéze, přehled využitých metod použitých v rámci fyziko-chemické analýzy produktů reakcí, přehled metod využitých při sledování chemických reakcí, detailní optimalizované syntetické postupy stejně jako charakterizované izolované látky. Přehled všech dosažených výsledků se nalézá v kapitole 4. Diskuze výsledků v kontextu výzkumného projektu se nalézá v kapitole 5.

#### 3.1. Chemikálie

Pro jednotlivé kroky byly použity tyto chemikálie: 2,5-Dihydroxybenzoová kyselina, metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), kyselina chlorovodíková ( $\text{HCl}$ ), kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 1,4-dibrombutan, 1,5-dibrompentan, 1,6-dibromhexan, uhličitan draselný ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), aceton, ftalimid draselný, methylester kyseliny salicylové, jodid sodný ( $\text{NaI}$ ), tetrabutylamonium bromid (TBABr), ledová kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), dichlormethan (DCM), dimethylformamid (DMF), di-*tert*-butyl dikarbonát ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ), 1,6-diaminohexan, chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), fluorescein isothiokyanát, *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 6-karboxyfluorescein, 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium3-oxid hexafluorofosfát (HATU), hydroxid lithný monohydrát ( $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ). Veškeré látky byly, pakliže není uvedeno jinak, použity ve stejné čistotě, v jaké byly dodány. 1 M vodný roztok  $\text{HCl}$  a nasycený vodný roztok  $\text{NaCl}$  byly připraveny technickým personálem Laboratoře růstových regulátorů (LRR).

##### 3.1.1. Vizualizační roztoky pro TLC

Metody přípravy:

- (a) *Zásaditý roztok  $\text{KMnO}_4$*  byl připraven rozpuštěním 9 g  $\text{KMnO}_4$  a 20 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ve 150 ml 10%  $\text{NaOH}$
- (b) *Vanilinový roztok* byl připraven rozpuštěním 2 g vanilinu ve 100 ml ethanolu obsahující 1ml koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- (c) *Hannesianův vizualizační roztok* byl připraven rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové v 250 ml ethanolu.

#### 3.2. Metody

Veškeré reakce byly prováděny, pakliže není uvedeno jinak, v bezvodém prostředí. Aparatury byly žíhány plamenem pod neustálým pozitivním tlakem inertního plynu (argon). Veškerá rozpouštědla použitá pro reakce byla, pakliže není uvedeno jinak, zbavena přítomné

vlhkosti pomocí standartních postupů, a to následovně: THF bylo destilováno z kovového sodíku s využitím ketylového radikálu jako indikátoru,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  byl destilován z  $\text{CaH}_2$ , bezvodý  $\text{CH}_3\text{OH}$ , DMF a aceton byly připraveny technickým personálem Laboratoře růstových regulátorů dle standardizovaných postupů.

Pro sloupcovou chromatografii (CC) bylo využito silikagelu jako stacionární fáze a směsi petrolether (P.E.) : EtOAc (V/V), pokud není uvedeno jinak, jako mobilní fáze. Při dělení sloupcovou chromatografií bylo použito postupného gradientu, kdy polárnější frakce mobilní fáze byla skokově přidávána do mobilní fáze (například dle následujícího postupu: PE:EtOAc=20:1->10:1->4:1->2:1. Eluované frakce byly jímány po 5 - 30 mL frakcích a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce obsahující stejný produkt byly spojeny a následně odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

K měření NMR spekter byl použit spektrometr JEOL 500 JNM-ECA 500 MHz pracující při frekvenci 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 126 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly rozpuštěny a následně měřeny v jednom z následujících rozpouštědel: aceton- $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$  anebo DMSO- $d_6$ . Chemické posuny zbytkového signálu nedeuterovaného, resp. ne zcela deuterovaného rozpouštědla sloužily ke kalibraci měřených  $^1\text{H}$  NMR spekter. Chemické posuny zbytkových nedeuterovaných resp. částečně nedeuterovaných rozpouštědel v daném rozpouštědle jsou následující: aceton- $d_6$  (2,17 ppm);  $\text{CDCl}_3$  (7,27 ppm), DMSO- $d_6$  (2,52 ppm) (Gotlieb *et al.* 1997). Ve spektrech  $^{13}\text{C}$  bylo využito ke kalibraci charakteristického signálu atomu  $^{13}\text{C}$  substituovaného atomy vodíku  $^2\text{H}$ . Chemické posuny jsou následující: aceton- $d_6$  (29,84 ppm, prostřední signál);  $\text{CDCl}_3$  (77,23 ppm, prostřední signál), DMSO- $d_6$  (39,52 ppm, prostřední signál). Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (viz výše). Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO). Elementární analýzy byly provedeny na přístroji EA1112 Flash analyser (Thermo-Finnigan). Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelu. Pro tento typ operace byly použity aluminiové desky pokryté silikagelem 60 SIL G/UV<sub>254</sub> s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel nebo Sigma-Aldrich). Jednotlivé sloučeniny přítomné v reakční směsi byli dále vizualizovány pomocí vizualizačních roztoků jejichž příprava je popsána v kapitole 3.1.1. Teploty tání byly měřeny na přístroji SMP 30 (Stuart®) a nejsou korigovány.

### 3.3. Organická syntéza

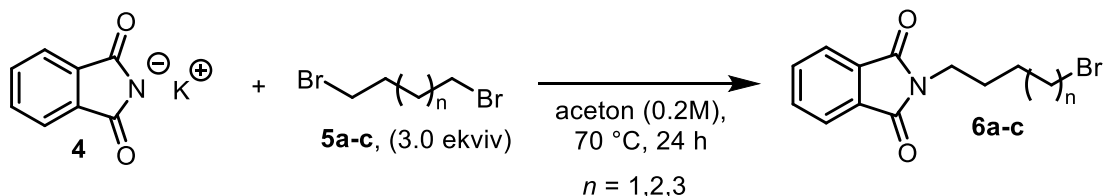
#### 3.3.1. Methyl 2,5-dihydroxybenzoát (3)



Roztok kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové **2** (3 g, 19,5 mmol, 1.0 ekviv) byl rozpuštěn v MeOH (50 mL, 0.39M vůči **2**) a výsledná směs byla ochlazená na 0 °C. Acetylchlorid (2.78 mL, 39 mmol, 2.0 ekviv) byl pomalu přikapán a výsledná směs byla následně míchána při 0 °C po dobu 30 minut (chladicí lázeň odebrána) a při RT po dobu 48 h. Celý roztok byl následně odpařen na RVO a výsledný surový produkt (3.0g; 99%) byl ve formě bílé krystalické látky skladován při -5 °C pro další použití.

Produkt **3**: b.t. 81-83 °C; bílá krystalická látka; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.36 (s, 1H), 7.28 (dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.98 (s, 1H), 3.94 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 170.2, 155.7, 147.7, 124.1, 118.5, 114.8, 112.2, 52.4; MS (ESI<sup>+</sup>; *m/z*; %): 169 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3.3.2. Příprava monoftalimid bromidů 6a-c



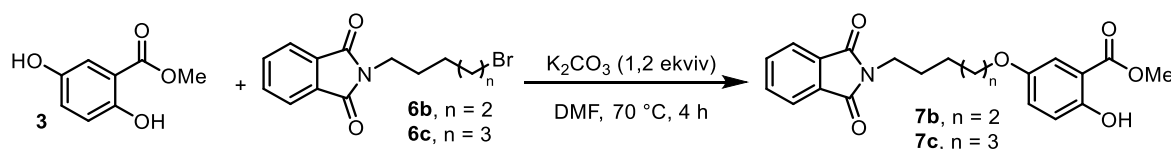
**Obecný postup:** K roztoku 1,4-dibromalkanu (**5a-c**) (90,3 mmol; 3,0 ekviv) v acetonu (500 ml; 0,2 M vůči **4**) byl za stálého míchání přidán ftalimid draselný (**4**) (10 g; 30,1 mmol; 1,0 ekviv). Výsledná směs byla ponechána v lázni o teplotě 70 °C za stálého míchání refluxovat po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce byla směs ochlazená na laboratorní teplotu a zfiltrována za sníženého tlaku. Filtrát byl zakonzentrován na RVO a odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; P.E.:EtOAc = 20:1->10:1->4:1).

2-(4-bromobutyl)isoindoline-1,3-dione (**6a**): bílá krystalická látka (8.6g; 86%); b.t. 78-80 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 7.85 (dd, *J*=5.4, 3.1 Hz, 2H), 7.73 (dd, *J*=5.4, 3.0 Hz, 2H), 3.73 (t, *J*=6.7 Hz, 2H), 3.45 (t, *J*=6.4 Hz, 2H), 1.89 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 168.5, 134.1, 132.2, 123.4, 37.1, 32.9, 30.0, 27.4; MS (ESI<sup>+</sup>; *m/z*; %): 282 (100) [M]<sup>+</sup>, 284 (95) [M+2]<sup>+</sup>; Elementární analýza vypočítaná pro C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>2</sub> (282): N, 4.96; C, 51.09; H, 4.29; nalezeno: N, 4.97; C, 51.07; H, 4.31.

2-(5-bromopentyl)isoindoline-1,3-dione (**6b**): bílá krystalická látka (8.5 g; 85 %); b.t. 77-79 °C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.82 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 3.68 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 3.38 (t, 2H,  $J = 7$  Hz), 1.88 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.46 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 168.31, 133.86, 132.01, 123.13, 37.56, 33.34, 32.11, 27.65, 25.31; MS ( $\text{ESI}^+$ ;  $m/z$ ; %): 292 (100)  $[\text{M}]^+$ , 294 (96)  $[\text{M}+2]^+$ .

2-(6-bromohexyl)isoindoline-1,3-dione (**6c**): bílá krystalická látka (8.6g; 90 %); b.t. 57-59 °C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.86-7.83 (m, 2H), 7.73-7.70 (m, 2H), 3.69 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 3.40 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 1.88-1.61 (m, 4H), 1.49 - 1.37 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 168.42, 133.87, 132.10, 123.17, 37.81, 33.70, 32.58, 28.40, 27.69, 26.00.; MS ( $\text{ESI}^+$ ;  $m/z$ ; %): 310 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 312 (97)  $[\text{M}+2]^+$ ; Elementární analýza vypočítaná pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrNO}_2$ : N, 4.52; C, 54.21; H, 5.20; nalezeno: N, 4.56; C, 54.19; H, 5.23.

### 3.3.3. Substituční reakce mezi fenolem **3** a alkylbromidem **6**

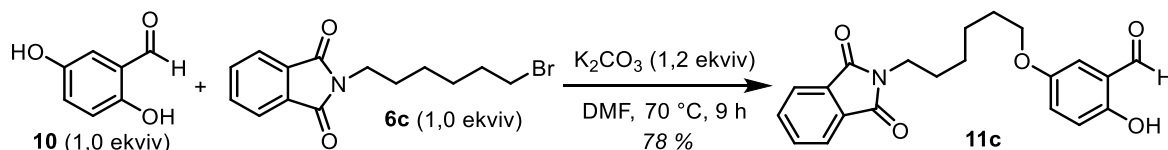


**Obecný postup:** Roztok methyl esteru **3** (500 mg; 3,62 mmol; 1,0 ekviv) a  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (600 mg; 4.3 mmol; 1,2 ekviv) v DMF (36 ml; 0,1 M vůči **3**) byl míchán po dobu 10-ti minut při l.t. Bromoalkyl ftalimid **6** (3,62 mmol; 1,0 ekviv) byl přidán do roztoku a výsledná reakční směs byla umístěna ve vyhřáté olejové lázni o teplotě 75 °C (vnitřní teplota roztoku se pohybovala v průběhu reakce v rozpětí 69-71 °C). Výsledný roztok byl míchán při této teplotě po dobu 4 hodin. Poté byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu a extrahována pomocí EtOAc (3x75 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty pomocí solanky (50 ml), vysušeny nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařeny na RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; P.E.:EtOAc = 20:1->10:1->4:1).

Methyl 5-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)pentyl)oxy)-2-hydroxybenzoát (**7b**): bílá krystalická látka (693 mg, 50 %); b.t. 155-157 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 9.55 (s, 1H), 7.80 (dd,  $J = 5.5, 3.5$  Hz, 2H), 7.57 (dd,  $J = 5.5, 3.5$  Hz, 2H), 7.22 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 6.87 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.90 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.36 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.70 (p,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.61 (p,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.33 (p,  $J = 7.8$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 169.79, 168.93, 153.76, 151.83, 132.21, 132.04, 125.48, 121.67, 116.93, 116.13, 111.31, 69.64, 52.08, 39.64, 28.76, 28.71, 24.31; MS ( $\text{ESI}^+$ ;  $m/z$ ; %): 384 (68)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Methyl 5-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)hexyl)oxy)-2-hydroxybenzoát (**7c**): bílá krystalická látka (9 mg, 65 %); b.t. 172-173 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.89 (s, 1H), 7.82 – 7.78 (m, 2H), 7.57 (dd,  $J = 5.5, 3.5$  Hz, 2H), 7.17 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 6.86 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.97 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.39 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.79 – 1.72 (m, 2H), 1.72 – 1.62 (m, 2H), 1.47 – 1.31 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 169.79, 168.93, 153.76, 151.83, 132.21, 132.04, 125.48, 121.67, 116.93, 116.13, 111.31, 69.64, 52.08, 39.64, 28.76, 28.71, 27.55, 26.49; MS ( $\text{ESI}^+$ ;  $m/z$ ; %): 398 (82)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

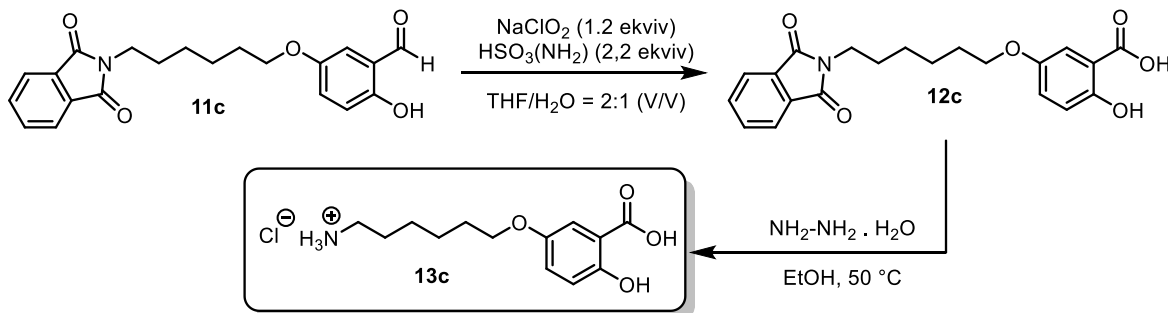
### 3.3.4. 5-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)hexyl)oxy)-2-hydroxybenzaldehyde (**11c**)



Do roztoku aldehydu **10** (500 mg, 3,62 mmol, 1.0 ekviv) v DMF (36 mL, 1.0M vůči **10**) byl přidán  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (600 mg, 4.3 mmol, 1.2 ekviv) a výsledný roztok byl míchán za l.t. po dobu 10 minut. Do této heterogenní směsi byl přidán alkyl bromid **6c** (1.12 g, 3,62 mmol, 1.0 ekviv) a výsledný roztok byl umístěn v předehřáté olejové lázni nastavené na 75 °C (vnitřní teplota se pohybovala mezi 69-71 °C) a míchán po dobu 9 h. Po ochlazení na l.t. byla výsledná reakční směs rozředěna vodou (50 mL) a extrahována pomocí EtOAc (3x75 mL). Spojené extrakty byly promyty pomocí solanky (50 mL), sušeny nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařeny na RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; P.E.:EtOAc = 10:1->4:1->2:1->1:1) a poskytl produkt **11c** (1.04 g; 78 %) ve formě světle žlutého gelu.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.40 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.82 (dd,  $J = 5.3, 2.9$  Hz, 3H), 7.70 (dd,  $J = 5.3, 2.9$  Hz, 3H), 7.28 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 7.07 (dd,  $J = 8.9, 3.1$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 3.98 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.69 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.70 (dt,  $J = 15.0, 7.6$  Hz, 3H), 1.56 – 1.46 (m, 3H), 1.41 (dd,  $J = 15.3, 7.9$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 190.01, 168.66, 162.83, 155.74, 150.87, 134.08, 132.25, 125.43, 123.71, 123.36, 114.39, 113.40, 69.09, 37.99, 36.74, 31.67, 29.24, 28.63, 26.69, 25.79; MS ( $\text{ESI}^+$ ;  $m/z$ ; %): 368 (63)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

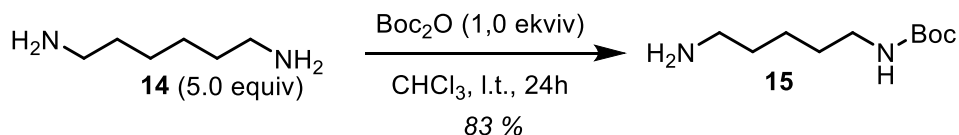
### 3.3.5. 6-(3-carboxy-4-hydroxyphenoxy)hexan-1-aminium chloride (**13c**)



Roztok aldehydu **11c** (400 mg, 1,09 mmol, 1,0 ekviv) ve směsi  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O} = 2:1$  (V/V) (9 mL, 0,14M vůči **11c**) byl ochlazen na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  (voda/led) a míchán po dobu 5 minut. Do tohoto roztoku byl přidán roztok  $\text{HSO}_3(\text{NH}_2)$  (211 mg, 2,2 mmol, 2,0 ekviv) ve vodě (2,2 mL, 1,0 M roztok). Po dalších 3 minutách byl přikapán roztok  $\text{NaClO}_2$  (108 mg, 1,2 mmol, 1,1 ekviv) ve vodě (1,2 mL, 1,0M roztok) a výsledná reakční směs byla míchána při  $0\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 2 h. Výsledná reakční směs byla rozředěna pomocí  $\text{H}_2\text{O}$  (110 mL) a celá reakční směs byla extrahována pomocí  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x100 mL). Spojené extrakty byly promyty solankou (75 mL), sušeny nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařeny na RVO. Výsledná karboxylová kyselina **12c** (1,09 mmol, 1.0 ekviv) byla rozpuštěna v  $\text{EtOH}$  (10 mL, 0,1M vůči **12c**) a do této směsi by přidán hydrazin monohydrát (1.06 mL, 41,8 mmol, 20 ekviv). Výsledná reakční směs byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na  $75\text{ }^\circ\text{C}$  a refluxována pod inertní atmosférou po dobu 6 h než byla ponechána schladnout na l.t. Výsledná směs byla rozředěna vodou (20 mL) a následně bylo pH směsi upraveno na  $\text{pH} = 3,5$  pomocí 2 M vodného roztoku  $\text{HCl}$ . Výsledná směs byla zfiltrována a těkává složka filtrátu ( $\text{EtOH}$ ) byla odpařena na RVO. Zahuštěný filtrát byl ochlazen na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  (voda/led) a do této směsi byl přidán 10 M vodný roztok  $\text{NaOH}$  (~10 mL). Vodná fáze byla následně extrahována pomocí  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 x 25mL) a spojené extrakty byly promyty solankou (15 mL), sušeny nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a zfiltrovány. Roztok byl opatrně zahuštěn na RVO za l.t. na přibližně  $\frac{1}{4}$  objemu a znovu ochlazen na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  (voda/led). Do této směsi byl následně přidán roztok  $\text{HCl}$  v bezvodém *i*-Propanolu (2 mL, 7.0 M) a výsledná směs byla odpařena na RVO a poskytla amoniovou sůl kyseliny **13c** (19 mg, 6 % z aldehydu **11c**) ve formě žlutooranžových krystalů.

b.t.  $190\text{ }^\circ\text{C}$  (rozklad);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 8.23 (broad s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.00 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 1H), 7.00 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 1H), 6.94 (d,  $J = 7.5\text{ Hz}$ , 1H), 6.94 (d,  $J = 7.5\text{ Hz}$ , 1H), 4.27 (broad s, 3H), 3.93 (t,  $J = 7.7\text{ Hz}$ , 2H), 2.77 (t,  $J = 7.8\text{ Hz}$ , 2H), 2.03 – 1.92 (m, 2H), 1.79 – 1.62 (m, 2H), 1.37 – 1.23 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 170.96, 153.85, 151.70, 119.81, 119.36, 115.26, 111.91, 69.64, 40.75, 30.83, 28.71, 28.11, 26.49; MS (ESI $^+$ ;  $m/z$ ; %): 254 [M] $^+$ .

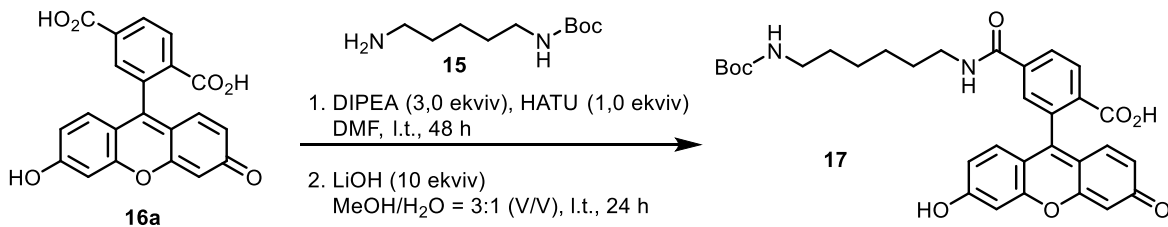
### 3.3.6. *tert*-butyl (5-aminopentyl)karbamát (15)



K roztoku  $\text{Boc}_2\text{O}$  **14** (10,91 g; 49.99 mmol; 1,0 ekvív) v chloroformu (800 ml; 0,06 mol/l vůči **14**) byl, za stálého míchání při teplotě 0 °C, přikapáván roztok aminu **15** (23,24 g; 199.98 mmol; 5,0 ekvív) v  $\text{CHCl}_3$  (80 ml; 2,5 M mol/l vůči **15**). Reakční směs byla ponechána za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce byla směs zfiltrována, filtrát byl zakoncentrován na RVO a následně rozpuštěn v ethylacetátu (400 ml). Výsledný roztok byl promyt pomocí solanky (3 x 150ml), sušen nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařen na RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; P.E.:EtOAc = 2:1->1:1) a poskytl produkt **15** (8,4 g; 83%) ve formě viskózního gelu.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.37 (m, 9H), 1.36 – 1.49 (m, 10H), 2.68 (t, 2H), 3.11 (q, 2H), 4.77 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26.7, 28.6, 30.2, 33.8, 40.6, 42.2; 79.0, 158.3; MS ( $\text{ESI}^+$ ;  $m/z$ ; %): 217  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3.3.7. 4-((6-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)hexyl)karbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl) kyselina benzoová (17)

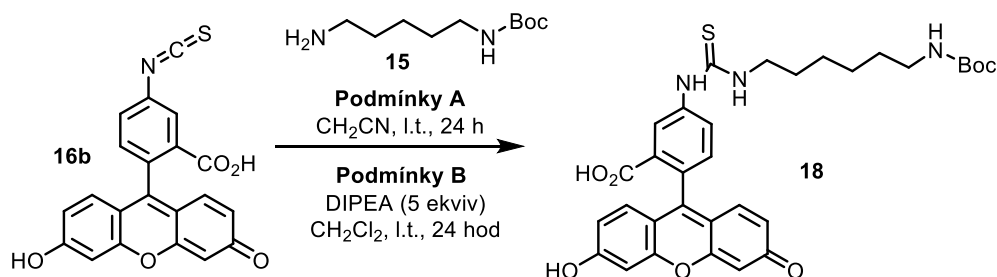


Roztok fluoresceinu **16a** (25 mg; 66,43  $\mu\text{mol}$ ; 1,0 ekvív) v DMF (0,5 ml; 0,13 mol/l vůči **16a**) byl míchán za l.t. a DIPEA (11,6  $\mu\text{l}$ ) následovaný HATU (25,26 mg; 1,0 ekvív) byl posupně přidán. Po pěti minutách stálého míchání za laboratorní teploty byl k reakční směsi přidán roztok aminu **15** (29.5 mg; 136.37  $\mu\text{mol}$ ; 2,0 ekvív) v DIPEA (24  $\mu\text{l}$ ) a výsledná směs byla ponechána za stálého míchání při l. t. pod inertní atmosférou reagovat po dobu 48 hodin. Poté byla reakční směs odpařena do sucha na RVO a odparek byl následně rozpuštěn ve směsi  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 3:1$  (12 mL, V/V). Ke směsi byl přidán LiOH (2,5 mg) a reakční směs byla ponechána za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu dalších 24 hodin. Reakční směs byla následně naředěna destilovanou vodou (20 ml) a okyselena na pH 2-3 pomocí 1 M vodného roztoku HCl. Po okyselení byla směs extrahována pomocí EtOAc (3 x 20 ml), sušena nad  $\text{MgSO}_4$  a odpařena na RVO. Odparek byl nasorbován na 2 g  $\text{SiO}_2$ , nanesen na kolonu a produkt vymyt pomocí směsy P.E.:EtOAc = 1:1 (V/V) obohacenou o 1 %

(objemové) kyseliny octové (1 x 10 mL) a následně pomocí směsy P.E.:EtOAc = 1:2 (V/V) obohacenou o 1 % (objemové) kyseliny octové (2 x 10 mL). Po odpaření jsem získal 6 mg nažloutlého gelu.

Látka **17**:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.21 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 8.16 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J$  = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 6.76 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 6.50 (dd,  $J$  = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.31 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.69 (s, 1H), 3.19 (dt,  $J$  = 17.9, 7.7 Hz, 2H), 3.06 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 2H), 1.59 – 1.52 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.34 – 1.29 (m, 4H); LC-MS:  $R_t$  = 36.9 min,  $[\text{M-H}]^-$  = 573,2.

### 3.3.8. 5-(3-(6-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)hexyl)thioureido)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl) kyselina benzoová (**18**)



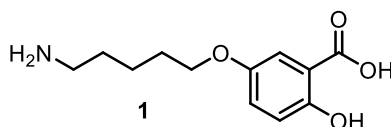
**Podmínky A:** Roztok fluoresceinu **16b** (80 mg; 205 mmol; 1,0 ekviv) v acetonitrilu (15 ml; 0,014 mol/l vůči **16b**) byl přidán do roztok aminu **15** (66,26 mg; 308 mmol; 1,5eq) v CH<sub>3</sub>CN (5 ml; 0,06mol/l vůči **15**) a výsledná reakční směs byla ponechána za stálého míchání při l. t. reagovat po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs zakonzentrována na RVO a nasorbována na 1,5 g SiO<sub>2</sub>. Nasorbovaná reakční směs byla nanášena na kolonu a produkt byl vymyt pomocí směsy P.E.:EtOAc = 2:1 (V/V) obohacenou o 1 % (objemové) kyseliny octové. K promytí bylo použito 2 x 10mL směsy rozpouštědel. Po odpaření jsem získal 51 mg nažloutlého gelu.

**Podmínky B:** Roztok fluoresceinu **16b** (120 mg; 308.2 mmol; 1 ekviv) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml; 0,015mol/l) byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a DIPEA (160  $\mu$ l) následovaná roztokem aminu **20** (99 mg; 460 mmol; 1,5eq) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml, 0,092mol/l) byla přidána. Výsledná reakční směs byla ponechána za stálého míchání při l. t. reagovat po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs zakonzentrována na RVO, nasorbována na 2 g SiO<sub>2</sub>. Nasorbovaná reakční směs byla nanášena na kolonu a produkt byl vymyt pomocí směsy P.E.:EtOAc = 2:1 (V/V) obohacenou o 1 % (objemové) kyseliny octové. K promytí bylo použito 3 x 10 mL této směsy rozpouštědel. Po odpaření jsem získal 117 mg nažloutlého gelu.

Látka **18**:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.26 (s, 1H), 8.01 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 7.74 – 7.61 (m, 1H), 7.54 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 7.14 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.05 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 6.75 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.69 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.41 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.04 (dt,  $J = 10.1, 7.5$  Hz, 1H), 1.59 – 1.48 (m, 1H), 1.36 – 1.28 (m, 1H), 1.26 (s, 1H); LC-MS:  $R_t = 38.7$  min,  $[\text{M-H}]^- = 604.7$ .

## 4. Výsledky

V rámci mé bakalářské práce jsem připravil sloučeniny, které jsou prezentovány v experimentální části (kapitola 3). V této kapitole se zaměřím na shrnutí výsledků experimentů, které jsem v rámci této práce provedl a které vedly k přípravě výše popsaných látek. V kapitole 3 se tedy nalézají pouze optimalizované postupy přípravy. Diskuze výsledků v širším kontextu se nalézá v kapitole 5. Syntetickým cílem mého snažení bylo připravit látku **1** (Obrázek 21).

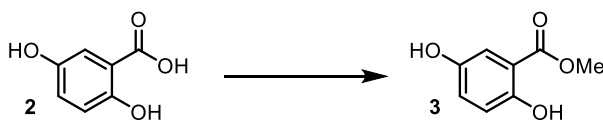


Obrázek 21: Cílová molekula 1

### 4.1. Syntéza začínající z 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny založená na tzv. Gabrielově syntéze aminů

Nejprve jsem se zaměřil na přípravu methyl esteru od 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny **2** (Tabulka 1). Esterifikace byla prováděna za podmínek kyselé katalýzy (Fisherova esterifikace), i když nejlepších výtěžků jsem dosáhl při využití diazomethanu jako methylačního činidla (Tabulka 1, experiment 4). Z důvodu nebezpečnosti ale byla reakce následně prováděna za podmínek kyselé katalýzy v methanolu (experiment 2). Tyto reakční podmínky byly také využity ve chvíli, kdy byla esterifikace provedena ve větším měřítku (Tabulka 1, experiment 5).

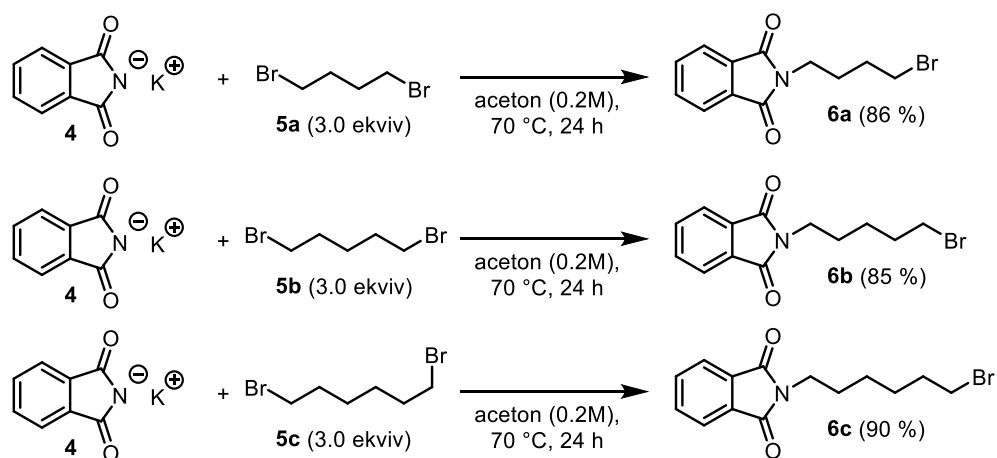
Tabulka 1: Optimalizace přípravy methyl esteru 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny **2**



| Experiment      | Reakční podmínky                                                                         | Izolovaný výtěžek [%] |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1               | kat. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MeOH (0.1M), □T, 72 h                              | 48 %                  |
| 2               | AcCl (2 ekviv.), MeOH (0.1M), l.t., 48 h                                                 | 92 %                  |
| 3               | kat. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MeOH (20 ekviv), toluen (0.1M), □T, 72 h           | 65 %                  |
| 4               | CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub> v Et <sub>2</sub> O (4 eqkviv), MeOH (0.1M), 0 °C, 30 min | 98 %                  |
| 5 <sup>a)</sup> | AcCl (2 ekviv.), MeOH (0.1M), l.t., 48 h                                                 | 91 %                  |

<sup>a)</sup> Reakce byla provedena pro 5.0 g kyseliny **2**.

Druhou etapou syntézy byla reakce mezi draselnou solí ftalimidu **4** a dibromoalkany **5a-c** (Schéma 1). Reakce probíhaly s adekvátním výtěžkem hned při prvním pokusu, takže nebyly optimalizovány.



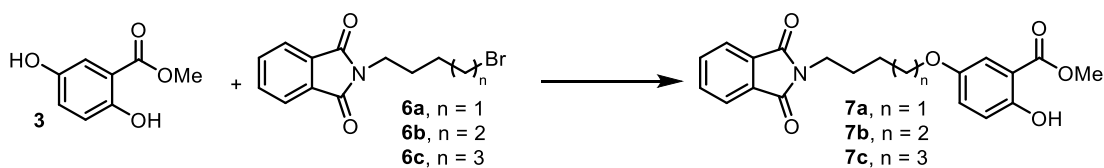
**Schéma 1**

Po připravení alkylačního činidla **5** jsem mohl přistoupit k regioselektivní alkylaci 5-hydroxy skupiny na esteru **3** (Tabulka 2). Po optimalizaci jsme byly schopni připravit cílový produkt **7b** a **7c** v 50 %, respektive 65%, výtěžku (Tabulka 2, experimenty 4 a 5). Produkt **7a** obsahující kratší čtyř uhlíkatý řetězec mezi C5 hydroxy skupinou a chráněnou aminovou skupinou se připravit sice povedlo, ale pouze ve velmi malém množství. Z tohoto důvodu ani tento produkt nebyl izolován a charakterizován (experimenty 1-3).

Následně jsem se zaměřil na odchránění ftalimidové skupiny u aminu **7b** (

Tabulka **3**). Bohužel, ani při opakovaných pokusech se tato operace nepovedla uskutečnit. Daná reakce buďto neprobíhala (žádná konverze výchozího ftalimidu **7b** nebyla pozorována) nebo vedla ke komplexní neidentifikovatelné směsi reakčních produktů. Ani při jedné z testovaných reakčních podmínek nedošlo k identifikaci a tím pádem ani k izolaci cílové látky **9b**.

**Tabulka 2:** Optimalizace regioselektivní substituce C5 umístění hydroxy skupiny na esteru **3**

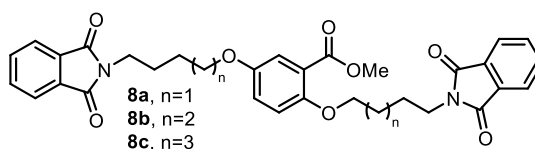


| Experiment | Reakční podmínky                                                                                                              | Poměr identifikovaných produktů <sup>a), b)</sup> | Izolovaný výtěžek <sup>c)</sup> [%] |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>1</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6a</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), DMF, 70 °C, 4 h                      | <b>7a:8a:3</b> = 10:20:11                         | n.a.                                |
| <b>2</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6a</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), aceton, 55 °C, 60 h                  | <b>7a:8a:3</b> = 4:36:85                          | n.a.                                |
| <b>3</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6a</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), aceton/voda = 3:1 (V/V), 55 °C, 13 h | <b>7a:8a:3</b> = 5:19:72                          | n.a.                                |
| <b>4</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6b</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), DMF, 70 °C, 4 h                      | <b>7b:8b:3</b> = 83:2:5                           | 50 %                                |
| <b>5</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6c</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), DMF, 70 °C, 4 h                      | <b>7c:8c:3</b> = 82:1:7                           | 65 %                                |
| <b>6</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6b</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), aceton, 55 °C, 13 h                  | <b>7b:8b:3</b> = 75:2:3                           | n.a.                                |
| <b>7</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6b</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), aceton/voda = 3:1 (V/V), 60 °C, 13 h | <b>7b:8b:3</b> = 46:12:52                         | n.a.                                |
| <b>8</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6c</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), aceton, 55 °C, 13 h                  | <b>7c:8c:3</b> = 12:6:49                          | n.a.                                |
| <b>9</b>   | <b>3</b> (1,0 ekviv), <b>6c</b> (1,0 ekviv), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,2 ekviv), aceton/voda = 3:1 (V/V), 60 °C, 13 h | <b>7c:8c:3</b> = 11:3:46                          | n.a.                                |

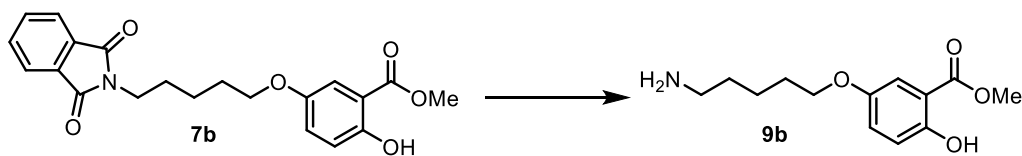
<sup>a)</sup> Poměr z <sup>1</sup>H NMR spektra reakční směsi. Poměr reprezentuje molární poměr produktů.

<sup>b)</sup> Další identifikovaný(é) vedlejší produkt(y) viz níže.

<sup>c)</sup> Vztahuje se na izolovaný plně charakterizovaný produkt.



**Tabulka 3:** Odchránění ftalimidové chránicí skupiny v esteru **7b**

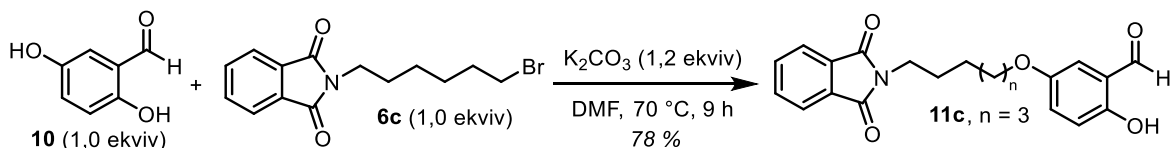


| Experiment | Reakční podmínky                                                                        | Konverze <b>7b</b> <sup>a)</sup> | Produkt <sup>a)</sup> |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
|            |                                                                                         | [%]                              | [%]                   |
| 1          | NaOH (50 % vodný roztok), l.t., 24h                                                     | <5 %                             | -                     |
| 2          | KOH (50 % vodný roztok), l.t., 24h                                                      | <5 %                             | -                     |
| 3          | KOH (50 % vodný roztok), 50 °C, 24h                                                     | ~30 %                            | -                     |
| 4          | KOH (50 % vodný roztok), 100 °C, 24h                                                    | ~60 %                            | -                     |
| 5          | NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (20 ekviv), EtOH, l.t., 24h          | >98 %                            | -                     |
| 6          | NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (10 ekviv), EtOH, l.t., 24h          | >98 %                            | -                     |
| 7          | NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (20 ekviv), <i>i</i> PrOH, l.t., 24h | >98 %                            | -                     |
| 8          | NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .2HCl (20 ekviv), EtOH, l.t., 24h                      | >98 %                            | -                     |

<sup>a)</sup> Určeno pomocí <sup>1</sup>H NMR spektra reakční směsi.

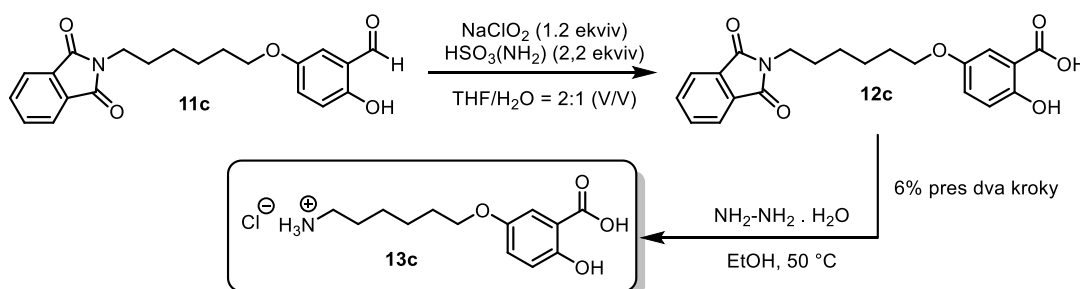
#### 4.2. Syntéza začínající z 2,5-dihydroxybenzaldehydu založená na tzv. Gabrielově syntéze aminů

Syntéza cílové kyseliny **1** byla založena na reakci 2,5-dihydroxy benzaldehydu **10**, který byl reagován s ftalimidobromidem **6c** (Schéma 2).



**Schéma 2**

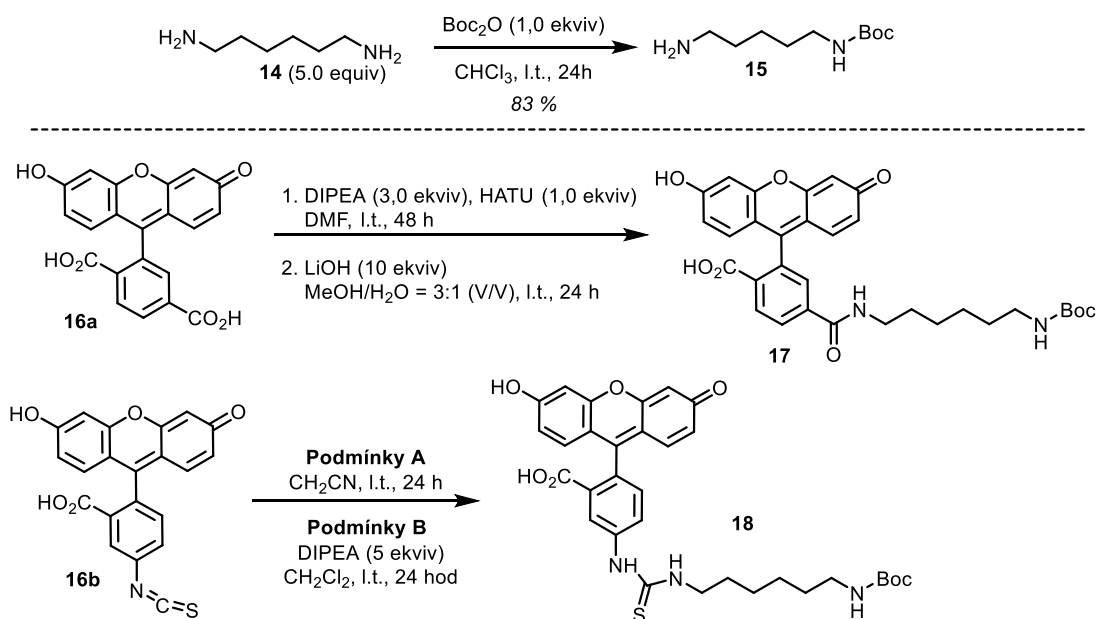
Výsledný aldehyd **7c** byl následně oxidován na karboxylovou kyselinu **12c** s využitím chloritanu sodného (Schéma 3). Daná reakce proběhla za úplné konverze **11c** a poskytla kyselinu **12c** jako medovitý viskózní gel. Tato látka byla okamžitě použita v následné hydrazinolýze a poskytla kyselinu **1** ve formě ammonionvé soli **13c** (Schéma 3).



**Schéma 3**

### 4.3. Příprava modifikovaných derivátů fluoresceinu k zavěšení na cílové molekuly

Druhým cílem mé práce bylo otestovat připojení aminového linkeru k derivátům fluoresceinu. Z tohoto důvodu jsme připravily monochráněný diamin **15**, který byl následně reagován se dvěma zástupci fluoresceinových barviv **15a** a **15b** za tří různých reakčních podmínek (Schéma 4). Výsledné produkty **17** a **18** byly charakterizovány pouze na základě měření  $^1\text{H}$  NMR spekter a LC-MS analýz reakčních směsí. Výsledky těchto reakcí tedy musí být znovu prověřeny s ohledem na jejich výtěžnost, plnou charakterizaci výsledných produktů a reproduktibilitu.



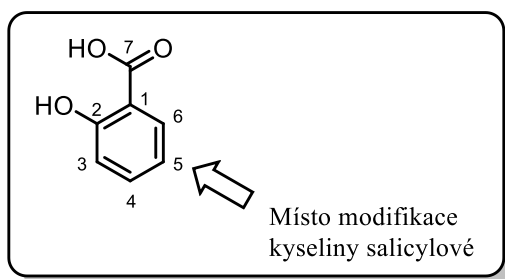
**Schéma 4**

## 5. Diskuze

Jak již bylo zmíněno v předcházejících kapitolách, má bakalářské práce se skládá ze dvou do značné míry nesourodých částí. Teoretická neboli literární část se zabývá gibereliny, zatímco experimentální neboli praktická část je věnována přípravě derivátu kyseliny salicylové modifikované na pozici C5 (Obrázek 21). Tato zdánlivá nelogičnost má ovšem svůj dobrý důvod. Toto uspořádání nám umožnilo spojit pod jednu „střechu“ dva projekty, jeden zaměřený na gibereliny a druhý na deriváty kyseliny salicylové.

Jeden z dlouhodobých projektů v naší skupině je zaměřen na přípravu a syntetické modifikace derivátů fytohormonů – giberelinů. Bohužel cena těchto látek, a to včetně těch cenově nejednodušších jako je giberelin A<sub>3</sub>, je diskvalifikuje jakožto výchozí látky pro studenty bakalářského studia bez větších zkušeností v oblasti organické syntézy.

Druhým projektem, z časového pohledu krátkodobým, na kterém se naše skupina podílí, je SAR studie zaměřená na identifikaci role kyseliny salicylové, respektive mechanismu, jakým kyselina salicylová interferuje s cluster-based traffickingem v rostlinných buňkách (Du et al., 2013). V průběhu SAR studie prováděné v rámci naší skupiny (organická syntéza) a skupiny profesora J. Frimla (AIT) (biologická část) bylo zjištěno, že deriváty kyseliny salicylové substituované v pozici C5 lze použít k navození endocytózy studovaných proteinů. C5 substituované deriváty kyseliny salicylové tedy mají shodné vlastnosti s kyselinou salicylovou. Ostatní studované deriváty kyseliny salicylové vykazovaly tento efekt jen ve velmi malé míře (nepublikované výsledky).



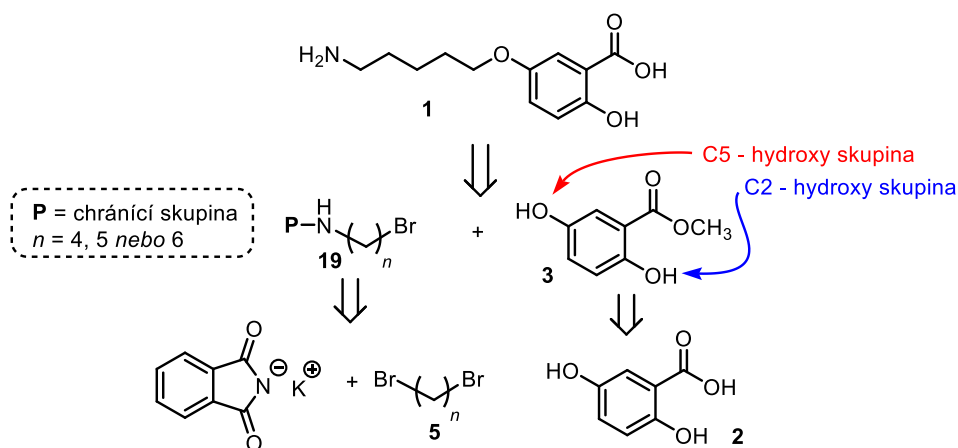
**Obrázek 22:** Kyselina salicylová a místo vytipované pro připojení postranního řetězce

Ve světle těchto zjištění jsme se rozhodli připravit C5 substituovaný derivát kyseliny salicylové nesoucí na C5 atomu uhlíku linker opatřený aminoskupinou v terminální pozici 1 (Obrázek 21). Zde umístěná aminoskupina by následně měla sloužit ke dvěma účelům. Zaprvé jako „spojka“ k navázání na nosič využitelný v rámci afinitní chromatografie (spolupráce s doktorem I. Chamrádem) a zadruhé jako „spojka“ využitelná k navázání fluorescenční značky vhodné pro sledování osudu molekuly pomocí fluorescenční spektroskopie. Obě tyto metody by měli biologům ze skupiny profesora Friemla pomoci

identifikovat způsob jakým kyselina salicylová ovlivňuje biologické procesy v rámci rostlinné buňky.

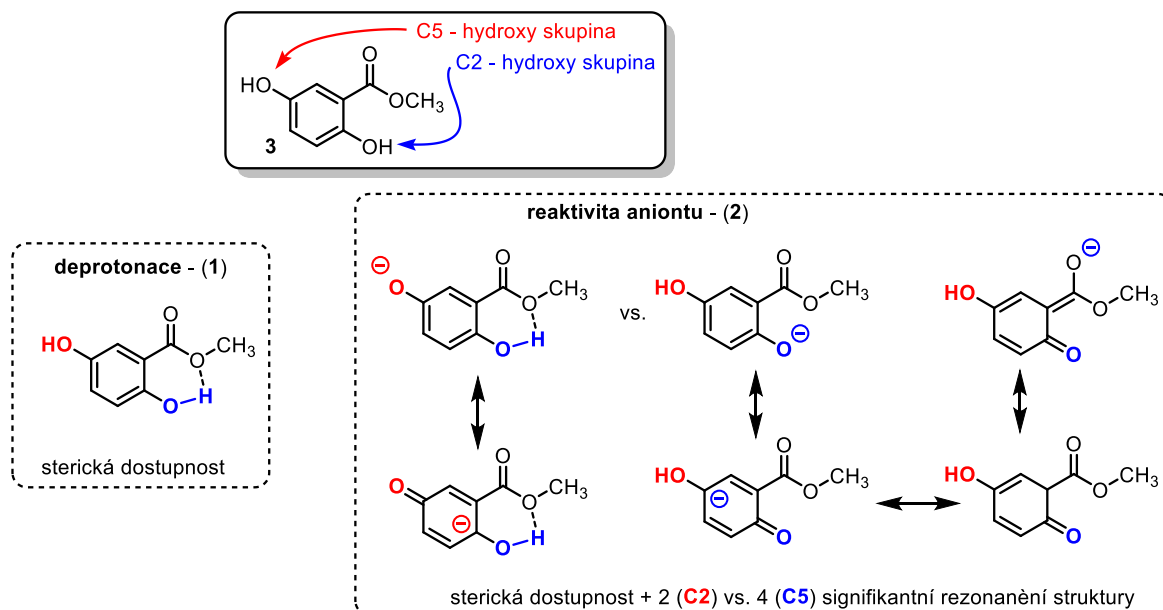
Mým cílem bylo připravit látku **1** a při té příležitosti získat co nejvíce informací, jak teoretických, tak i praktických, které bychom mohli následně využít v kontextu syntézy značených giberelinů.

Naše retrosyntéza látky **1** vycházela z předpokladu, že cílová látka může být připravena s využitím regioselektivní alkylatione 2,5-dihydroxysubstituovaného esteru **3** (Obrázek 23). Jako alkylační činidlo jsme zamýšleli použít 1-bromo- $\omega$ -amino alkan **19** opatřený chránicí skupinou pro koncový amin, která by zabránila aminoskupině reagovat jako nukleofil při substituční reakci. Předpokládali jsme, že se nám podaří nalézt podmínky za kterých bromoalkan **19** bude regioselektivně alkylovat C5 hydroxy skupinu v přítomnosti C2-hydroxy skupiny.



**Obrázek 23:** Retrosyntéza cílové molekuly **1**

Náš předpoklad byl založen na dvou argumentech. Prvním bylo to, že C5 hydroxylový vodíkový atom půjde snáze deprotonovat protože je kineticky labilnější. Tato labilita je způsobena tím, že je stericky méně bráněn. V *ortho* a *ortho'* pozicích jsou zde pouze vodíkové atomy. C2 hydroxylový vodíkový atom je nejenom stericky méně dostupný, v *ortho* pozici vůči hydroxylu se totiž vyskytuje methyl esterová skupina, ale vodíkový atom je navíc stabilizován pomocí intramolekulární vodíkové vazby (Obrázek 24). Druhým argumentem je, že v okamžiku kdy dojde k deprotonaci vodíku na hydroxylu, fenolový alkoholát přítomen na C5 bude reaktivnější, respektive méně stabilizovaný, a to jak z kinetických (generovaný aniont je méně stericky bráněn), tak termodynamických (C2 fenolový anion bude lépe stabilizován díky mezomernímu efektu) důvodů (Obrázek 24)



**Obrázek 24:** Porovnání stabilit/reaktivit hydroxy skupin a odpovídajících aniontů na C2 a C5 v rámci esteru 3

Tento přístup nám také umožní připravit, pakliže to bude potřeba, cílovou molekulu **1** s různou délkou linkeru mezi vlastní kyselinou salicylovou a aminoskupinou, která bude sloužit k přímému připojení kyseliny salicylové k nosiči (afinitní chromatografie) nebo fluorescenční značce. Aplikace tohoto postupu nám tedy umožní „reagovat na experimentální data“ v okamžiku, kdyby se cílová molekula ukázala jako nevhodná pro zamýšlenou biologickou studii tím, že bude možné změnit délku či charakter linkeru. Zamýšlený monoalkan **19** měl být připraven z odpovídajících lineárních 1,ω-dibromoalkanů **5** a draselné soli ftalimidu **4**. Ftalimidovou funkční skupinu jsme si vybrali jako první možnou chránící skupinu pro amin, protože je jednak snadno dostupná, snižuje nukleofilicitu dusíkového atomu (stabilizace volného elektronového páru na dva karbonyly) a lze ji odstranit bazickou hydrolyzou. Takto bychom mohli v posledním kroku syntézy ochránit jak amin, tak hydrolyzovat methyl esteru na volnou kyselinu.

Syntéza molekuly **1** začala esterifikací 2,5-dihydroxy kyseliny **2** (viz Tabulka 1). Z důvodu přítomnosti 3 nukleofilních center (2 hydroxyskupiny a karboxylová skupina) jsme se zaměřili na Fisherovu syntézu esterů karboxylových kyselin, která probíhá za kyselé katalýzy. Jako nejlepší se nám osvědčila příprava pomocí *in situ* v methanolu generované kyseliny chlorovodíkové, která následně katalyzovala esterifikační reakci. Vedlejší produkt, methyl ester kyseliny octové, generován při reakci acetyl chloridu s methanolem byl následně při work-upu reakce odpařen spolu s methanolem na RVO. Ještě lepších výsledků

jsme dosáhli při esterifikaci s pomocí diazomethanu, ale tento postup jsme následně pro přípravu esteru **3** v multigramových množstvích zavrhlí z bezpečnostních důvodů. U diazomethanu totiž při větších koncentracích hrozí nebezpečí exploze a je také potenciálně karcinogenní.

Hned poté jsme se zaměřily na reakci mezi dibromoalkany **5a-c** s draselnou solí ftalimidu **4** (Schéma 3). Jediný problém při této reakci je tvorba disubstituovaných produktů, které by mohly učinit purifikaci monosubstituovaného produktu **6** značně obtížnou. Tomuto jsme předešli tak, že jsme nechali reagovat 1 ekvivalent ftalimidové soli **4** s nadbytkem (3 ekvivalenty) dibromoalkanu **5**. Nadbytek dibromoalkanu **5** byl od monosubstituovaného produktu **6** velice lehce separovatelný díky velikému rozdílu v lipofilitě mezi mono a dibromoalkany. Množství rekuperovaného dibromoalkanu **5** se pohybovalo v rozmezí 1,5-1,8 ekvivalentu. Rekuperovaný dibromoalkan byl následně znovu využit při přípravě nové šarže odpovídající sloučeniny **6**.

Nyní jsme mohli přistoupit k regioselektivní alkylaci esteru **3** pomocí alkylačních činidel **6a-c**. Abychom co nejvíce využili očekávané o něco větší reaktivity fenolátu generovaného na hydroxy skupině C5 ( $pK_a \sim 10$ ), termodynamická báze ( $K_2CO_3$ ,  $pK_a \sim 15$ ;) v kombinaci s polárními protickými (aceton, nebo aceton/voda) i aprotickými (DMF) rozpouštědly byla testována (Tabulka 2). Ukázalo se, že nejvhodnější je použít aprotické polární rozpouštědlo (suché DMF). Za těchto podmínek vznikl monoalkylovaný produkt přednostně v pozici C5 (~90% nadbytek v porovnání s ostatními produkty reakce). Je zajímavé, že tohoto výsledku jsem dosáhl pouze při využití alkylačních činidel **6b** a **6c**. V případě reagentu **6a** vznikl jako hlavní produkt produkt dialkylace na C2 a C5 hydroxy skupině. Poměr produktů byl určen z  $^1H$  NMR spekter surových reakčních směsí na základě integrace odpovídajících skupin a na základě specifického posunu několika z nich. Zejména jsem se zaměřil na esterové methylové skupiny  $CH_3$  (pro látku **3**, 3.94 ppm; **7a-c**, 3.96 ppm; **8a-c**, 3.90-3.91 ppm) a dále pak na přítomnost signálu C2 hydroxylového vodíku u sloučenin **3** a **7a-c** (8.5-9.1 ppm).

Jakmile jsem měl připravený produkt **7b** (první připravený produkt), okamžitě jsem začal testovat jeho konverzi na methyl ester cílového produktu **9b** (

**Tabulka 3**). Bohužel velice rychle se ukázalo, že bazická hydrolýza nejenže nevede k ochránění ftalimidu, ale ani methyl ester na karboxylové kyselině není hydrolyzován. Pakliže byly podmínky poněkud drsnější (vyšší teplota), začalo docházet k pomalé konverzi výchozí látky, ale tvorba produktu **9b** nebo produktu **1** odpovídajícího ochránění, či následné hydrolýze methyl esteru, nebyla pozorována. Následně jsem se pokusil ochránit

ftalimid pomocí hydrazinolýzy – ani v tomto okamžiku se nám ale nepovedlo připravit cílovou látku **9b**.

LC-MS chromatogramy ani  $^1\text{H}$  NMR spektra reakčních směsí nám bohužel nedaly žádné vodítko co by se mohlo s výchozí látkou stát. Úskalí, které nám tato reakce přinesla tedy nemohla být odhalena. Jednou z možností, o které jsme uvažovali bylo, že ochráněná amino skupina by mohla intramolekulárně substituovat methoxy skupinu v methyl esteru za vzniku amidu **20** (Schéma 5). Látku odpovídající tomuto produktu se sice nepovedlo ani izolovat ani detekovat, ale byla to přece jenom alespoň nějaká relevantní hypotéza.

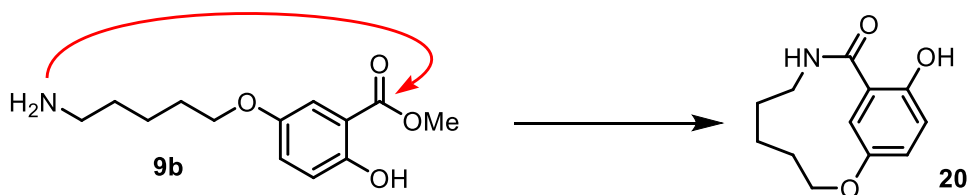


Schéma 5

Rozhodli jsme se tedy aplikovat naši retrosyntézu na strukturně obdobnou látku, 2,5-dihydroxybenzaldehyd **10** a navázat karboxylovou skupinu přímo oxidací aldehydu bez přechodu na odpovídající ester. Takto bychom zabránily vytvoření aktivovaného karbonylu, který by mohl podlehnout intramolekulární cyklizaci. Očekávali jsme, že regioselektivní alkylace bude probíhat obdobně jako v případě odpovídajícího methyl esteru **3**. Nemýlili jsme se a cílová látka **11c** byla připravena v 78% výtěžku dle podmínek optimalizovaných pro alkylační činidlo **6c** a ester **3** (Schéma 2). Oxidace aldehydu **11c** pomocí chloritanu sodného následovaná okamžitou hydrazinolýzou ftalimidové skupiny nám, po obtížném zpracování, které zahrnovalo několikanásobné acidobazické vytřepávání, poskytla cílovou látku **1** ve formě ammoniové soli **13c** za velmi nízkého 6% výtěžku (Schéma 3).

Druhým cílem mé práce bylo otestovat připojení fluorescenčních skupin na modelový substrát. Protože se mi nepodařilo připravit látku **1** v dostatečně relevantním množství, tak jsem se rozhodl toto připojení vyzkoušet alespoň na monochráněném diaminu **15** (Schéma 4). V tomto případě všechny tři testované reakce probíhaly tak jak měli a podle analýzy  $^1\text{H}$  NMR spekter, stejně jako LC-MS chromatogramů poskytly kýžené produkty. Tyto produkty ale nebyly plně charakterizovány, a tak nejsou plně popsány v experimentální části této práce.

## 6. Závěr

V rámci mé bakalářské práce jsem se v literární části snažil postihnout veškeré důležité informace obsažené v literárních zdrojích spojené s gibereliny, kyselinou salicylovou a fluorescenčně značenými rostlinnými hormony.

V rámci praktické části jsem se zaměřil na syntézu mé cílové molekuly, derivátu kyseliny salicylové **1**. Látku jako takovou se mi sice nepovedlo připravit, ale získal jsem ji alespoň v podobě její ammoniové soli **13c**, i když pouze v 6 % výtěžku. Tato situace měla za následek, že jsem nemohl dosáhnout svého druhého cíle, otestování navázání fluorescenční značky na modelový substrát, s využitím derivátu kyseliny salicylové (málo výchozí látky). Proto jsem alternativně vyzkoušel tento protokol s využitím monochráněného 1, $\omega$ -diaminu **15**. Všechny tři testované reakce proběhly úspěšně a poskytly kýžené produkty **17** a **18**.

## 7. Seznam použité literatury

### Internetový zdroj 1: (21.8.2016)

<http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6477>

### Internetový zdroj 2: (20.9.2016)

[http://www.en.botanik.bio.lmu.de/personen/wiss\\_mitarbeiter/bolle/homepage/gras\\_protein/index.html](http://www.en.botanik.bio.lmu.de/personen/wiss_mitarbeiter/bolle/homepage/gras_protein/index.html)

### Internetový zdroj 3: (20.2.2016)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21589/>

### Internetový zdroj 4: (11.5.2017)

<https://www.scientific-equipment.com/equipment-for-sale/electrophoresis/storm-820-phosphor-imager?ln=3406>

**Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., Harberd, N.P.** (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131** (14): 3357–3365.

**Band, L.R., Bennett, M.J.** (2013) Mapping the site of action of the Green Revolution hormone gibberellin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (12): 4443–4444.

**Davière, J.-M., Achard, P.** (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* **140** (6): 1147–51.

**Davière, J.M., de Lucas, M., Prat, S.** (2008) Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current Opinion in Genetics and Development* **18** (4): 295–303.

**Du Y, Tejos R, Beck M, Himschoot E, Li H, Robatzek S, Vanneste S, Friml J** (2013) Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (19):7946-7951.

**Dubreucq, B., Berger, N., Vincent, E., Boisson, M., Pelletier, G., Caboche, M., Lepiniec, L.** (2000) The Arabidopsis AtEPR1 extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination. *Plant Journal* **23** (5): 643–652.

**Fleet, C.M., Sun, T.P.** (2005) A DELLAcate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8b** (1): 77–85.

**Giacomelli, L., Rota-Stabelli, O., Masuero, D., Acheampong, A.K., Moretto, M., Caputi, L., Vrhovsek, U., Moser, C.** (2013) Gibberellin metabolism in *Vitis vinifera* L. During bloom and fruit-set: Functional characterization and evolution of grapevine gibberellin oxidases. *Journal of Experimental Botany* **64** (14): 4403–4419.

**Gocal**, G.F., Sheldon, C.C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D.J., MacMillan, C.P., Li, S.F., Parish, R.W., Dennis, E.S., Weigel, D., King, R.W. (2001) GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant physiology* **127** (4): 1682–93.

**Goldberg**, R., Beals, T., Sanders, P. (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* **5**: 1217–1229.

**Gómez-Mena**, C., de Folter, S., Costa, M.M.R., Angenent, G.C., Sablowski, R. (2005) Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* **132** (3): 429–438.

**Gottlieb** HE, Kotlyar V, Nudelman A (1997) NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of the Organic Chemistry* **62** (21): 7512-7515.

**Goto**, N., Pharis, R.P. (1999) Role of gibberellins in the development of floral organs of the gibberellin-deficient mutant, ga1-1, of Arabidopsis thaliana. *Canadian Journal of Botany* **77** (7): 944–954

**Griffiths**, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T., Thomas, S.G. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18** (12): 3399–3414.

**Hedden**, P., Sponsel, V. (2015) A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation* **34** (4): 740–760.

**Hedden**, P., Thomas, S.G. (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal* **444** (1): 11–25.

**Hirano**, K., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends in Plant Science* **13** (4): 192-199.

**Hirsch**, S., Oldroyd, G.E.D. (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant signaling & behavior* **4** (8): 698–700.

**Hou**, X., Hu, W.-W., Shen, L., Lee, L.Y.C., Tao, Z., Han, J.-H., Yu, H. (2008) Global identification of DELLA target genes during Arabidopsis flower development. *Plant physiology* **147** (3): 1126–42.

**Hu**, J., Mitchum, M.G., Barnaby, N., Ayele, B.T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W.-C., Hanada, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Swain, S.M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Sun, T.-P. (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **20** (2): 320–336.

**Hunt** MD, Neuenschwander UH, Delaney TP, Weymann KB, Friedrich LB, Lawton KA, Steiner H-y, Ryals JA (1996) Recent advances in systemic acquired resistance research: a review. *Gene* **179**: 89-95

- Chen, X.** (2004) A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* **303**: 2022–2025.
- Chen Z, Klessig D** (1991) Identification of soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 8179–8183
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., Peng, J.** (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131** (5): 1055–1064.
- Chhun, T., Aya, K., Asano, K., Yamamoto, E., Morinaka, Y., Watanabe, M., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M., Ueguchi-Tanaka, M.** (2007) Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *Plant Cell* **19** (12): 3876–3888.
- Kessman H, Staub T, Hoffman C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J** (1994) Induction of systematic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 439–459
- Komeda, Y.** (2004) Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* **55** (1): 521–535.
- Koornneef, M., Bentsink, L., Hilhorst, H.** (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5** (1): 33–36.
- Kumar D, Klessig DF** (2003) High-affinity Salicylic Acid-Binding Protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
- Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M., Moose, S.P.** (2005) microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (26): 9412–9417.
- Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T., Yu, H.** (2007) Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development* **134** : 1901–1910.
- Luo, A., Qian, Q., Yin, H., Liu, X., Yin, C., Lan, Y., Tang, J., Tang, Z., Cao, S., Wang, X., Xia, K., Fu, X., Luo, D., Chu, C.** (2006) *EUI1*, encoding a putative cytochrome P450 monooxygenase, regulates internode elongation by modulating gibberellin responses in rice. *Plant and Cell Physiology* **47** (2): 181–191.
- Macmillan, C.P., Blundell, C. a, King, R.W.** (2005) Flowering of the grass *Lolium perenne*: effects of vernalization and long days on gibberellin biosynthesis and signaling. *Plant physiology* **138**: 1794–1806.

- Magome**, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. (2013) CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (5): 1947–1952.
- Moon**, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.R., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G., Lee, I. (2003) The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant Journal* **35** (5): 613–623.
- Mutasa-Göttgens**, E., Hedden, P. (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **60** (7): 1979–1989.
- Nakajima**, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant Journal* **46** (5): 880–889.
- Nakaminami**, K., Sawada, Y., Suzuki, M., Kenmoku, H., Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Inoue, Y., Kamiya, Y., Toyomasu, T. (2003) Deactivation of Gibberellin by 2-Oxidation during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Bioscience, and Biotechnology, and Biochemistry* **67** (7): 1551–1558.
- Nir**, I., Moshelion, M., Weiss, D. (2014) The Arabidopsis GIBBERELLIN METHYL TRANSFERASE 1 suppresses gibberellin activity, reduces whole-plant transpiration and promotes drought tolerance in transgenic tomato. *Plant, Cell and Environment* **37** (1): 113–123.
- Rademacher**, W. (2000) GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **51**: 501–531.
- Rajjou**, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., Job, D. (2012) Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology* **63** (1): 507–533.
- Raskin** I. (1995) Salicylic Acid. In PJ Davies, ed, *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 188-205
- Ryals** J, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 404-4011
- Ryals** J, Uknes S, Ward E (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* **104**: 1109-1112
- Santner**, A., Calderon-Villalobos, L.I. a, Estelle, M. (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* **5** (5): 301–307.
- Shani**, E., Weinstain, R., Zhang, Y., Castillejo, C., Kaiserli, E., Chory, J., Tsien, R.Y.,

- Estelle, M. (2013) Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (12): 4834–4839.
- Schneider**, G., Jensen, E., Spray, C.R., Phinney, B.O. (1992) Hydrolysis and re-conjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89** (17): 8045–8048.
- Smith**, V. a. (1992) Gibberellin A1 Biosynthesis in *Pisum sativum* L.: II. Biological and Biochemical Consequences of the *le* Mutation. *Plant Physiology* **99** (2): 372–377.
- Srikanth**, A., Schmid, M. (2011) Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68** (12): 2013–2037.
- Sticher** L, Mauch-Mani B, Mettraux JP (1997) Systemic acquired resistance. In RK Webster, ed, *Annual Review of Phytopathology*, Vol **35**. Annual Reviews Inc., Palo Alto, pp 235-270
- Swain**, S.M., Singh, D.P. (2005) Tall tales from sly dwarves: Novel functions of gibberellins in plant development. *Trends in Plant Science* **10** (3): 123-129.
- Taiz**, L., Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology*, Fifth edition, pp. 584-619, Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A
- Taiz**, L., Zeiger, E. (2015) *Plant Physiology and Development*, Sixth Edition, pp. 437-439, Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A
- Ueguchi-Tanaka**, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., Matsuoka, M. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437** (7059): 693–698.
- Ueguchi-Tanaka**, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., Matsuoka, M. (2007) Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **58** (1): 183–198.
- Varbanova**, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C.J., Noel, J.P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermel, S., Weiss, D., Pichersky, E. (2007) Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19** (1): 32–45.
- Wildermuth** MC, Dewdney J, Wu G Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesise salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565
- Yamaguchi**, S. (2008) Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology* **59** (1): 225–251.
- Yu**, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., Meyerowitz, E.M. (2004) Floral homeotic

genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (20): 7827–7832.

**Zhu**, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L.N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., He, Z. (2006) ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18** (2): 442–456.