

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie
Centrum regionu Haná
pro biotechnologický a zemědělský výzkum

Dusíkatá analoga a mimetika strigolaktonů

Diplomová práce

Autor:	Bc. Ondřej Kováč
Studijní program:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 11.5.2016

.....

Podpis

Poděkování:

Děkuji celému kolektivu CRH, Oddělení chemické biologie, laboratoře organické syntézy, za podporu a pomoc při práci v laboratoři. Zejména bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph. D. za vedení mé diplomové práce a jeho cenné rady nejenom v oblasti organické syntézy.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Ondřej Kováč

Název práce: Dusíkatá analoga a mimetika strigolaktonů

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Centrum Regionu Haná – Oddělení chemické biologie a genetiky

Školitel: Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt:

Diplomová práce se zabývá syntézou strigolaktonových analogů a mimetik, které ve své struktuře obsahují D-laktamový kruh a zjištění jejich biologické aktivity při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin. Teoretická část se zabývá strigolaktony, jejich funkcí a shrnutím obecných postupů pro jejich přípravu. V rámci praktické části byla připravena strigolaktonová analoga, která jsou odvozena od látky GR 24, dále pak i strigolaktonová mimetika, která jsou odvozena od kyseliny benzoové. Biologická aktivita připravených analogů byla testována na semenech parazitické rostliny *Striga hermonthica*.

Klíčová slova: strigolakton, strigolaktonová analoga, strigolaktonová mimetika, *Striga hermonthica*, GR 24

Počet stran: 89

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Ondřej Kováč

Title: N-containing strigolactone analogues and mimics

Type of thesis: master

Department: Centre of the Region Haná – Department of chemical biology and genetics

Advisor: Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract:

This thesis deals with the synthesis of the strigolactone analogues and mimics with D-lactame ring in their structure and determination of their biological activity as a germination promoter of parasitic plants. The theoretical part describes structure of strigolactones, their functions, and a summary of the most common processes for their preparation. In the practical part, is showed the synthesis of novel strigolactone analogues that are derived from substance GR 24 and also preparation of new strigolactone mimics that are derived from benzoic acid is described. Finally, biological activity of novel analogues was tested on the seeds of the parasitic plant *Striga hermonthica*.

Keywords: strigolactone, strigolactone analogues, strigolactone mimics, *Striga hermonthica*, GR 24

Number of pages: 89

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Seznam použitých zkratk

(Boc)₂O – di-*tert*-butyldikarbonát

ACN – acetonitril

AcOH – kyselina octová

AIBN – azobisisobutyronitril

AM – arbuskulární mykorhiza

Asp – kyselina asparagová

b.p. – teplota varu

Boc – *tert*-butyloxykarbonyl

br – broad singlet

CD – cirkulární dichroismus

CDCl₃ – deuterovaný chloroform

d – dublet

DACH – diaminocyklohexan

dba - dibenzilidenaceton

DCM – dichlormethan

DIBAL-H – diisobutylaluminium hydrid

DMAP – 4-dimethyl-aminopyridin

DME – dimethoxyethan

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

E3 – ubiquitin lipasa

ee – enantiomerní přebytek

Et₃N – triethylamin

Et₃SiH – triethylsilan

EtOAc – ethylacetát

His – histidin

HMDS – hexamethyldisilazan

HPLC-MS – spojení kapalinové chromatografie a hmotností spektrometrie

hν – UV záření

J – štěpící konstanta

m – multiplet

Me – methyl

MeOH – methanol
NBS – *N*-bromsukcinimid
NMR – nukleární magnetická rezonance
OS – orobanchyl synthasa
ppm – parts per milion
p-TSA – *para*-toluensulfonová kyselina
r.t. – laboratorní teplota
s – singlet
Ser – serin
SFC komplex – Skp, Cullin, F-box obsahující komplex
SN – nukleofilní substituce
t – triplet
t-BuOK – *tert*-butoxid draselný
THF – tetrahydrofuran
TLC – tenkovrstevná chromatografie
TMS – tetramethylsilan
 δ – chemický posun

Obsah

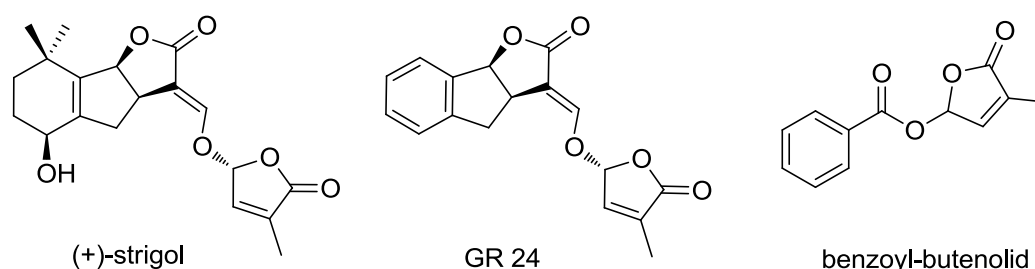
Seznam použitých zkratk	6
1 Úvod	10
2 Cíle práce	11
3 Teoretická část	12
3.1 Růstové regulátory	12
3.2 Strigolaktomy – objev a funkce	12
3.3 Rozdělení strigolaktonů	15
3.3.1 Přírodní strigolaktomy	15
3.3.2 Strigolaktonová analoga	16
3.3.3 Strigolaktonová mimetika	17
3.4 Předpokládané mechanismy působení strigolaktonů	18
3.5 Působení strigolaktonů na molekulární úrovni	22
3.6 Biosyntéza strigolaktonů	24
3.7 Stereochemie strigolaktonů	28
3.8 Strategické přístupy k syntéze strigolaktonů	34
3.8.1 Totální syntéza přírodních strigolaktonů	34
3.8.2 Syntéza strigolaktonových analogů	41
3.8.3 Syntéza strigolaktonových mimetik	45
4 Výsledky a diskuse	47
4.1 Příprava laktamových kruhů	47
4.1.1 Příprava mono a dimethyl imidů	47
4.1.2 <i>N</i> -methylace monomethyl a dimethylimidů	48
4.1.3 Redukce příslušných imidů	49
4.1.4 Příprava <i>N</i> -Boc laktamů	52
4.1.5 Příprava <i>N</i> -methyl-monomethyl laktamu	52
4.1.6 Bromace laktamových kruhů	53
4.2 Příprava ABC skeletu	53
4.3 Spojování ABC skeletu s laktamovými kruhy	54
4.4 Spojování ABC skeletu s laktamovými kruhy pomocí Pd-couplingu	55
4.5 Strigolaktonová mimetika obsahující laktamový kruh	58
4.6 Biologické testování	59

5 Experimentální část.....	62
5.1 Metody	62
5.2 Příprava strigolaktonových analogů a mimetik.....	62
5.3 Biologické testování.....	82
6 Závěr	84
7 Literatura.....	85

1 Úvod

Nejmladší skupina látek, která je zařazena mezi rostlinné hormony se nazývá strigolaktony. U této skupiny rostlinných regulátorů byly prozatím nalezeny tři funkce. První funkcí, díky níž byly objeveny, je schopnost iniciovat klíčení semen parazitických rostlin rodu *Striga*, *Orobancha* a *Phelipanche*. Následně bylo zjištěno, že jsou také iniciátory vzniku symbiozy hostitelských rostlin a AM hub. Poslední objevená funkce se stala důvodem toho, že strigolaktony byly zařazeny mezi rostlinné hormony, jako jsou cytokininy, auxiny a gibereliny. Strigolaktony totiž inhibují větvení nadzemních částí rostlin a tím tak přímo ovlivňují růst rostliny.

Strigolaktony lze rozdělit do tří skupin, a sice na přírodní strigolaktony, strigolaktonová analoga a strigolaktonová mimetika. Největší pozornost je upřena na přípravu strukturně jednodušších analogů a mimetik, které se ale musí zároveň přiblížit aktivitě přírodních strigolaktonů. Příklad jednotlivých skupin lze demonstrovat na (+)-strigolu, sloučenině GR 24 a benzoylbutenolidu (*Obr. 1*).



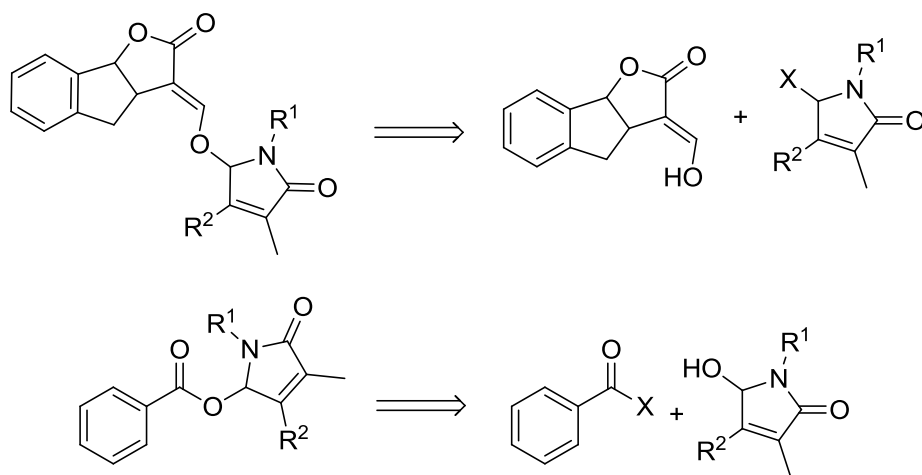
Obr. 1 – Vybraní zástupci přírodních strigolaktonů, strigolaktonových analogů a mimetik.

Vývoj a syntéza nových strigolaktonových analogů a mimetik je důležitá pro plné pochopení biologických dějů v rostlinách, na kterých se podílí. Další jejich potenciální využití je v zemědělství, kde by mohly pomoci regulovat klíčení parazitických rostlin a chránit tak úrodu významných zemědělských plodin.

2 Cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce je vypracování literární rešerše na téma přírodní strigolaktony, strigolaktonová analoga a strigolaktonová mimetika, jejich působení, účinky a syntéza.

Cílem praktické části je příprava strigolaktonových analogů a mimetik, které ve své struktuře obsahují laktamový kruh. Syntéza bude zaměřena na přípravu látek strukturně podobných sloučenině GR 24 a mimetik odvozených od kyseliny benzoové. Nejdříve budou připraveny jednotlivé laktamové kruhy a dále ABC skelet, který je součástí látky GR 24 a syntéza bude zakončena připojováním připravených fragmentů (Obr. 2).



Obr. 2 – Přístup při přípravě strigolaktonových analogů a mimetik.

Nedílnou součástí praktické části bude biologické testování zaměřené na porovnání aktivit mezi připravenými analogy a GR 24, popřípadě inhibiční test ukazující, zda-li se připravené látky budou chovat jako inhibitory, anebo iniciátory klíčení.

3 Teoretická část

3.1 Růstové regulátory

V rostlinné říši se můžeme setkat s nepřeberným množstvím látek, které mohou být produkovány a vylučovány rostlinami v závislosti na prostředí, které je nutí se adaptovat. Množství a složení těchto látek se mění v závislosti na abiotickém nebo biotickém stresu, na který rostliny reagují vyvoláním anebo potlačením jejich biosyntézy.

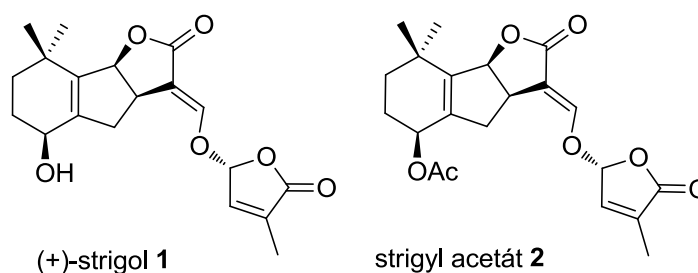
Jako příklad může sloužit reakce rostliny na její poškození. Rostlina je vystavena stresu a dochází k produkci rostlinných hormonů, jako jsou ethylen, jasmonáty a salicyláty. Produkce těchto regulátorů způsobí zvýšení resistance v dalších částech rostliny a dokonce může docházet k ovlivnění rostlin nacházející se poblíž¹. Některé podobné přírodní látky jsou vylučovány v tak malém množství, že jejich izolace je velice obtížná.

Typickým příkladem takových signálních molekul jsou rostlinné hormony strigolaktony, které jsou vylučovány rostlinami do půdy ve velmi malých koncentracích (10^{-10} a méně) a zároveň dochází k jejich rozkladu v rhizosféře, což představuje problém pro jejich izolaci².

3.2 Strigolaktony – objev a funkce

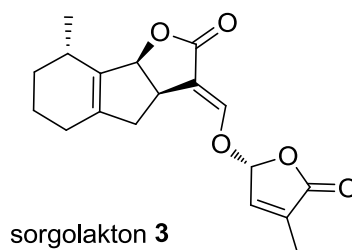
V rostlinné říši můžeme nalézt parazity, kteří ke svému klíčení potřebují chemický stimul, kterému se říká stimulant klíčení. Takovýto stimulant je produkován kořenovým systémem hostitelské rostliny a po úspěšné iniciaci klíčení dochází k napojení parazita na kořeny za pomoci haustorií, díky nimž je možné čerpat živiny³. Parazité patřící do rodů *Orobanche* a *Striga* jsou významnými zástupci vyžadující stimulant klíčení, a proto mezi roky 1940 a 1950 bylo zkoumáno množství rostlin, které by mohly tyto stimulanty obsahovat a zároveň nalezení všech možných hostitelů, kteří jsou napadáni těmito parazity^{4,5}. Brown a kol. na základě experimentů, které byly prováděny na extraktech z rostlinných kořenů předpověděl, že stimulanty klíčení pro parazity rodu *Striga* by mohly obsahovat ve své struktuře laktonový kruh. Tato domněnka byla podpořena relativní stálostí vyzolovaných látek v mírně kyselém prostředí, ale naopak v zásaditém prostředí docházelo k jejich rozkladu⁶.

Izolace prvních konkrétních látek byla úspěšná v roce 1966. Nejdříve byly stimulanty klíčení objeveny v bavlníku (*Gossypium hirsutum*), který není překvapivě hostitelem pro parazity, ale přesto stimulanty obsahoval. Získané látky iniciovaly klíčení semen parazitických rostlin rodu *Striga* a byly pojmenovány (+)-strigol (**1**) a strigyl acetát (**2**) (Obr. 3)⁷.



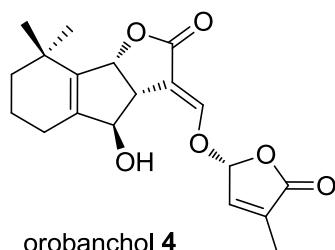
Obr. 3 – (+)-Strigol a strigyl acetát.

O necelých 30 let později bylo zjištěno, že kromě bavlníku lze (+)-strigol (**1**) izolovat i z dalších druhů rostlin jako je čirok (*Sorghum bicolor*), kukuřice (*Zea mays*) a proso (*Panicum miliaceum*)⁸. Z čiroku byl získán kromě (+)-strigolu (**1**) i další strigolakton, který byl pojmenovaný sorgolakton (**3**) (Obr. 4)⁹.



Obr. 4 – Sorgolakton.

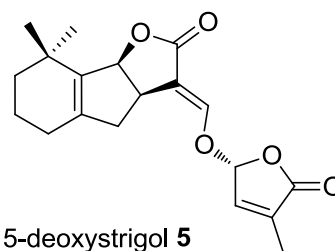
Všechny doposud vyizolované látky iniciovaly klíčení semen rostlin rodu *Striga*, ale nebyly známy stimulanty, které by totéž způsobovaly u parazitů rodu *Orobanche*. První taková látka byla vyizolována v roce 1998 z exudátu kořenů červeného jetele (*Trifolium pretense*) a tato látka byla pojmenována orobanchol (**4**) (Obr. 5)¹⁰.



orobanchol 4

Obr. 5 – Orobanchol.

Zajímavou otázkou bylo, proč by hostitelské rostliny produkovaly strigolaktony, které umožní jejich lokalizaci parazity, kteří poté způsobí jejich úhyn. Tato otázka dovedla vědce k zamyšlení, že musí existovat jiný důvod, kvůli kterému jsou tyto látky vylučovány do půdy. Odpověď byla získána v roce 2005, kdy byl izolován z kořenových exudátů leknínu japonského (*Lotus japonicus*) další strigolakton 5-deoxystrigol (5) (*Obr. 6*). Bylo zjištěno, že tato látka iniciuje vznik symbiózy mezi rostlinou produkující strigolakton a arbuskulárními mykorhizními houbami (AM houby). Dále bylo prokázáno, že kromě iniciace této symbiózy strigolaktony indukují větší větvení hyf u AM hub¹¹.



5-deoxystrigol 5

Obr. 6 – 5-deoxystrigol.

Symbióza je důležitá hlavně z důvodu poskytování životně důležitých živin. AM houby jsou mikroorganismy nacházející se v půdě a získávající živiny pomocí svých hyf z okolního prostředí. Aby symbióza mohla úspěšně probíhat je potřeba kontaktu houby s rostlinou, což se děje pomocí speciálních útvarů, nazývajících se arbuskuly, které jsou napojeny na kořenový systém hostitele. Arbuskuly jsou poté místem, kde dochází k výměně živin mezi houbou a hostitelskou rostlinou, která poskytuje produkty fotosyntézy¹².

Ve stručnosti lze říci, že strigolaktony umožňují klíčení semen parazitických rostlin a iniciují symbiózu. Výše bylo zmíněno, že strigolaktony mohou produkovat i rostliny, které nejsou hostiteli parazitických rostlin. Zajímavým faktem je, že existují

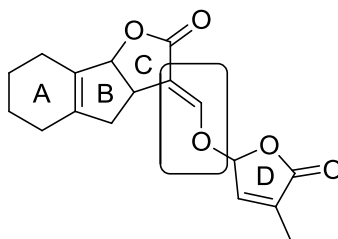
také rostliny, které nejsou hostiteli pro AM houby, a přesto strigolaktony produkují. Mezi takové rostliny se řadí například huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)¹³ anebo lupina bílá (*Lupinus albus*)¹⁴. Na základě těchto poznatků se usoudilo, že strigolaktony mají u rostlin ještě další významnou roli.

Průlom nastal v roce 2008, kdy dva nezávislé týmy objevily, že strigolaktony umožňují inhibici větvení nadzemních částí rostlin. Obě skupiny zkoušely aplikovat vyšší koncentrace strigolaktonů a poté pozorovaly úplné potlačení větvení částí stonku, přičemž Umehara a kol. prováděli testy na mutantech rýže a Gomez-Roldan a kol. na mutantech hrášku. Ze získaných výsledků bylo odvozeno, že by se mohlo jednat o jeden z obranných mechanismů. Rostlina sníží spotřebu živin tím, že potlačí větvení stonku a naopak se bude snažit zajistit maximální symbiózu s AM houbami, které jsou schopny rostlině dodat životně důležité živiny pro její přežití^{15,16}.

3.3 Rozdělení strigolaktonů

3.3.1 Přírodní strigolaktony

Mluví-li se o přírodních strigolaktonech, tak všechny dosud objevené látky obsahují jako základ své struktury tricyklický lakton, který je nazýván jako ABC skelet. Další důležitou součástí je enoletherové spojení (Obr. 7), které spojuje ABC skelet a furanový kruh, který je označován jako D-kruh. U přírodních strigolaktonů je důležité uvést, že kromě změn na základním skeletu hraje podstatnou roli stereochemie, která zásadně ovlivňuje biologickou aktivitu strigolaktonů. Stereochemie strigolaktonů bude probrána v kapitole 3.7.



Obr. 7 – Obecné schéma struktury přírodních strigolaktonů.

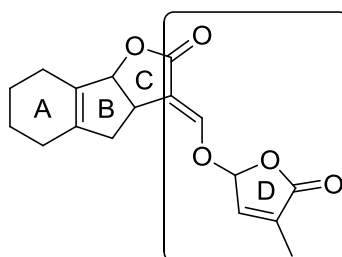
V roce 2005 bylo zjištěno, že přírodní strigolaktony jsou odvozené od karotenoidů, jelikož jejich biosyntéza je odvozená od biosyntézy karotenoidů, kde se

především uplatňují dioxygenasy, které jsou schopny odštěpit karotenoidní zbytek a poté následnou kaskádou reakcí vznikají přírodní strigolaktony¹⁷. Biosyntéza strigolaktonů bude podrobněji probrána v kapitole 3.6.

3.3.2 Strigolaktonová analoga

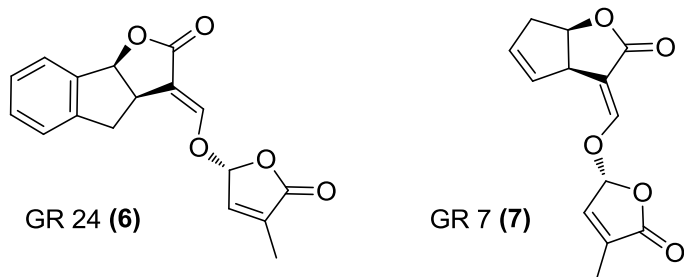
Jak již bylo zmíněno, přírodní strigolaktony se v rostlinách, popřípadě v půdě, nachází ve velmi malých koncentracích a jejich izolace by byla obtížná a nákladná. Další možností je totální syntéza, ale vzhledem k množství chirálních center a rozmanité strukturní variabilitě patří tato cesta mezi méně efektivní.

Řešením je příprava strukturně jednodušších derivátů (strigolaktonových analogů), které by si zachovaly biologickou aktivitu přírodních strigolaktonů. Takové látky ve své struktuře obsahují D-kruh, který je připojený ke zbytku molekuly pomocí enoletherového spojení (*Obr. 8*).



Obr. 8 – Důležitá část strigolaktonových analogů.

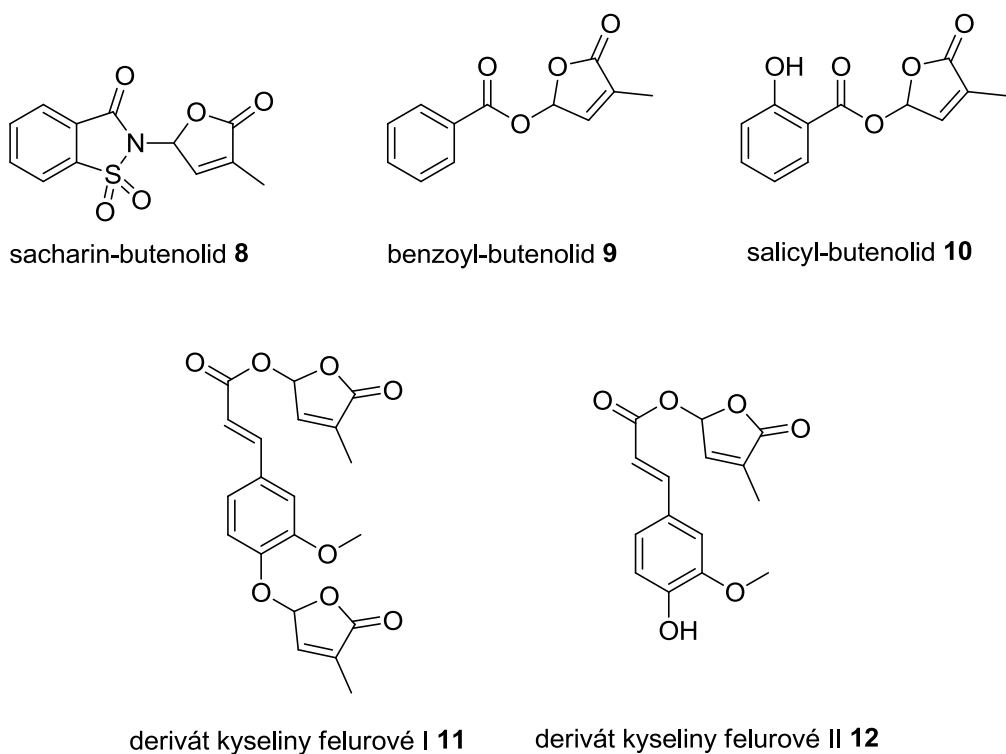
Významnou skupinou strigolaktonových analogů jsou látky, které byly připraveny týmem profesora Johnsona. Jedná se o sloučeniny, které jsou dodnes označovány zkratkou GR. Tyto látky mají jednodušší strukturu, a ačkoliv jejich aktivita je menší než u přírodních strigolaktonů, tak jejich výhodou je jednodušší příprava. Významnými zástupci jsou látky GR 24 (**6**) a GR 7 (**7**) (*Obr. 9*)^{18,19}.



Obr. 9 – Strigolaktonová analoga GR 24 a GR 7.

3.3.3 Strigolaktonová mimitika

Poslední a zároveň nejjednodušší skupinou strigolaktonů jsou strigolaktonová mimitika. Tyto látky obsahují oproti výše zmiňovaným pouze D-kruh, který je připojen ke zbytku struktury. Některé vybrané struktury jsou na Obr. 10.



Obr. 10 – Vybraná strigolaktonová mimitika.

Předložené struktury znázorňují variabilitu strigolaktonových mimitik. D- kruh může být navázán v podstatě na jakýkoliv snadno odstupující zbytek struktury, což je odvozeno od předpokládaného mechanismu působení²⁰.

3.4 Předpokládané mechanismy působení strigolaktonů

Prvním krokem ve všech bioprocesech, které strigolaktomy iniciují, je interakce s receptorem, po které dochází ke kaskádě reakcí a vyvolání odpovědi ve formě klíčení semen parazitů, iniciaci symbiózy, anebo inhibici větvení.

V raných stádiích výzkumů zabývající se strigolaktomy nebyl znám protein, se kterým jsou schopny interagovat, a proto byl v roce 1992 navržen mechanismus odvozený na základě chemických poznatků. Tento model předpokládal přítomnost nukleofilu v aktivním místě proteinu, který reaguje se strigolaktonem adičně-eliminacním mechanismem za současného odštěpení D-kruhu. Zbytkový ABC kruh je vázán v receptoru a způsobuje pravděpodobně změnu konformace proteinu, která spustí kaskádu reakcí. Tato domněnka byla potvrzena reakcemi s různými nukleofily (benzenthiolát, *p*-methoxybenzylamin), které nahradily D-kruh v molekule GR 24 (**6**)²¹. Navržený mechanismus je znázorněn na Schématu 1 a zahrnuje přírodní strigolaktomy a strigolaktonová analoga, které obsahují enoletherové spojení.

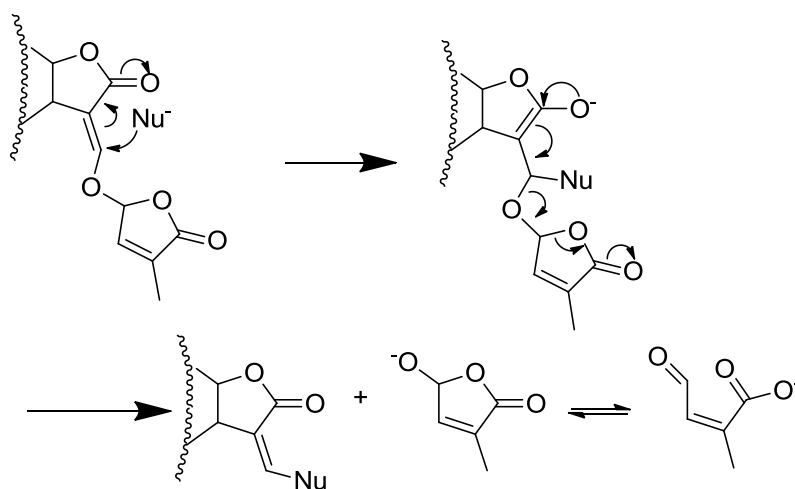


Schéma 1 – Navržený mechanismus působení přírodních strigolaktonů a strigolaktonových analog.

V posledních letech bylo hlavním cílem najít a identifikovat protein interagující se strigolaktomy, popřípadě zjistit jakým mechanismem se šíří signál vyvolávající biologickou odpověď.

Prvním střípkem bylo objevení genu, uplatňující se v transdukci signálu strigolaktonů. Tento gen byl nalezen v petunii a má označení *DAD2*. Produktem tohoto

genu je protein DAD2 patřící mezi α/β hydrolasy. Zároveň z krystalové struktury bylo zjištěno, že v kavitě tohoto enzymu se nachází katalytická triáda aminokyselin Ser-His-Asp, která se strigolaktonem interaguje. Testy probíhaly tak, že vyizolovaný DAD2 protein byl inkubován s racemickou GR 24 (**6**). Na základě HPLC-MS analýzy bylo zjištěno, že se ve vzorku nenachází žádná výchozí látka, ale pouze formylovaný ABC kruh (ABC=CHOH) spolu s neznámou látkou, která byla pokládána za artefakt²².

O rok později byly objeveny proteiny patřící do stejné rodiny hydrolas jako DAD2. Jednalo se o protein D14 (DWARF14), který byl vyizolován z rýže a D14 (D14L) izolovaný z *Arabidopsis thaliana*^{23,24}. Zároveň byl proveden podobný test, kdy byla látka GR 24 (**6**) inkubována s proteinem D14, kde byla zjištěna přítomnost formylovaného ABC kruhu (ABC=CHOH), ale také hydroxy D-kruhu (D-OH)²⁵. Zhao a kolektiv se snažili získat krystalovou strukturu tohoto proteinu s navázanou GR 24 (**6**). Byl navržen mechanismus, kde se zapojuje triáda aminokyselin Ser-His-Asp. Po odstoupení formylovaného ABC kruhu, je druhým produktem hydrolýzy otevřený D-kruh na kterém je navázaný Serin účastníci se iniciace hydrolýzy. Dalším krokem je pravděpodobně isomerizace dvojně vazby a následná konjugovaná adice vody, která poskytuje pozorovaný intermediát navázaný na serin proteinu D14. Laktonizací a eliminací vody vzniká hydroxy butenolid (D-OH) (*Schéma 2*)²⁴.

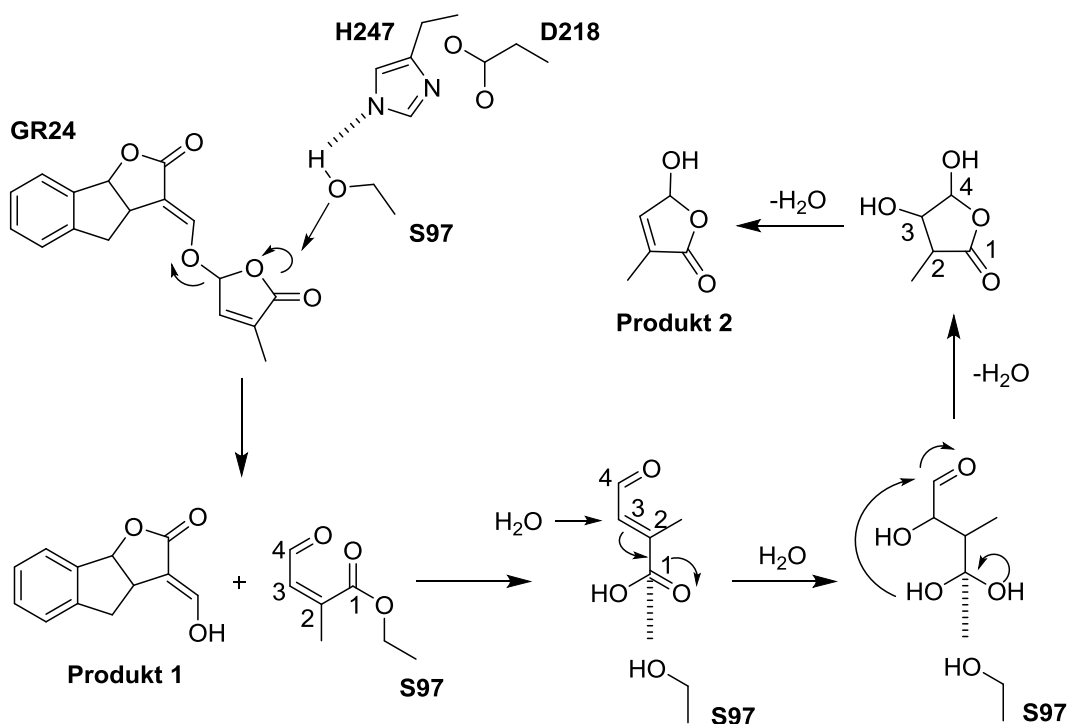
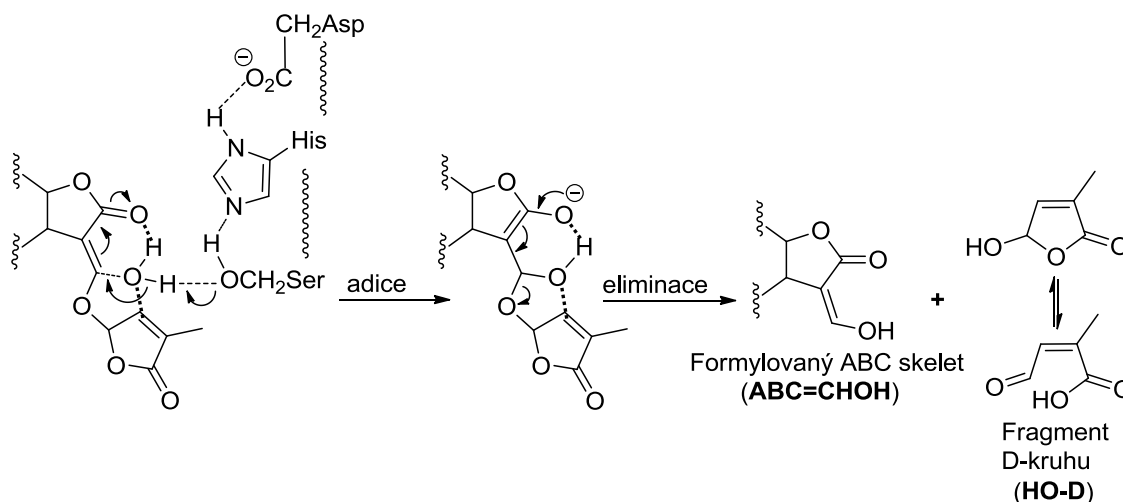


Schéma 2 – Navržený mechanismus hydrolýzy GR 24 v proteinu D14.

Výše zmíněný mechanismus neposkytuje ideální vysvětlení, jak by mohlo docházet k odštěpení D-kruhu, nicméně byl navržen další mechanismus, který je více realistický a navazuje na mechanismus znázorněný na Schéma 1. Zde se předpokládá, že dochází ke koordinaci vody s C a D- kruhem strigolaktonů, což vede k zastavení rotace D-kruhu. Tato koordinace způsobí zvýšení entropie a umožní reakci vedoucí k odštěpení hydroxy butenolidu od formylovaného ABC kruhu za podpory triády aminokyselin Ser-His-Asp (Schéma 3)²⁶.



Prozatím jsou jednotlivé mechanismy pouhými návrhy a u obou případů je důležité upozornit, že se zabývají pouze interakcí s receptory v rostlinách, která může fungovat odlišným mechanismem než v případě AM hub.

Strigolaktonová mimetika jsou důležitými deriváty, jelikož jsou strukturně jednodušší oproti přírodním strigolaktonům a strigolaktonovým analogům, ale biologická aktivita je zachována. Jak již bylo dříve uvedeno, tyto mimetika postrádají enoletherové spojení a tudíž se předpokládá, že jejich mechanismus působení bude jiný. S prvním návrhem přišel profesor Zwanenburg a mechanismus spočívá opět v Michaelově adici na D-kruh v pozici C4, následně dochází k protonovému transferu a konečné eliminaci odstupující skupiny (Schéma 4)²⁰. Později bylo zkoumáno, jestli přítomnost methylové skupiny v pozici C4 bude mít vliv na klíčení semen parazitů. Ukázalo se, že tato připravená mimetika nevykazují aktivitu v iniciaci klíčení semen parazitické rostliny *Striga hermonthica*²⁶.

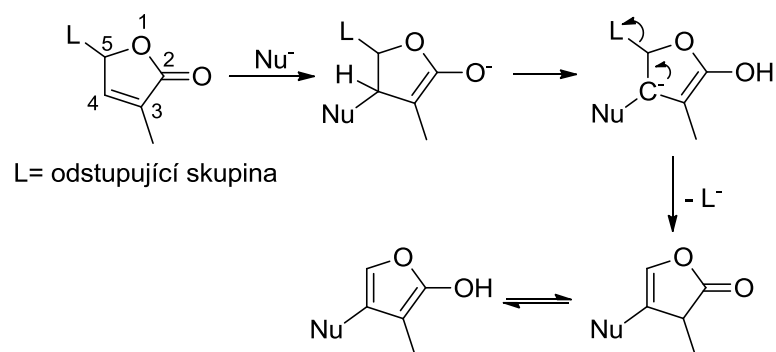


Schéma 4 – Pravděpodobný mechanismus strigolaktonových mimetik.

Zmíněný mechanismus byl aktualizován. Například butenolidy mající v pozici C-5 aryloxyový zbytek jsou pravděpodobně hydrolyzovány za odštěpení D-OH kruhu a ten poté způsobí konformační změny proteinové kapsy podobně, jako je popsáno v kapitole 3.5.

Mechanismus spočívá v Michaelově adici vody na butenolid, následována intramolekulární transesterifikací za vzniku D-OH a kyseliny obsahující arylový zbytek. Také se předpokládá, že pokud je přítomná methylová skupina na pozici C4, tak nemůže dojít k adici vody, která je důležitá pro tuto dráhu (Schéma 5)²⁷.

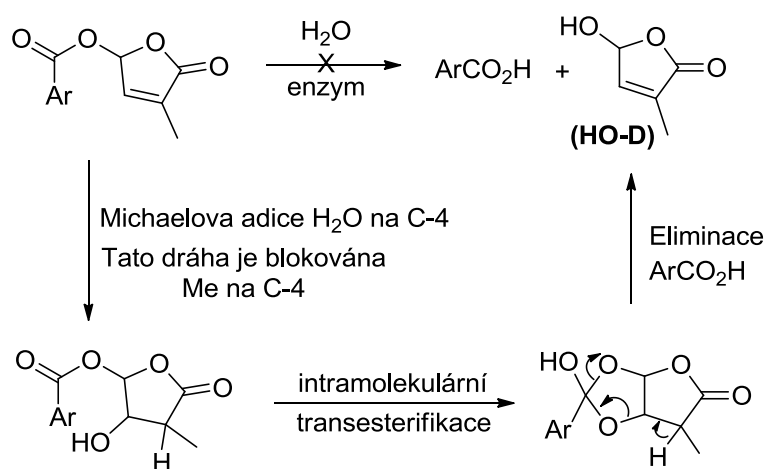


Schéma 5 – Novější mechanismus působení strigolaktonových mimetik.

Další skupinou strigolaktonových mimetik jsou debranony, které obsahují acetalový typ spojení a tudíž pro ně nemůže platit stejný mechanismus jako pro butenolidy obsahující aryloxy skupinu. V roce 2015 přišli vědci s tím, že i tyto látky se štěpí na D-OH a zbytek struktury. Tento závěr byl odvozen na základě testů se strigolaktonovými mimiky, které měly v pozici C-5 fluorescenční značku na bázi

fluoresceinu. Tato látka byla testována na semenech *Striga hermonthica*, kde všechna vyklíčená semena vylučovala fluorescenční fluorescein (Schéma 6).

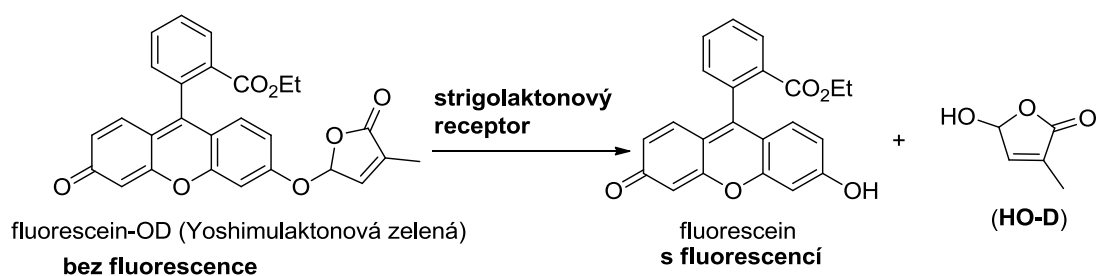


Schéma 6– Fluoresceinem značené strigolaktonové mimikum.

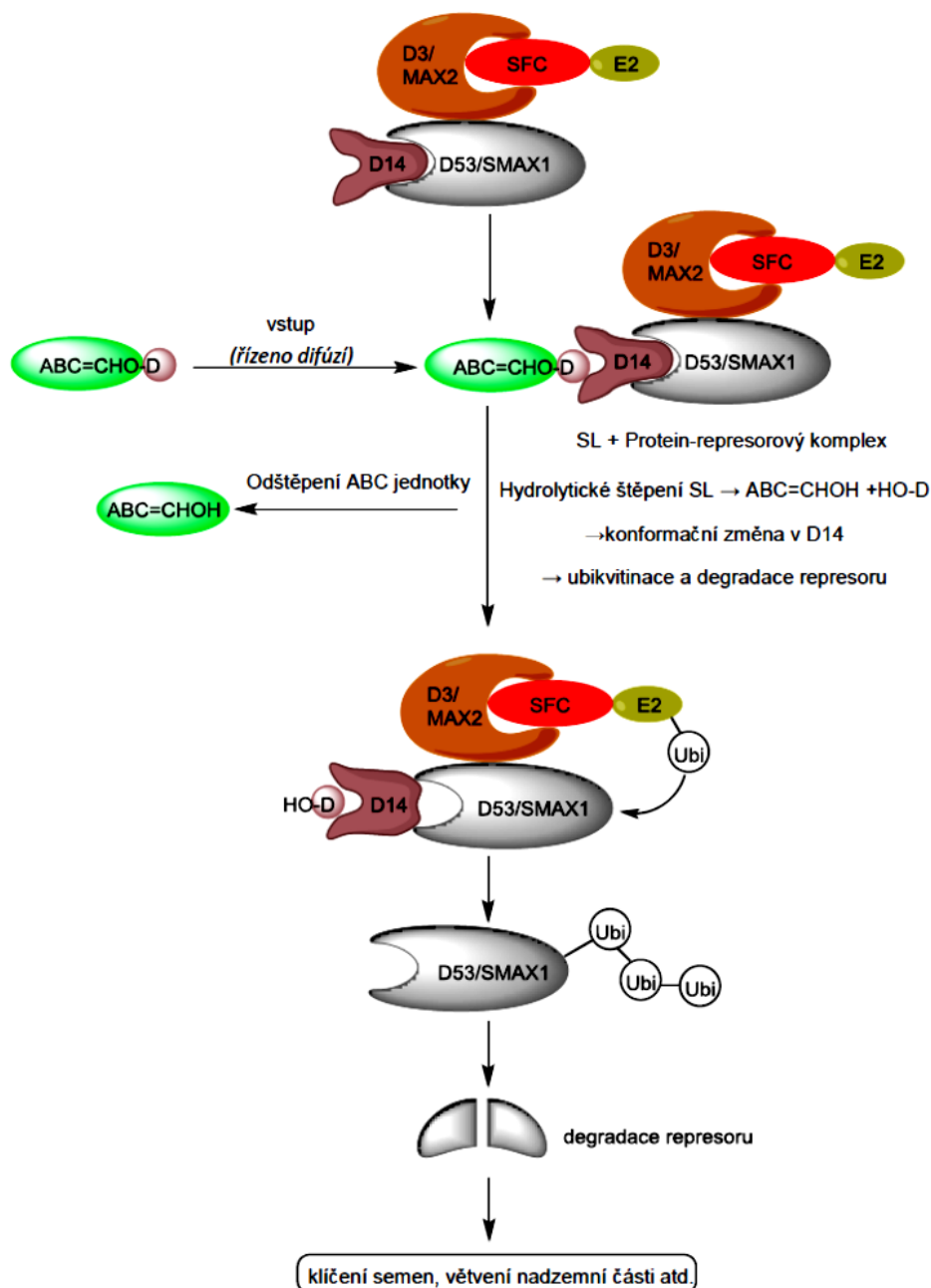
3.5 Působení strigolaktonů na molekulární úrovni

Objevení proteinu, který je schopen interagovat se strigolaktony je první krok k pochopení, jak tyto rostlinné hormony působí. Po objevení proteinu DAD2 byly provedeny experimenty za pomoci dvouhybridního systému, umožňující zjistit protein-proteinové interakce. Výsledkem bylo objevení interakce mezi DAD2 a PhMAX2 (jeden z D3 homologů, což je skupina proteinů působící jako F-box proteiny), ale pouze pokud byla přítomna GR 24, bez přidané látky k interakci nedocházelo²². PhMAX2 je sám o sobě součástí tzv. SFC komplexu (Skp, Cullin, F-box obsahující komplex) ve kterém je F-box proteinem. Tento komplex se řadí mezi multikomponentní E3 ligasy katalyzující ubikvitinaci proteinů umožňující jejich degradaci v proteasomu.

Jak již bylo dříve uvedeno, transdukce signálu strigolaktonů patrně začíná za účasti α/β hydrolasy. Strigolaktony jakožto rostlinné hormony nejsou jedinými zástupci, kteří jsou schopni interagovat s tímto enzymem. Další skupinou hormonů, které využívají α/β hydrolasu k transdukci signálu jsou gibereliny, které se váží do receptoru *GID1*, který vlivem ligandu mění svou konformaci a spouští signální dráhu²⁸. Ještě před objevením struktury *GID1* receptoru se vědělo, že se gibereliny nejspíše vážou do receptoru a poté dochází k interakci s proteinem *SLR1*, který patří do skupiny *DELLA* proteinů, které způsobují potlačení indukce signálů giberelinů²⁹.

Otázka zněla, jestli signální dráha giberelinů může být podobná té strigolaktonové. Prvním krokem bylo zjištění strukturní podobnosti mezi *GID1* a *D14* (*DAD2*, *D14L*) proteiny pomocí rentgenové strukturní analýzy, díky níž se zjistilo, že *GID1* obsahuje helikální víko, které *D14* nemá. Nicméně bylo několika nezávislými týmy potvrzeno, že triáda aminokyselin Ser-His-Asp, způsobí odštěpení hydroxy

D-kruhu (D-OH) od zbytku strigolaktonů. D-OH se naváže do kavity proteinu DL14. Změna konformace aktivuje zformovaný komplex, který způsobí degradaci represoru v proteasomu^{24,25,30}. Celá sekvence je schematicky znázorněna na Obr. 11. Pokud se hydroxy D-kruh aplikuje bez zbytku struktury, nedojde k žádnému účinku. Předpokládá se, že ABC kruh vytváří lipofilní obal a je důležitý pro transport D-kruhu k receptoru²⁷.



Obr. 11 – Pravděpodobné působení strigolaktonů na molekulární úrovni.

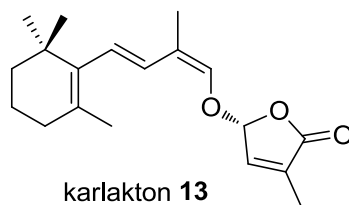
Navíc bylo zjištěno na mutantech rýže, že signální dráhu může ovlivnit další protein, který je kódován genem *D53* a jeho produkt je substrátem pro SCF ubikvitinační komplex, který způsobí ubikvitinaci proteinu *D53* a jeho následnou degradaci v proteasomu a tím vyvolání inhibice větvení. Naopak pokud je *D53* mutován tak nemůže být ubikvitinován a následně degradován. V rostlině dochází k hromadění proteinu *D53*, což vede k inhibici signálu strigolaktonů a následné změně fenotypu, který se vyznačuje větším větvením³⁰.

Receptor pro strigolaktony v rostlinách byl nalezen, ale potvrzení zda signální dráhami iniciací klíčení semen parazitických rostlin je totožná nebylo provedeno.

3.6 Biosyntéza strigolaktonů

V roce 2005 se předpokládalo, že přírodní strigolaktony jsou biosyntetizovány podobnou cestou jako karotenoidy. Domněnka byla podpořena testy na mutantech rýže, kteří měli pozměněný metabolismus karotenoidů, popřípadě byly aplikovány inhibitory jejich syntézy. Následně byly odebrány kořenové exudáty a testovány, zda-li iniciují klíčení semen parazitických rostlin *Striga hermonthica* a *Orobanche crenata*. V případě *S. hermonthica* exudáty iniciovaly klíčení u 49 % semen, po aplikaci inhibitoru syntézy karotenoidů vedlo ke snížení klíčivosti na 11 %. V případě *O. crenata* byly hodnoty 20 % a po aplikaci inhibitoru se klíčivost snížila na 4 %¹⁷.

O tři roky později byla domněnka potvrzena dalšími dvěma nezávislými týmy. Jednalo se o stejné skupiny, které se postaraly o objevení funkce strigolaktonů jakožto inhibitorů větvení nadzemních částí. Použité mutanty rýže, popřípadě hrachu, měly mutaci způsobující nižší aktivitu štěpících enzymů dioxygenasy 7 (CCD7) a dioxygenasy 8 (CCD8), uplatňující se v biosyntéze karotenoidů. U těchto mutantů bylo zjištěno, že jsou strigolaktonově deficientní^{15,16}.

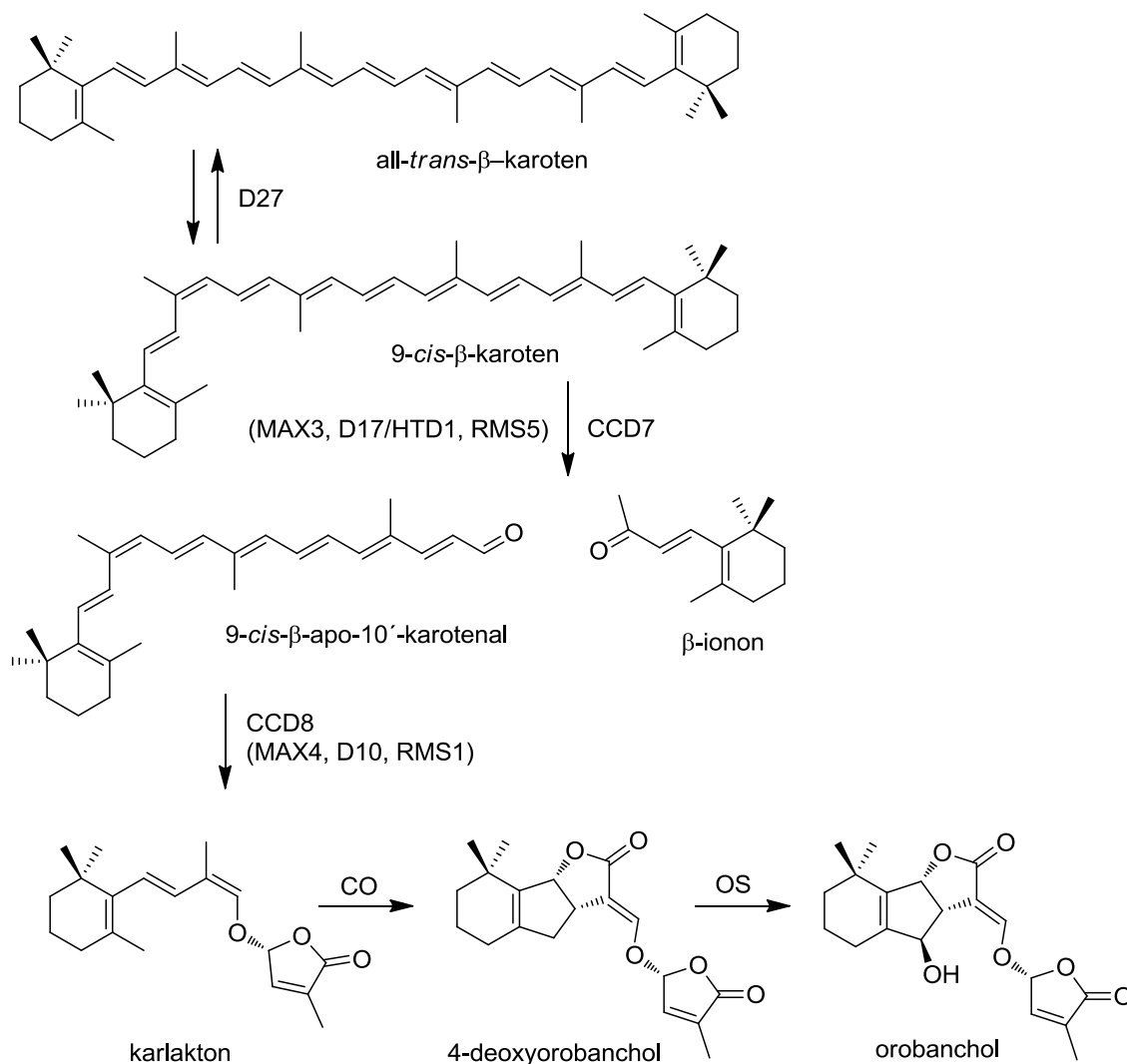


Obr. 12 – Struktura karlaktonu – prekurzor přírodních strigolaktonů.

Prvním krokem biosyntézy strigolaktonů je reversibilní reakce katalyzovaná proteinem D27 umožňující 9-*cis*/all *trans* izomeraci β -karotenu. Následně se do biosyntézy zapojuje enzym CCD7, který stereospecificky štěpí dvojnou vazbu 9-*cis*- β -karotenu v pozicích C9'-C10'. U tohoto enzymu, ať už byl přítomný v *Arabidopsis* (MAX3), rýži (D17/HTD1) nebo hrachu (RMS5), bylo prokázáno, že hlavním substrátem je výše zmíněný 9-*cis*- β -karoten a například all-*trans*, 13-*cis*, 15-*cis* isomery štěpení nepodléhaly. Po štěpení enzymem CCD7 vznikají dva produkty – β -Ionon a 9-*cis*- β -apo-10'-karotenal, který je dále modifikován enzymem CCD8 (*Arabidopsis* – MAX4, rýže – D10, hrách – RMS1). U tohoto enzymu bylo zjištěno, že po aplikaci all-*trans*- β -apo-10'-karotenalu vzniká β -apo-13-karotenon, ale pokud byl aplikován 9-*cis*- β -apo-10'-karotenal, tak vzniká důležitý meziprodukt karlakton (**13**) (Obr. 12), který byl chybějícím článkem ukazující spojení biosyntézy mezi karotenoidy a přírodními strigolaktony. Přesný mechanismus není zatím znám, nicméně je určitý návrh, který se snaží vysvětlit vznik tohoto meziproduktu. Předpokládá se, že CCD8 je schopný katalyzovat kombinaci reakcí jako jsou například *cis/trans* izomerace, opakované oxidace, popřípadě přesmyky podobající se Baeyer-Villiger oxidaci. Během působení enzymu CCD8 by mělo docházet ke vzniku druhého produktu, který zatím nebyl identifikován, což je patrně způsobeno velice nízkou stabilitou této látky³¹.

Cytochromy P450 jsou monooxidas, které ve své struktuře obsahují hem a jsou schopny katalyzovat širokou škálu reakcí (C-hydroxylace, epoxidace, oxygenace a atd.)³². Protein MAX1, nacházející se v *Arabidopsis*, patří do rodiny cytochromů CYP711. Vědci se snažili zjistit, jestli MAX1 působí ve stejné biosyntetické dráze jako proteiny MAX3 a MAX4, které se podílí na biosyntéze strigolaktonů. Zajímavé je, že protein MAX1 obsahuje ve své struktuře tzv. kotvící místo pro endoplazmatické retikulum a na základě tohoto poznatku se usoudilo, že by se tento protein měl nacházet v cytosolu, na rozdíl od proteinů D27, CCD7 (MAX3) a 8 (MAX 4), které se nachází uvnitř plastidu³³. V roce 2013 bylo potvrzeno, že se MAX1 účastní stejné biochemické dráhy jako MAX3 a 4. Seto a kol. objasnili, že MAX1 se podílí na přeměně karlaktonu, což dokázali aplikací ¹³C značeného karlaktonu k proteinu MAX1. Výsledkem byla konverze karlaktonu na látku strigolaktonového typu, která ale nebyla zatím identifikována³⁴.

Je zajímavé, že například v genomu rýže lze nalézt 5 homologních genů *MAX1* a všechny tyto geny mohou produkovat proteiny, které se mohou účastnit biosyntézy strigolaktonů. Všechny tyto homologní geny byly exprimovány v kombinaci s geny *OsD27*, *OsCCD7 (D17)* a *OsCCD8 (D10)*. Prvním ze zkoumaných homologů byl gen *Os900*, který v kombinaci s geny potřebnými pro tvorbu karlaktonu (*OsD27*, *OsCCD7*, *OsCCD8*) způsobil významné snížení množství karlaktonu. Naopak došlo k produkci *ent-2'-epi* deoxystrigolu (4-deoxyorobanchol), což bylo ověřeno pomocí chirální LC/MS/MS. I ostatní homologní geny, které byly exprimovány vykazovaly produkci *ent-2'-epi* deoxystrigolu, ale je důležité podotknout, že v mnohonásobně nižším množství. Dokonce i kvasinky, které jsou schopny exprimovat gen *Os900*, dokázaly zprostředkovat syntézu 4-deoxyorobancholu z karlaktonu (**13**). Tyto výsledky demonstrují, že protein Os900 je enzym katalyzující oxidaci karlaktonu za tvorby strigolaktonů orobancholového podtypu, kdy umožňuje stereospecificky vytvořit spojení mezi B a C kruhem (*Obr. 13*)³⁵.



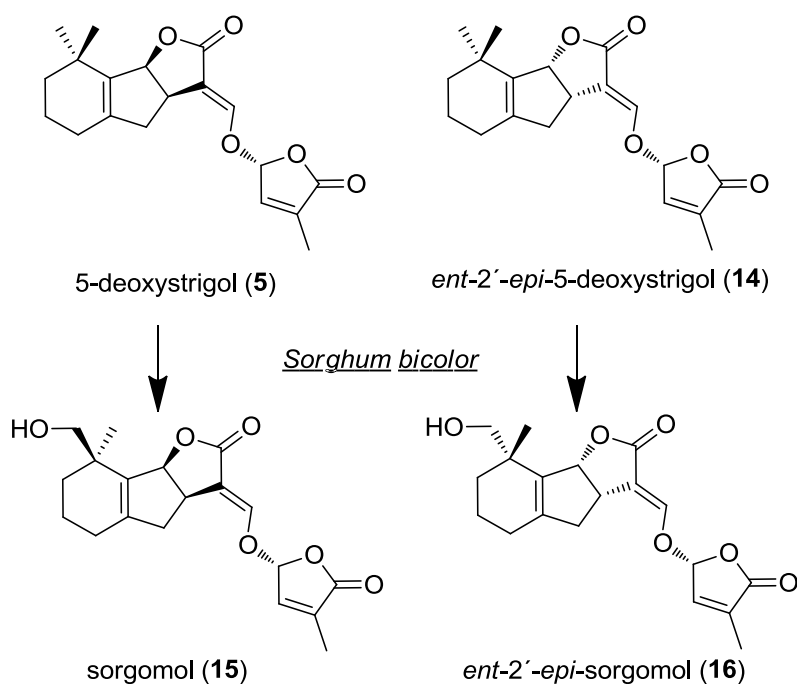
Obr. 13 – Biosyntéza přírodních strigolaktonů.

Dále bylo studováno, jestli se ostatní *MAX1* homologní geny účastní dalších kroků biosyntézy. Bylo zjištěno, že pokud byl exprimován gen *Os1400*, tak dochází ke snížení množství 4-deoxyorobancholu a ke zvyšování množství přírodního orobancholu (**4**) a předpokládá se, že enzym *Os1400* je orobanchol synthasa. Navíc se z těchto výsledků usuzuje, že nejdříve dochází k tvorbě 4-deoxyorobancholu a až poté dochází k modifikacím na B-C kruhu vedoucí k přírodním strigolaktonům orobancholového typu³⁵.

Uvažuje se, že diversita strigolaktonů je dána právě modifikacemi na už zformovaném ABC skeletu. Domněnka byla podpořena biotesty, které se prováděly na čiroku (*Sorghum bicolor*). K testované rostlině byl přidán deuteriem značený 5-deoxystrigol (**5**) (Obr. 14) a *ent*-2'-*epi*-5-deoxystrigol (**14**) (Obr. 14). Tyto značené

látky byly absorbovány kořeny a přeměněny na sorgomol (**15**) (Obr. 14) a *ent*-2'-*epi*-sorgomol (**16**) (Obr. 14), které byly poté izolovány z kořenových exudátů. Schéma přeměny je znázorněno na Obr. 14. Pokud byl zároveň aplikován inhibitor cytochromu P450 k této konverzi nedocházelo a přítomnost těchto enzymů je patrně důležitá pro tvorbu přírodních strigolaktonů v rostlinách³⁶.

Porozumění biosyntézy strigolaktonů tak zatím není kompletní a je potřeba vyplnit mnoho mezer než bude pochopeno, jak je rostlina schopna tyto hormony syntetizovat.



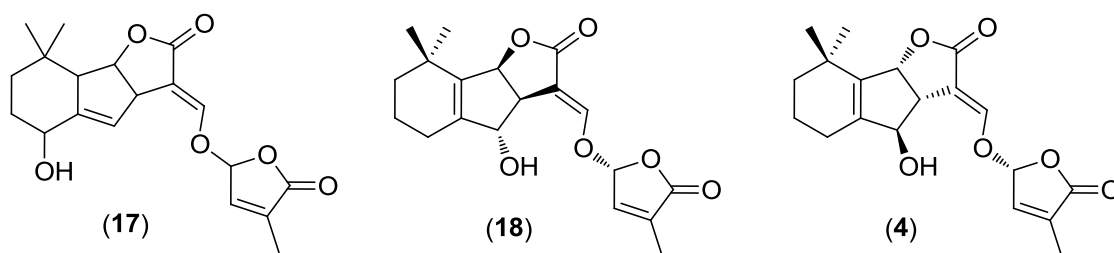
Obr. 14 – Přeměny 5-deoxystrigolu a *ent*-2'-*epi*-5-deoxystrigolu.

3.7 Stereochemie strigolaktonů

Už při zběžném pohledu na všechny přírodní strigolaktony lze vypozařovat, že ve své struktuře obsahují několik chirálních center a zjistit přesnou strukturu jednotlivých zástupců nebylo vždy jednoduché.

Jako příklad lze uvést orobanchol, který byl izolován už v roce 1998 z kořenových exudátů červeného jetele a jeho struktura byla pouze navržena na základě spektrálních dat¹⁰. Aby se potvrdila struktura orobancholu, která byla navrhnutá, syntetizoval Matsui a kolektiv deriváty, které by mohly odpovídat navržené struktuře a ty pak byly jednotlivě porovnány s látkou nacházející se v kořenových exudátech za pomoci GC-MS. Původně navržená struktura obsahovala OH skupinu na A kruhu (**17**)

(Obr. 15). Po jejich syntéze bylo zjištěno, že spektrální data neodpovídají. Naopak se shodovala spektra jiné připravené látky (**18**) (Obr. 15). Mori a kolektiv předpokládali, že hledaným strigolaktonem je struktura (**18**) (Obr. 15) a že stereochemie odpovídá (+)-strigolu (**1**). Navíc se po těchto zjištěních a úvahách věřilo, že všechny přírodní strigolaktomy mají absolutní stereochemii podobnou (+)-strigolu (**1**)³⁷.

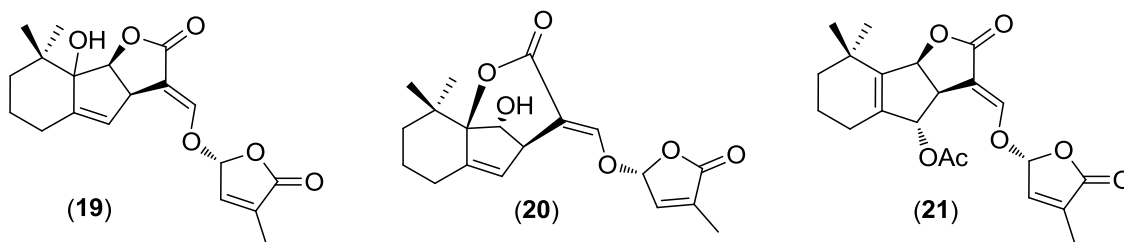


Obr. 15 – Předpokládané struktury **17**, **18** a správná struktura orobancholu **4**.

Zlom nastal v roce 2011, kdy se znovu prověřovaly aktivní látky z kořenových exudátů červeného jetele, kdy bylo prokázáno, že struktura orobancholu, která byla navržena v roce 1999, odpovídá, ale absolutní stereochemie je odlišná. Tím bylo vyvráceno, že je orobanchol (**4**) odvozen od (+)-strigolu (**1**)³⁸.

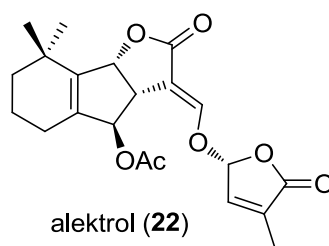
Neméně zálučné bylo objevování struktury alektrolu, který byl objeven a izolován z luštěniny vigna v roce 1992. Prvními předpoklady, jak by mohl alektrol vypadat, byly odvozeny na základě fyzikálně-chemických vlastností a chování během chromatografických analýz, které byly vztaženy vzhledem k vlastnostem vůči (+)-strigolu (**1**). Navržená struktura (**19**) je znázorněna na Obr. 16. Zároveň se předpokládalo, že stereochemie odpovídá (+)-strigolu (**1**)³⁹. V roce 1998 se Mori a kolektiv pokoušeli strukturu (**19**) (Obr. 16) připravit, což se jim povedlo, ale na základě srovnání spektrálních a chromatografických dat zjistili, že se nejedná o tutéž přírodní látku⁴⁰. Hned v témže roce byla jiným týmem navržena odlišná struktura, která by mohla odpovídat spektrálním datům, které byly prozatím získány⁴¹. Zda-li tato struktura opravdu odpovídá přírodnímu alektrolu, bylo upřesněno až o 10 let později, kdy se skupina profesora Zwanenburga pokoušela strukturu (**20**) syntetizovat. Totální syntéza byla úspěšná až do poslední kroku, kde zbývalo odštěpit silylovou chránící skupinu, která se nacházela na hydroxy skupině. Během deprotektce došlo ke spontánní intramolekulární transesterifikaci a vzniku původní navržené struktury (**19**) (Obr. 16)⁴².

Struktura alektrolu zůstávala zatím neobjasněna, ale v roce 2008 bylo zjištěno, že alektrol lze izolovat i z jetele. Na základě detailních spektrálních a chromatografických analýz byla odvozena už třetí struktura, jak by mohl alektrol vypadat. Jednalo se o orobanchyl acetát (**21**) (*Obr. 16*), který již byl syntetizován, ale bohužel pro nedostatek dat, se kterými by se dala izolovaná struktura porovnat, nebylo potvrzeno, jestli se jedná opravdu o alektrol⁴³.



Obr. 16 – Přepokládáné struktury alektrolu.

O tři roky později, byla konečně potvrzena správná struktura alektrolu, který lze izolovat z vigny a jetele. Během zjišťování se alektrol izoloval z kořenových exudátů jetele. Kromě spektrálních a chromatografických dat se také zjišťovalo, jak je izolovaná látka schopna stáčet rovinu polarizovaného světla, popřípadě byly změřena CD spektra, ve kterých se využívá cirkulárně polarizované světlo. Po těchto měřeních byla jednoznačně zjištěna struktura alektrolu (**22**) (*Obr. 17*), včetně jeho absolutní stereochemie³⁸.

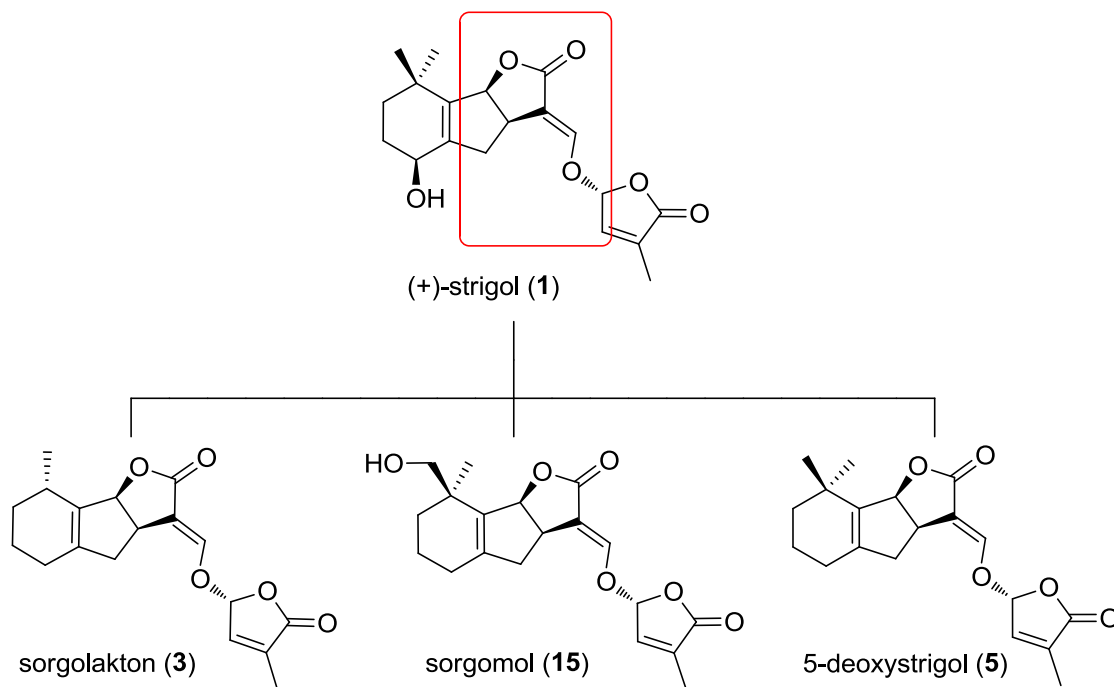


Obr. 17 – Struktura alektrolu.

Oba dva zástupci demonstrují složitost a rozmanitost těchto přírodních látek, u kterých hraje zásadní roli jejich stereochemie, kterou není vždy jednoduché určit.

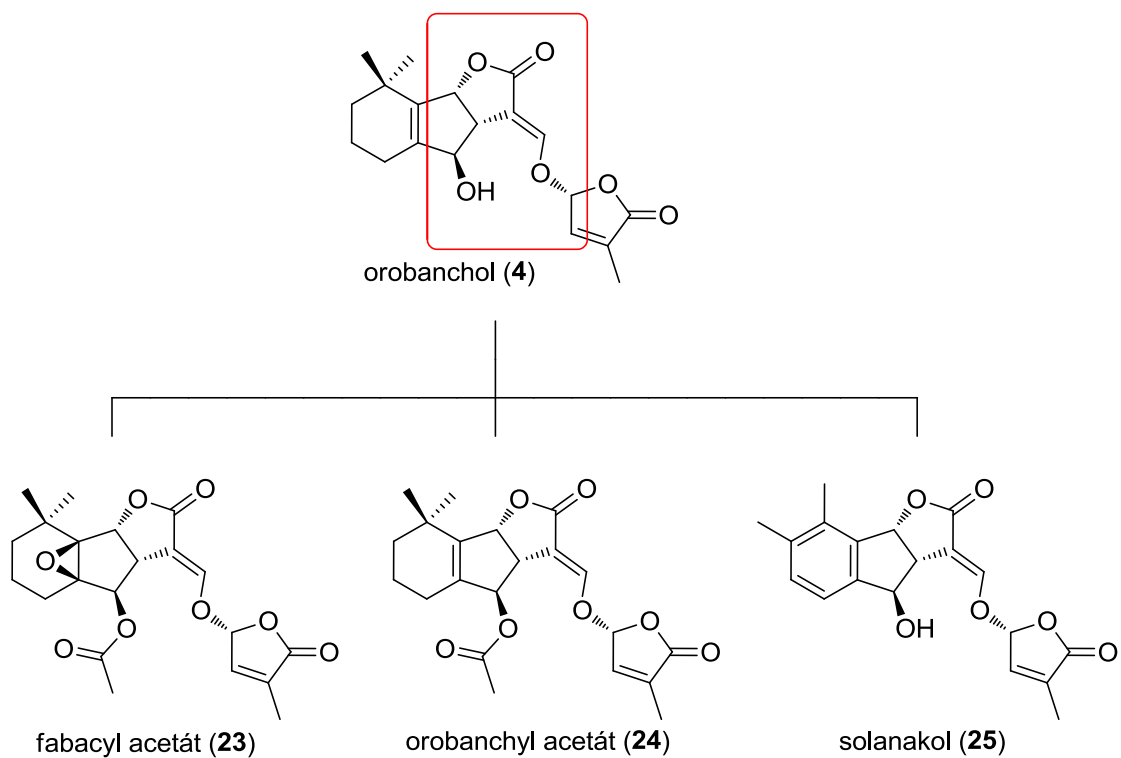
Do této chvíle bylo nalezeno přibližně 10 přírodních strigolaktonů mezi něž patří například výše zmíněný (+)strigol (**1**), sorgolakton (**3**) a orobanchol (**4**). Na základě absolutní stereochemie dosud známých přírodních strigolaktonů, lze jednotlivé zástupce

rozdělit do dvou skupin (rodin). První skupinou jsou strigolaktony, které mají ve své struktuře stejnou stereochemii BCD spojení jako přirozeně se vyskytující (+)strigol (**1**). Do této rodiny lze zařadit přírodní strigolaktony jako jsou (+)-sorgolakton (**3**), (+)-sorgomol (**15**), (+)-deoxystrigol (**5**) (*Obr. 18*)⁴⁴.



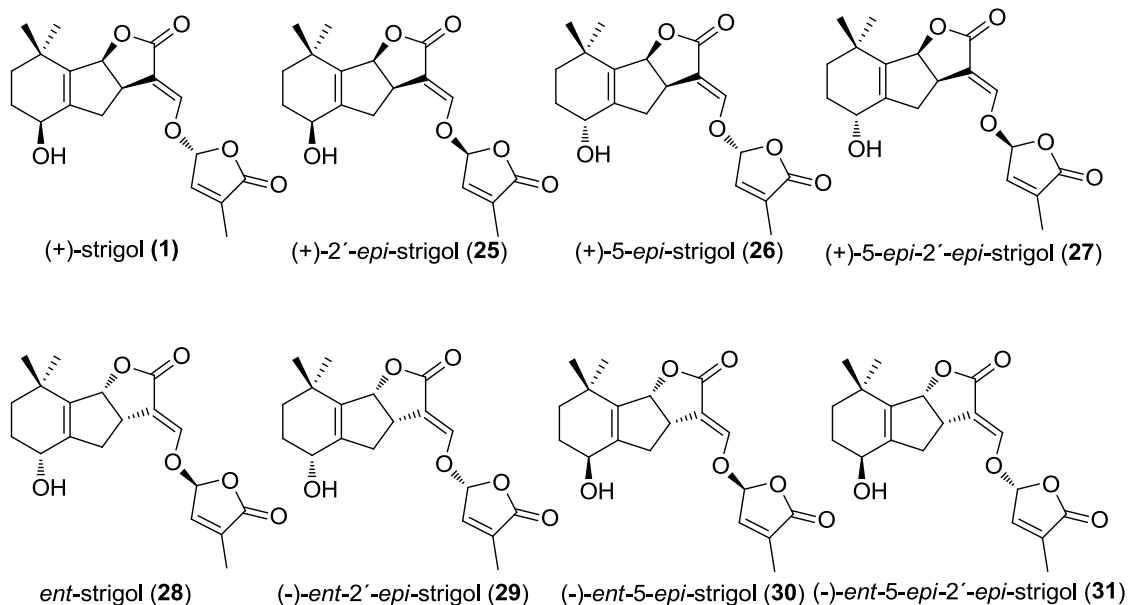
Obr. 18 – Přírodní strigolaktony patřící do rodiny odvozené od (+)-strigolu.

Druhou rodinou jsou pak přírodní strigolaktony, které mají stereochemii BCD spojení odvozenou od přirozeně se vyskytujícího orobancholu (**4**). Zde se řadí například fabachyl acetát (**23**), orobanchyl acetát (**24**) a solanakol (**25**) (*Obr. 19*)⁴⁴.



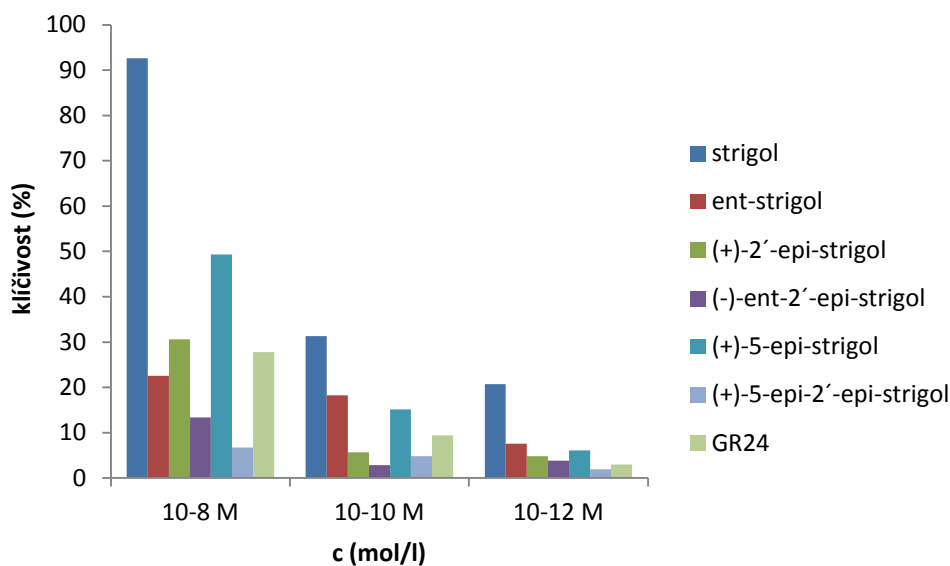
Obr. 19 – Přírodní strigolaktony patřící do rodiny odvozené od orobancholu.

Složitost přírodních strigolaktonů, lze znázornit na (+)-strigolu (**1**), kdy tato jediná látka má celkově 8 stereoizomerů, kdy v rostlinách se nachází pouze (+)-strigol (**1**) a zbylých 7 stereoizomerů bylo připraveno synteticky⁴⁵. Struktury všech možných stereoizomerů (+)-strigolu jsou znázorněny na Obr. 20.



Obr. 20 – Stereoizomery (+)-strigolu.

Znalost absolutní stereochemie není důležitá jen pro identifikaci jednotlivých přírodních strigolaktonů nacházející se v rostlinách, ale hraje zásadní roli při aktivitě těchto látek. Tato skutečnost je opět demonstrována na stereoizomerech (+)-strigolu (**1**). Všech 8 stereoizomerů bylo testováno, jestli budou iniciovat klíčení semen parazitické rostliny *Striga hermonthica*. Biotesty ukázaly, že nejvíce aktivní je přirozeně se vyskytující (+)-strigol (**1**), který způsobil klíčení u 95 % semen při koncentraci 10^{-8} M. Ostatní stereoizomery při stejné koncentraci ani zdaleka nedosahují, tak vysoké aktivity (*Graf 1*)⁴⁶.



Graf 1 – Biotest stereoizomerů (+)-strigolu na klíčení semen *S. hermonthica*.

3.8 Strategické přístupy k syntéze strigolaktonů

Syntéza strigolaktonů je důležitá nejen z pohledu výzvy pro organické chemiky, ale zejména kvůli jejich malému množství a obtížnosti izolace z kořenových exudátů rostlin. Také se jedná o důležitý nástroj, který pomáhá rozluštit strukturu a stereochemii přírodních strigolaktonů, což někdy nebylo snadné, jak bylo popsáno výše. V následujících podkapitolách jsou probrány přístupy syntézy přírodních strigolaktonů, strigolaktonových analogů a strigolaktonových mimetik.

3.8.1 Totální syntéza přírodních strigolaktonů

Příprava přírodních strigolaktonů je založena zejména na třech klíčových krocích. Nejprve se jedná o přípravu samotného ABC skeletu, který je obsažen u všech přírodních strigolaktonů a následně se provádí potřebné modifikace na tomto skeletu, které se týkají hlavně kruhů A a B. Finálním krokem syntézy je navázání D-kruhu. Tento sled reakcí není striktně určen a lze ho pozměnit tak, že nejdříve lze k ABC skeletu napojit D-kruh a až poté se provádí modifikace A a B kruhu, vedoucí k jednotlivým zástupcům.

Nejvíce kroků z celé totální syntézy vyžaduje příprava ABC skeletu. Jako příklad lze uvést syntézu, která vychází z relativně snadno dostupného mesityl oxidu, který je nejdříve převeden na derivát cyklohexen karboxylové kyseliny, který následně podléhá Nazarově cyklizaci za vzniku AB skeletu a po sérii dalších reakcí je získán

ABC skelet, který obsahuje 2 stereogenní centra. Přednostně vzniká *cis*-BC lakton a přes přítomnost 2 stereogenních center vznikají pouze dvě látky (racemický ABC skelet **32**). Výtěžky jednotlivých kroků se v průměru pohybují okolo 80 %, a celkový výtěžek pak 20 %⁴⁷. Obecná příprava ABC skeletu je znázorněna na Schématu 7.

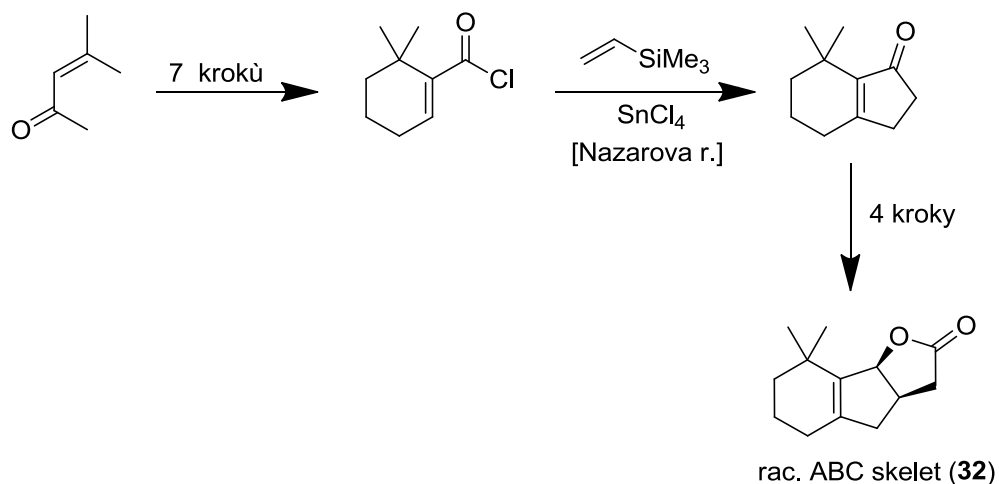


Schéma 7 – Obecné znázornění přípravy ABC skeletu přírodních strigolaktonů.

Připojování D-kruhu ke zbytku struktury je prováděno zejména cestou, která zahrnuje formylaci ABC skeletu v přítomnosti báze a vzniklý enolát poté reaguje s bromovaným, popřípadě chlorovaným D-kruhem. Jako báze se hojně využívá *tert*-butoxid draselný, hydrid sodný anebo terciární aminy. Přesný mechanismus napojení D-kruhu k ABC skeletu není popsán. Pro bromaci příslušného D-kruhu se využívá zejména radikálové bromace za použití NBS a radikálových iniciátorů. Finální napojení D-kruhu probíhá bez stereochemické kontroly a v případě použití racemického ABC skeletu (**32**) vzniká směs diasteromerů. Příklad vzniku diasteromerní směsi je demonstrován na 5-deoxystrigolu (Schéma 8). Diasteromery lze separovat chromatograficky, popřípadě rekrystalizací⁴⁷.

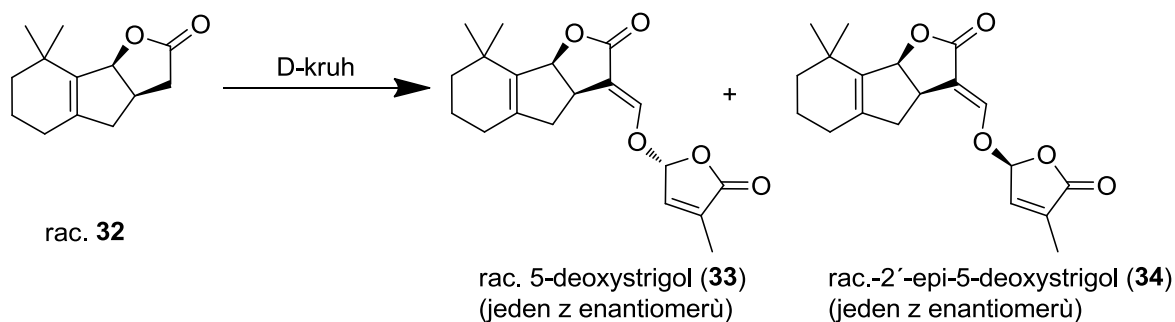


Schéma 8 – Napojení D-kruhu na racemický ABC skelet.

Existují dva způsoby jak docílit stereokontroly napojení D-kruhu. První přístup využívá homochirálního D-kruhu, který lze získat Diels-Alderovou reakcí mezi anhydridem kyseliny monomethyl maleinové a cyklopentadienem. Jedna karbonylová skupina je zredukována za vzniku hydroxy laktonu, který je podroben kinetickému rozlišení za pomoci PS lipasy. Enantiomerně čistý hydroxy lakton je poté chlorován pomocí thionyl chloridu (Schéma 9).

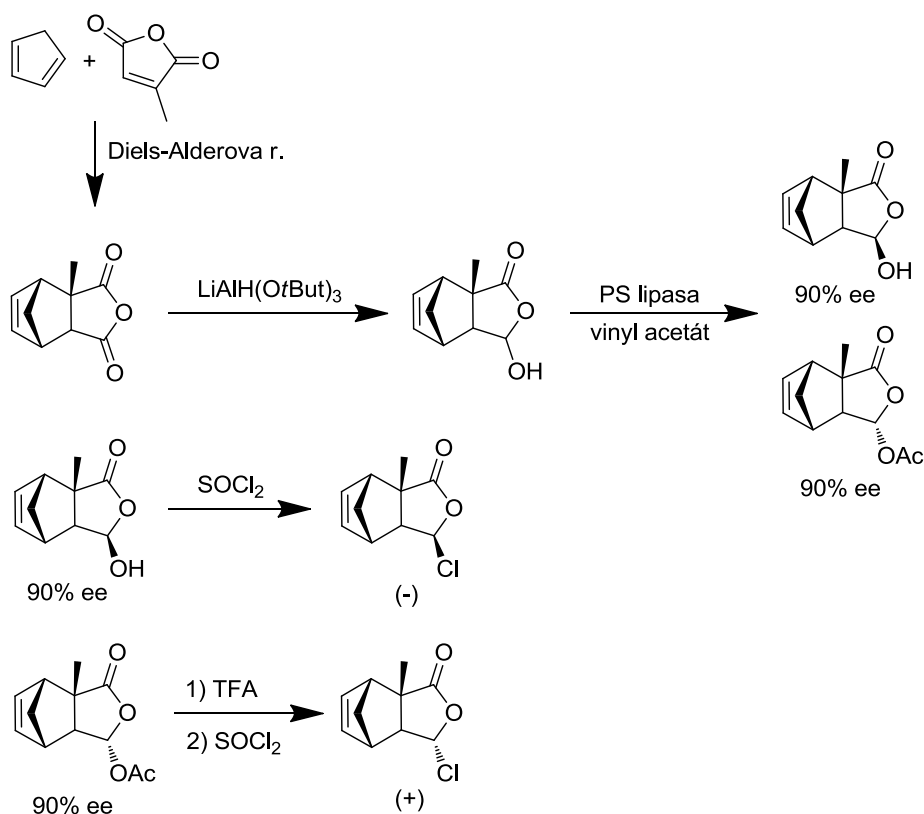


Schéma 9 – Příprava homochirálního prekurzoru D-kruhu.

Takto připravený D-kruh je napojen klasickým způsobem, jako je popsáno výše a posledním krokem je odštěpení cyklopentadienu, které se provádí termicky v *ortho*-dichlorbenzenu⁴⁸. Této strategie se využívá například při syntéze sorgolaktonu (**3**) (Schéma 10)⁴⁹.

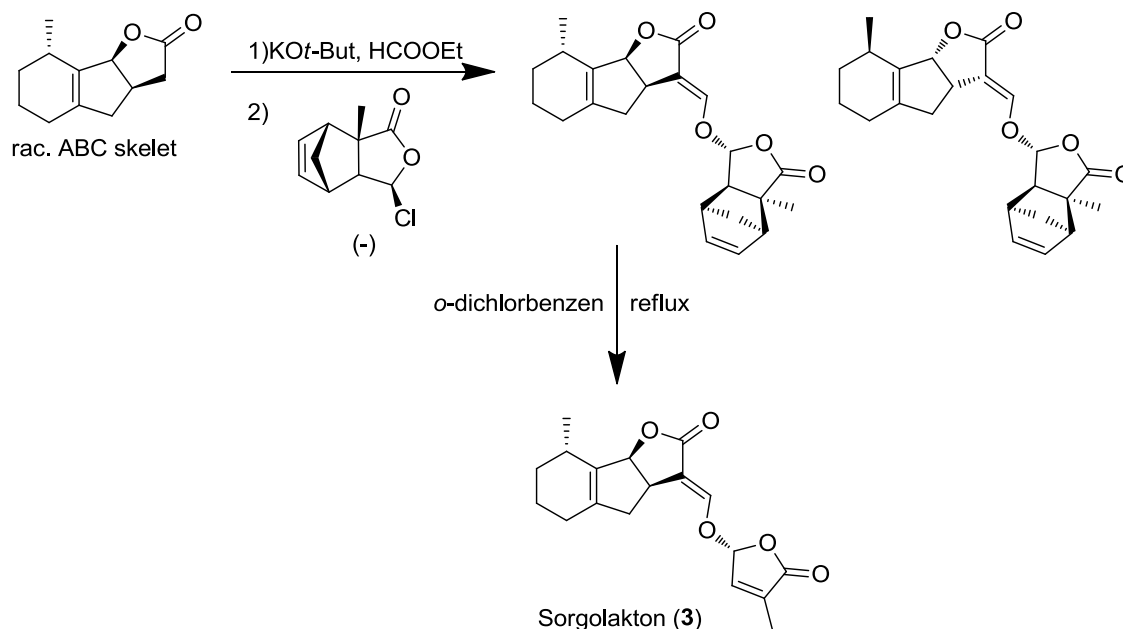


Schéma 10 – Syntéza sorgolaktonu.

Druhým přístupem je využití napojení D-kruhu za katalýzy paládiem a použití chirálního Trostova DACH-fenyl ligandu. Tato strategie byla zatím použita pro přípravu strigolaktonových analogů GR 24 (**6**) a GR 7 (**7**)⁵⁰, jejichž syntéza s využitím asymetrické katalýzy je probrána v kapitole 3.8.2.

Konkrétním příkladem různých přístupů totální syntézy přírodních strigolaktonů lze znázornit na strigolu. První totální syntéza byla úspěšně provedena už v roce 1974. Jako výchozí látka byl použit 2,2-dimethylcyklohexanon (**35**) (Schéma 11), u kterého se využila Nazarova cyklizace pro vznik AB kruhu, který byl poté alkylován za vzniku ketoesteru (**36**) (Schéma 11). Před uzavřením C-kruhu byla zavedena hydroxy skupina na A-kruh, celá syntéza ABC skeletu byla s výtěžkem 30 %. Nakonec na odpovídající racemický ABC skelet (**37**) (Schéma 11) byl připojen D-kruh⁵¹. Další přístupy vycházejí z jiné počáteční výchozí látky a to citralu (**38**) (Schéma 11) s celkovým výtěžkem 16 %⁵² anebo α -iononu (**39**) s celkovým výtěžkem 28 % (Schéma 11)⁵³, jiná syntéza zase začíná kondenzací mesityloxydu (**40**) a ethyl acetoacetátu (**41**) (Schéma 11) s celkovým výtěžkem 38 %⁵⁴. Ve všech uvedených příkladech je syntéza ABC skeletu

zdlouhavá a vyžaduje množství kroků, které se hodí pro laboratorní využití, ale ne pro přípravu ve větším měřítku. Na schématu 11 jsou obecně znázorněny jednotlivé syntézy.

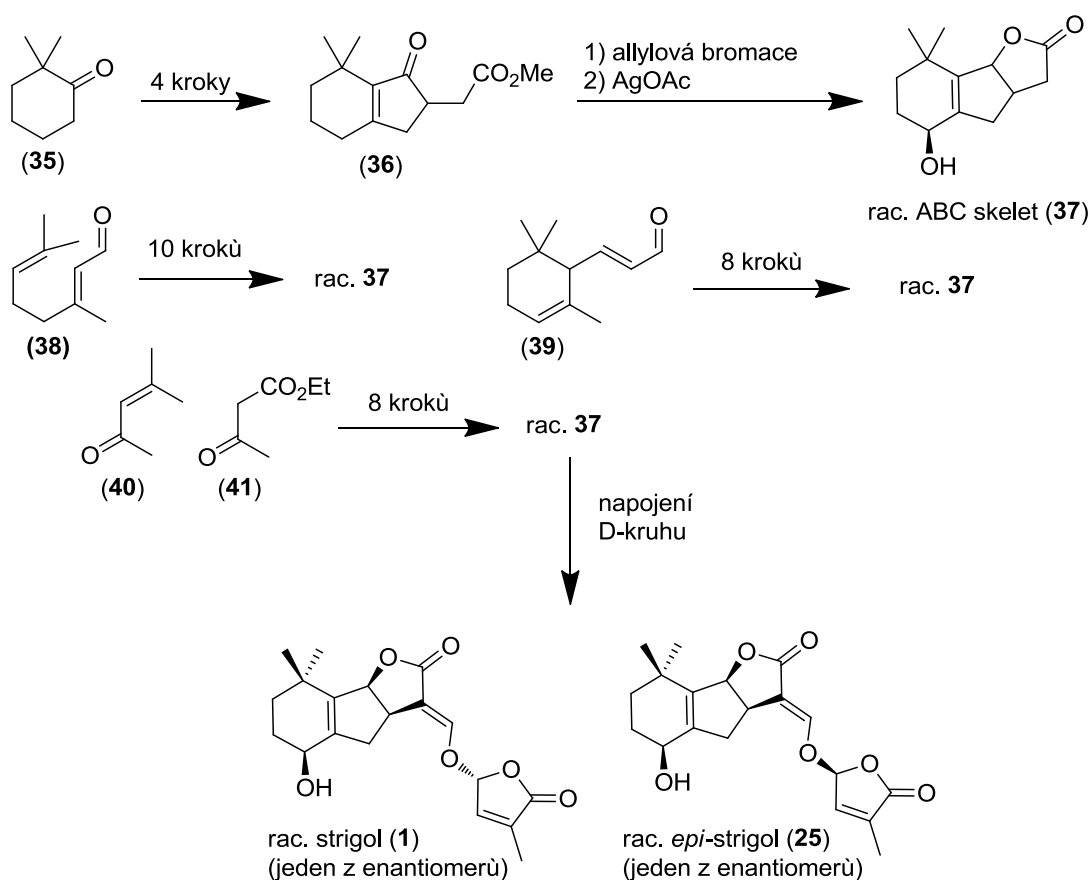


Schéma 11 – Obecné syntetické přístupy přípravy strigolu.

Metoda, která lze využít pro výrobu ve větším měřítku, se opět nejdříve zaměřuje na vybudování ABC skeletu postupem znázorněným na schématu 7, poté následuje oxidace A kruhu a nakonec napojení D-kruhu klasickým způsobem (Schéma 12). Poslední krok lze zařadit před oxidaci, která se po připojení D-kruhu provádí pomocí oxidu seleničitého, a nakonec následuje oxidačně/redukční sekvence, která umožňuje měnit konfiguraci hydroxy skupiny na A-kruhu (Schéma 13)⁴⁵.

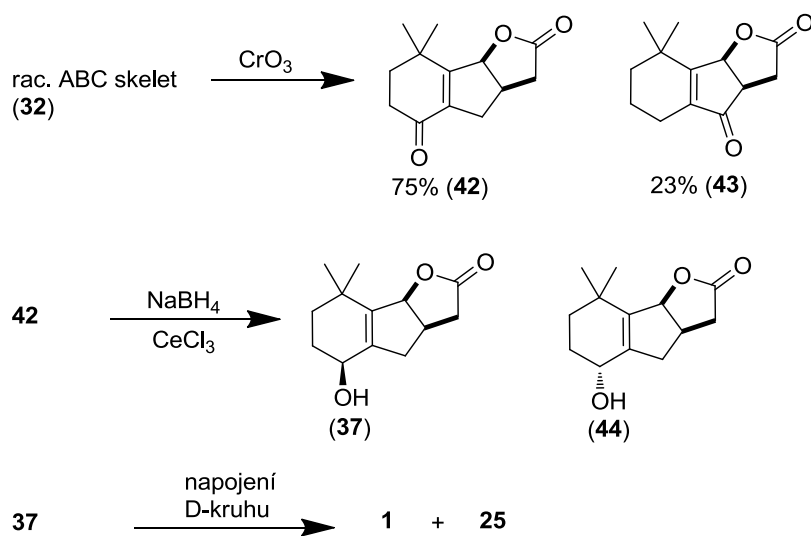


Schéma 12 – Jeden z přístupů praktické syntézy strigolu.

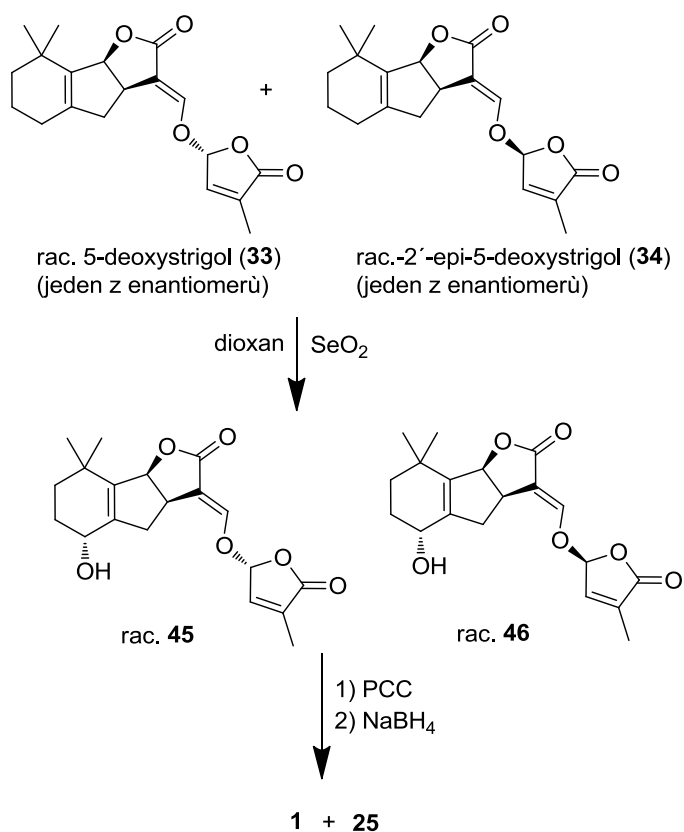


Schéma 13 – Alternativní cesta praktické syntézy strigolu.

Dalším důležitým zástupcem je orobanchol (4), který je nejvíce vyskytující se přírodním strigolaktone. Jeho totální syntéza spočívá v podobném postupu, který se

uplatňuje u syntézy strigolu (*Schéma 12*). Připravený ABC skelet je oxidován a vznikají dva produkty v poměru 3:1 v neprospěch látky (**43**) (*Schéma 12*), která se používá pro další kroky syntézy. Následně je keto skupina na B-kruhu zredukována a pomocí Mitsunobu reakce je invertováno centrum. Posledním krokem je opět napojení D-kruhu ke zbytku struktury (*Schéma 14*). Syntéza znázorňuje přípravu původní předpokládané struktury orobancholu, která se nakonec ukázala jako špatná³⁷. Přírodní orobanchol je enantiomer látky **50**.

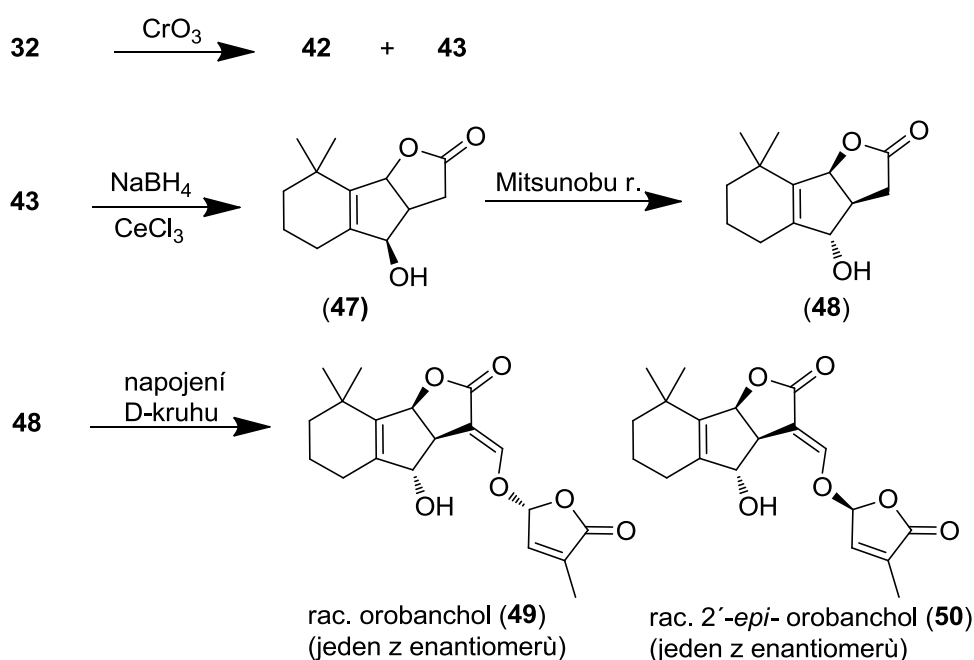


Schéma 14 – Jeden z přístupů syntéz orobancholu.

Jiná syntéza vedoucí k orobancholu využívá allylového přesmyku alkoholu, který se připravuje ze *syn*-epoxidu (**51**) (*Schéma 15*) nacházející se na ABC skeletu. Je důležité podotknout, že zároveň vzniká i *anti*-epoxid (**52**) (*Schéma 15*) ze kterého lze připravit strigol. Jednotlivé epoxidy vznikají v poměru 1:1,5 v neprospěch *syn*-epoxidu (**51**) (*Schéma 15*)⁵⁵. Pokud by se srovnaly jednotlivé syntézy orobancholu, které jsou zde uvedeny, tak tato syntéza poskytuje o trochu lepší poměr oproti syntéze znázorněné výše (*Schéma 14*).

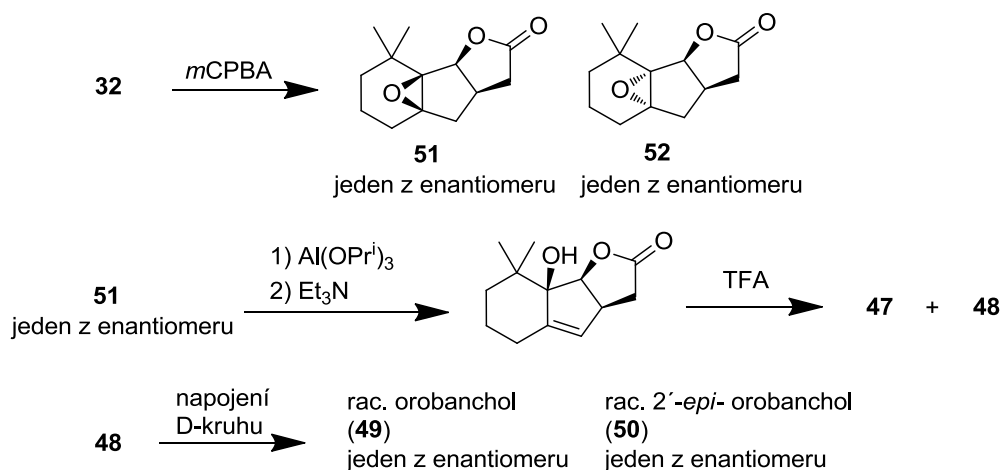


Schéma 15 – Alternativní přístup syntézy orobancholu.

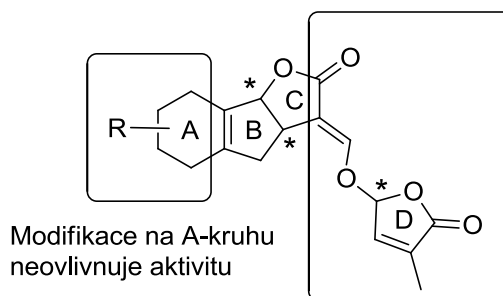
Jednotlivé syntézy přírodních strigolaktonů ukazují, že nejvíce kroků vyžaduje příprava ABC skeletu. Nicméně i přes množství reakcí, které jsou potřeba, lze některé postupy využít i k přípravě v gramovém množství. Dalším kritickým bodem je zavedení funkčních skupin na kruhy A a B, kam patří především selektivní oxidace těchto kruhů, popřípadě zavedení správné stereochemie v molekule přírodních strigolaktonů⁴⁷.

3.8.2 Syntéza strigolaktonových analogů

Hledání strigolaktonových analogů, které by byly jednodušší oproti přírodním strigolaktonům probíhalo na základě zjištění, které části struktury jsou nezbytné pro biologickou aktivitu. Strigolaktonová analoga jsou definována jako sloučeniny, které obsahují D-kruh, který je připojen k α,β -nenasycenému enonu pomocí enol-etherového spojení⁴⁷.

Zjišťování esenciálních částí pro aktivitu lze demonstrovat na strigolu, který byl systematicky zjednodušován. Nejdříve došlo k záměně A-kruhu strigolu za benzenové jádro, kdy vznikla látka pojmenována GR 24 (**6**). Pokud se celý A-kruh odstraní, vzniká látka GR 7 (**7**). Obě dvě zmíněné látky jsou výrazně aktivní v iniciaci klíčení semen parazitických rostlin⁴⁷. Prvky, které hrají důležitou roli v aktivitě strigolaktonů jsou znázorněny na Obr. 21.

Správná stereochemie
je nezbytná



Obr. 21 – Důležité části pro aktivitu strigolaktonových analogů.

Největší pozornost je upřena především na látku GR 24, která se používá jako pozitivní kontrola ve všech testech co se týká biologické aktivity strigolaktonů. Rozšíření této látky v biotestech způsobilo aktivní zájem o její syntézu. První syntéza byla provedena skupinou profesora Johsona, kde výchozí látkou byl 1-indanon, který byl převeden na 1-oxo-indanyloctovou kyselinu, která je následně redukována a poté zacyklena za vzniku ABC skeletu¹⁸. Mangus a kolektiv malinko pozměnil syntézu vedoucí k 1-oxo-indanyloctové kyselině (**53**) (Schéma 16), dále pak pokračoval obdobně jako Johnson a kolektiv⁵⁶. Je popsána ještě další syntéza, která opět vychází z 1-indanonu, ale v tomto případě dochází ke kondenzaci s glyoxalovou kyselinou. Produkt kondenzace se redukuje vodíkem a získá se opět 1-oxo-indanyloctová kyselina (**53**) (Schéma 16)⁴¹. Stobbeho kondenzace mezi benzaldehydem a methyl sukcinátem je prvním krokem efektivní syntézy vedoucí opět k (**53**) (Schéma 16)⁵⁷. Všechny 4 základní metody syntézy GR 24 jsou znázorněny na Schématu 16.

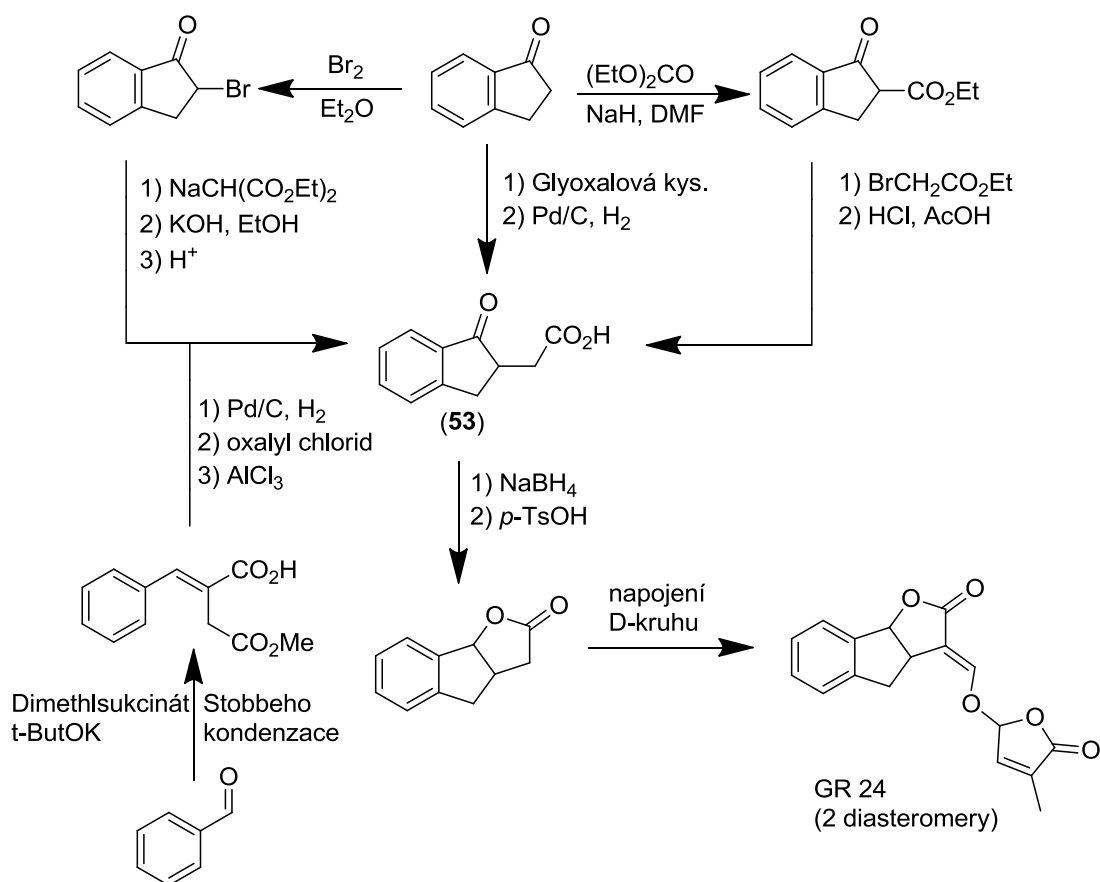


Schéma 16 – Základní metody přípravy GR 24.

Výše bylo zmíněno, že strigolaktonová analoga lze připravit za pomoci paladiového couplingu. Publikovaná metoda byla použita pro enantioselektivní syntézu GR 24, GR 7 a Nijmegen-1. Enantioselektivní syntéza využívá v klíčovém kroku napojení D-kruhu pomocí chirálního Trostova ligandu DACH-fenyl. V reakci dochází k *O*-alkylaci formylovaného ABC skeletu za pomoci D-kruhu obsahující v pozici C-5 odstupující skupinu. Zwanenburg a kolektiv využívali jako odstupující skupinu *tert*-butyl karbonát a jako zdroj paladia $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$. Při přípravě GR 24 použili racemáty obou reagujících komponent, kdy nakonec dostali směs diastromerů a dosáhli 90 %, respektive 100 % enantiomerního přebytku. V případě Nijmegenu-1 (**59**) (Schéma 17), který obsahuje pouze 1 chirální centrum, dosáhli enantiomerního přebytku 96 % (Schéma 17)⁵⁰.

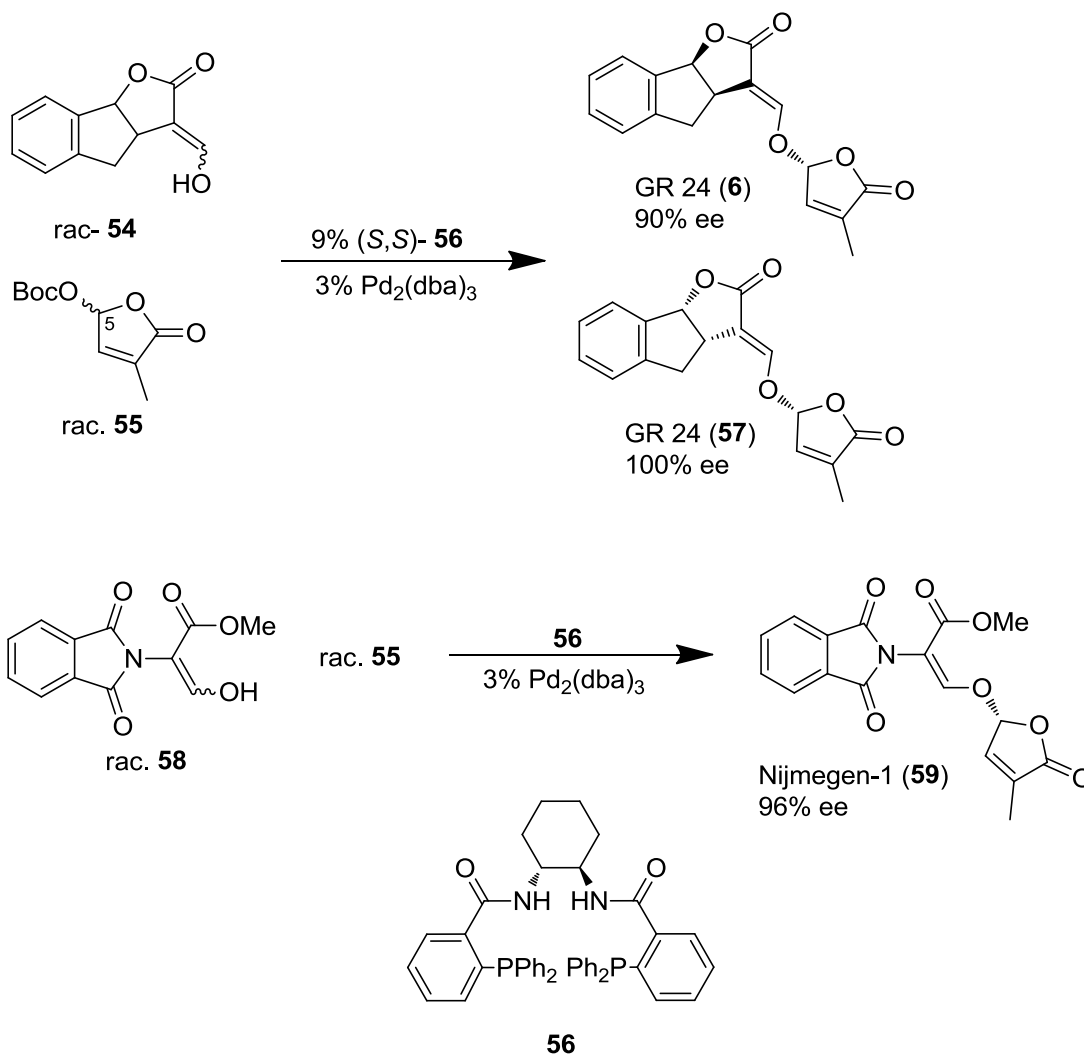


Schéma 17 – Enantioselektivní syntéza strigolaktonových analogů.

Využití chirálních ligandů a katalyzátorů je elegantní, ale bohužel cenově nevyužitelné ve výrobě ve větším měřítku. Potencionální využití těchto látek v agrochemických aplikacích vyžaduje jednoduché postupy, které by byly snadno aplikovatelné. Aktuálně se nejvíce využívá spíše separace za pomoci chirálních kolon než využití enantioselektivní syntézy. V posledních letech se ukazuje, že skupina látek obsahující pouze D-kruh strigolaktonů (strigolaktonová mimetika) vykazují slibné aktivity zejména v oblasti iniciace klíčení semen parazitických rostlin a jejich jednoduchá struktura je předurčuje jako kandidáty právě pro využití v agrochemických aplikacích⁴⁷.

3.8.3 Syntéza strigolaktonových mimitik

Strigolaktonová mimitika jsou definována jako látky, které obsahují D-kruh strigolaktonů, na kterém je v pozici C-5 napojen zbytek struktury. V této chvíli jsou dvě skupiny strigolaktonových mimitik.

Do první skupiny patří látky s fenoxyskupinou. Jedna z neaktivnějších látek je *para*-bromo-fenylloxy butenolid (**60**), který sice není tak aktivní v iniciaci klíčení semen parazitických semen, ale na druhou stranu je účinným inhibitorem větvení nadzemních částí. Tato skupina látek se označuje jako debranony a na aromatickém jádře obsahují různé substituenty, které ovlivňují jejich aktivitu, která je obecně vysoká především, co se týče inhibice větvení, u kterého dosahují podobné aktivity jako GR 24⁵⁸.

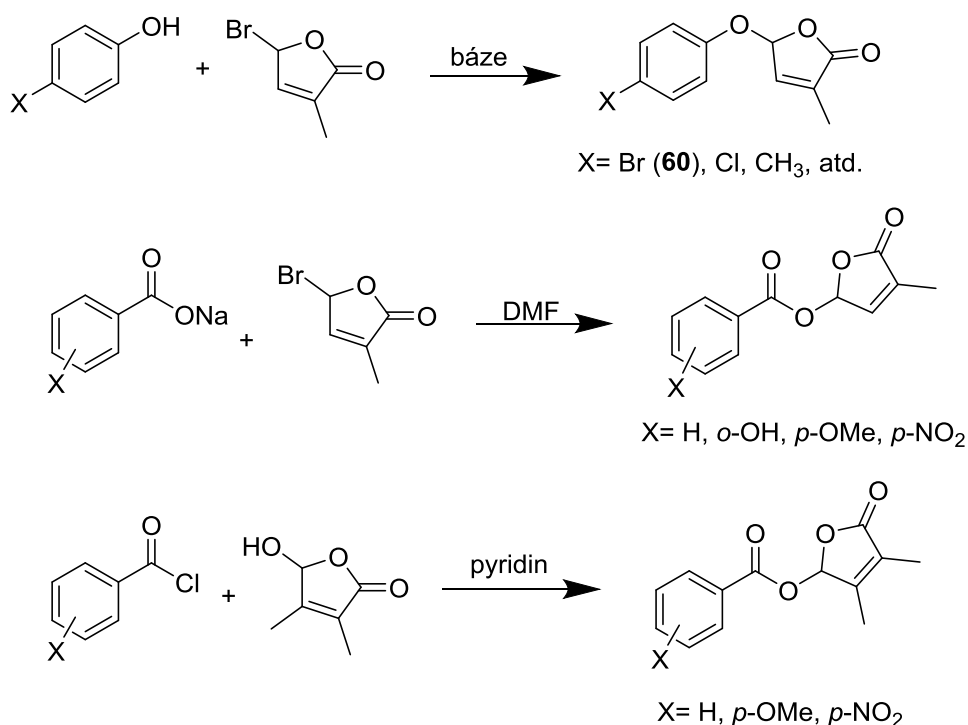


Schéma 18 – Obecný postup syntézy strigolaktonových mimitik.

Druhou skupinou jsou látky, které byly připraveny v podstatě současně s debranony. Tyto mimitika obsahují aryloxy skupinu napojenou na D-kruh v pozici C-5. Tyto látky se vyznačují jako iniciátory klíčení parazitů, zejména u parazitické rostliny *Orobancha cernua*²⁰. Obě skupiny látek jsou jednoduché na přípravu a jejich syntéza spočívá v substituci bromovaného D-kruhu a příslušným zbytkem struktury, popřípadě se

využívá hydroxy butenolidů a acylchloridů. Jednotlivé syntézy jsou znázorněny na Schématu 18^{20,26,58}.

4 Výsledky a diskuse

Cílem praktické části diplomové práce byla příprava strigolaktonových analogů a mimetik, které ve své struktuře obsahují D-laktamový kruh. Syntéza byla zaměřena především na analoga podobná sloučenině GR 24, která je obecně přijímána jako pozitivní kontrola ve všech biotestech týkajících se strigolaktonové aktivity. Strukturální podobnost mezi GR 24 a připravenými analogy umožňuje jejich porovnání a určení jestli se jedná o inhibitory popřípadě aktivátory. Připravená analoga poté byla testována v biotestu určující aktivitu vůči iniciaci klíčení semen parazitické rostliny *Striga hermonthica*. Při syntéze byla strategie nejdříve zaměřena na metodologii přípravy jednotlivých laktamových kruhů. Následovala syntéza ABC skeletu a nakonec spojování jednotlivých fragmentů (Schéma 19).

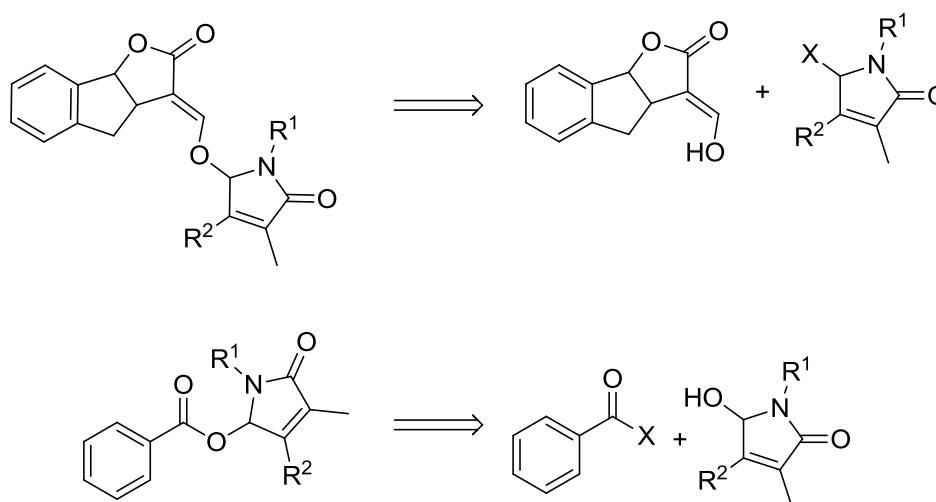


Schéma 19 – Obecné znázornění přípravy strigolaktonových analog a mimetik.

4.1 Příprava laktamových kruhů

4.1.1 Příprava mono a dimethyl imidů

Prvním krokem syntézy byla příprava příslušných cyklických imidů **63** a **64**. Jako výchozí látka byl použit komerčně dostupný anhydrid kyseliny dimethylmaleinové, respektive anhydrid kyseliny monomethylmaleinové. Jako zdroj amoniaku sloužil HMDS (hexamethyldisilazan)⁵⁹, respektive octan amonný⁶⁰.

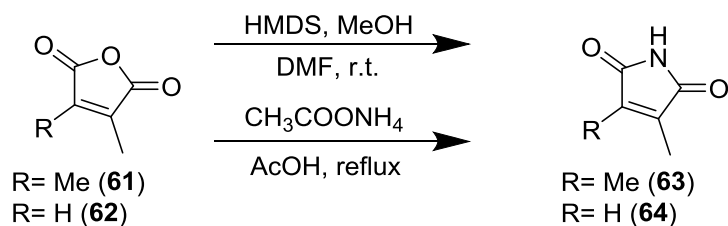
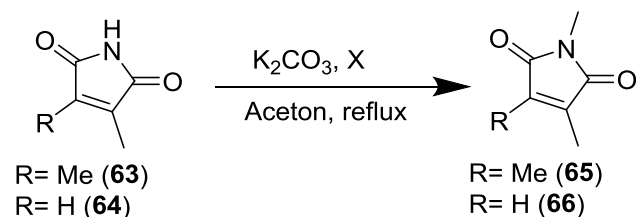


Schéma 20 – Příprava mono a dimethylimidů.

Metoda využívající HMDS probíhala za laboratorní teploty, kdy docházelo k úplné konverzi výchozí látky. V reakci byl MeOH použit jako reakční komponenta, která z HMDS generovala methoxytrimethylsilan a amoniak, který poté reagoval s **61** za vzniku **63**. Přítomnost methoxytrimethylsilanu byla potvrzena autory Davis a kolektiv, kteří využili GC-MS a NMR (^1H a ^{13}C)⁵⁹. Po čištění produktu pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu byla získána pevná bílá látka s výtěžkem 90 %. Obdobné podmínky byly aplikovány i pro přípravu imidu **64**. Podmínky se lišily pouze ve zvýšené teplotě (80 °C), kdy byl získán produkt jako pevná bílá látka ve výtěžku 63 %. Literatura udává výtěžek 80 %⁶¹. V obou případech lze zaměnit kyslíkový atom za dusík pomocí octanu amonného jakožto zdroje amoniaku. Touto metodou bylo dosaženo nižšího výtěžku v obou případech, kdy **63** byla získána ve výtěžku 80 % a **64** ve výtěžku 56 %. V případě metody, kde se používá HMDS, se sice dosahuje vyšších výtěžků, ale je potřeba 10-ti násobného přebytku HMDS. I přes nižší výtěžky se v rámci úspor preferoval postup využívající octan amonný v kyselině octové z důvodu jednodušší manipulace a izolace produktů.

4.1.2 *N*-methylace monomethyl a dimethylimidů

Jednotlivé imidy **63** a **64** byly methylovány na dusíkovém atomu. V případě dimethylového imidu **63** byly testovány dvě methylační činidla, a to methyljodid a dimethylsulfát. S prvním zmiňovaným činidlem probíhala reakce s výtěžkem 38-40 % a reakční doba byla 12 hodin⁶². Použití dimethylsulfátu vedlo ke zvýšení výtěžku na 70-73 % a zároveň ke zkrácení reakční doby na polovinu. Obě zmíněné reakce probíhaly v acetonu za přítomnosti uhličitanu draselného jako báze (*Schéma 21*). Výsledný produkt **65** byl čištěn vakuovou destilací, po které byl získán jako bezbarvá olejovitá kapalina.



Methylační činidlo (X)	Výtěžek (63)	Čas
CH ₃ I	38-40 %	12 h
Me ₂ SO ₄	70-73 %	6 h

Schéma 21 – Methylace monomethyl a dimethylimidu.

Imid **66** byl připravován jen za pomoci dimethylsulfátu, kdy reakční podmínky zůstaly zachovány. V tomto případě byl celkový výtěžek nižší (52 %) a výsledný imid **66** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a získán ve formě bezbarvé olejovité kapaliny.

4.1.3 Redukce příslušných imidů

Jednotlivé imidy **63**, **64**, **65**, **66** byly podrobeny dvoustupňové redukci, kdy nejdříve došlo k redukci na příslušné hydroxylaktamy. V případě imidů **63** a **65** se jednalo o symetrické substráty, kde nebylo potřeba použití objemnějšího redukčního činidla. Reakce byla provedena v methanolu a vlastním redukčním činidlem byl borohydrid sodný (Schéma 22).

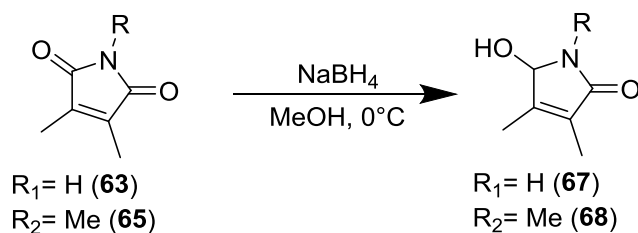


Schéma 22 – Redukce symetrických imidů **63** a **65**.

Oba produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Hydroxylaktam **67** byl získán jako pevná bílá látka s výtěžkem 68-73 %. Produkt **68** byl izolován jako bezbarvá olejovitá kapalina s výtěžkem 92 %.

V případě monomethylových imidů **64** a **66** bylo zapotřebí redukovat karbonylovou skupinu na pozici C-5. Pro regioselektivní redukci bylo zapotřebí použití

objemnějšího redukčního činidla, které by přistupovalo z méně stéricky bráněné strany. K redukci byl použit DIBAL-H. V literatuře je udáván výtěžek 98 % při regiosektivitě 99:1 ve prospěch hydroxylaktamu **69**. Získané výsledky odpovídaly literatuře a výtěžek byl nepatrně nižší (93 %). Výsledný produkt **69** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a izolován jako pevná bílá látka. Další možností je rekrystalizace z ethylacetátu (*Schéma 23*).⁶³.

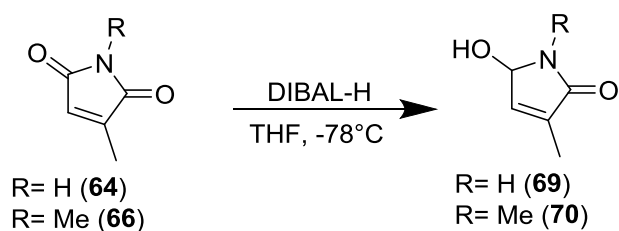


Schéma 23 – Regioselektivní redukce nesymetrických imidů 64 a 66.

Mase a kolektiv vysvětlují regioselektivní redukci **64** komplexací redukčního činidla s karbonylovým kyslíkem na C-5. Případná kompletace na kyslík nacházející se na C-2 je limitována stérickou zábranou způsobenou substituentem R^1 (*Schéma 24*).

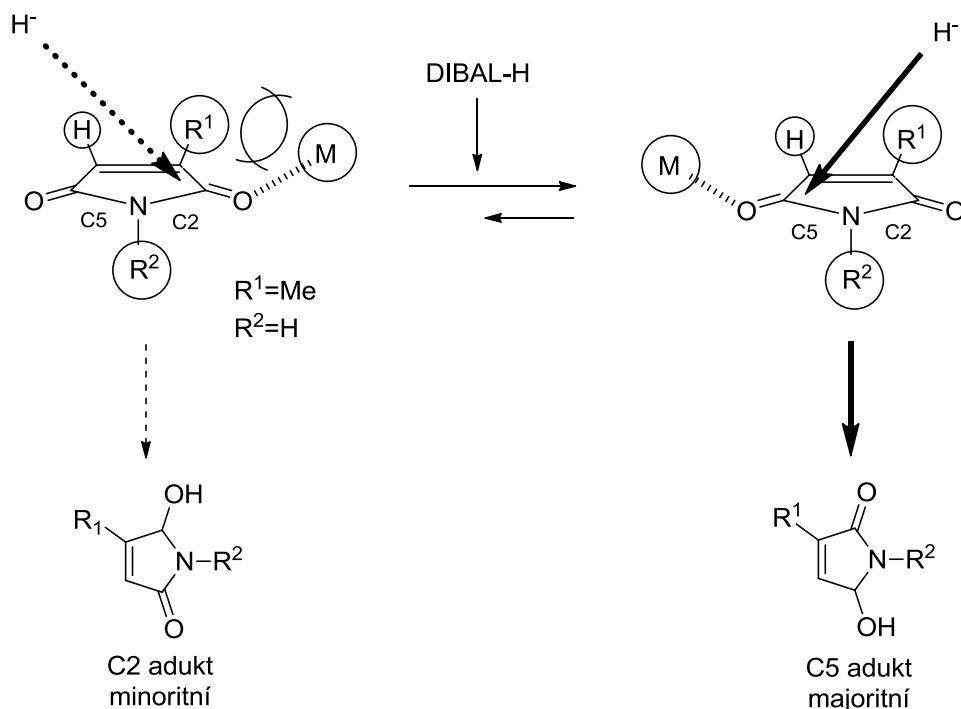
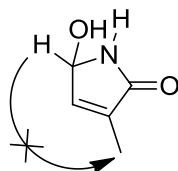


Schéma 24 – Předpokládaný mechanismus regioselektivní redukce imidu 64.

Při přípravě hydroxylaktamu **69** bylo zjištěno, že je částečně rozpustný ve vodě. Pokud byla během zpracování použita liquid-liquid extrakce, část produktu zůstávalo ve vodné fázi a tím docházelo ke snižování výtěžku reakce. Ukázalo se, že nejlepší strategií izolace z reakční směsi je využití extrakce v Soxhletově reaktor. Regioselektivita redukce byla ověřena pomocí 2D-NMR (HMBC), kde vodík nacházející se na uhlíku C-5 neinteragoval s uhlíkem methylové skupiny (Obr. 22).



HMBC
H na C-5 bez interakce s uhlíkem CH₃ skupiny

Obr. 22 – Znázornění signálu HMBC v hydroxylaktamu **69**.

Při použití stejného postupu při redukci imidu **66**, nebyl očekávaný produkt **70** detekován a docházelo pouze k degradaci výchozí látky. Příprava potřebného *N*-methyl laktamu byla přepracována viz. kapitola 4.1.5.

Připravené hydroxy laktamy **71**, **72**, **73** byly podrobeny redukci vedoucí k výsledným laktamovým kruhům. Ve všech případech byla redukce provedena pomocí triethylsilanu za přítomnosti Lewisovy kyseliny fluoridu boritého (Schéma 25)⁶⁴. Ve všech případech byly produkty získány v dostatečné čistotě a mohly být použity do další reakce. Produkty **71** (bílá pevná látka) a **72** (světle žlutá kapalina) byly získány s výtěžkem 97 % a laktam **73** (bílá pevná látka) byl získán s výtěžkem 92 %.

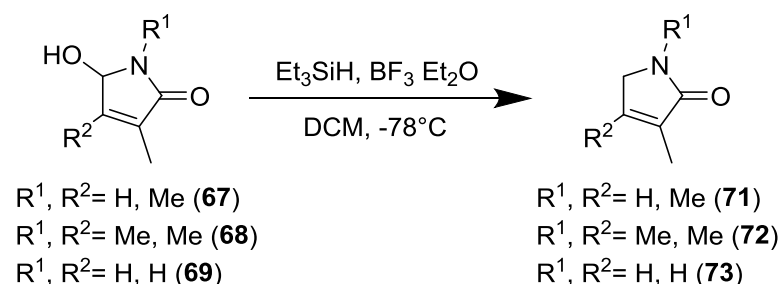


Schéma 25 – Redukce hydroxy laktamů **67**, **68**, **69**.

Předpokládá se, že Lewisova kyselina v reakci generuje iminiový iont, který je poté snadno redukován přítomným triethylsilanem⁶⁴.

4.1.4 Příprava *N*-Boc laktamů

V případě laktamů obsahující volný dusík (**71** a **73**) bylo zapotřebí před finální bromací tyto dusíky ochránit protektivní skupinou. Jako chránicí skupina byl vybrán *tert*-butyloxykarbonyl skupina (Boc). Reakční podmínky byly v obou případech stejné, kdy byl použit di-*tert*-butyl bikarbonát jako zdroj chránicí skupiny a DMAP, který sloužil jako nukleofilní katalyzátor reakce (Schéma 26).

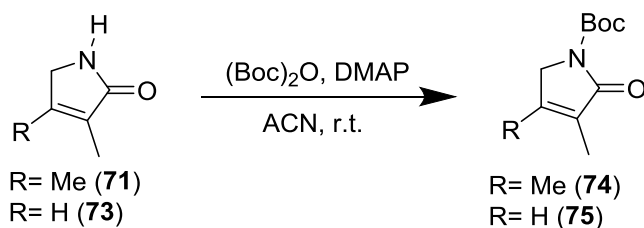


Schéma 26 – Protekce laktamů **71** a **73**.

Chráněný laktam **74** byl získán ve vysokém výtěžku 88 % (světle oranžová olejovitá kapalina) a dostatečné čistotě, kdy mohl být použit rovnou do další reakce. Laktam **75** bylo potřeba čistit pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a byl izolován s výtěžkem 63 % jako světle žlutá pevná látka.

4.1.5 Příprava *N*-methyl-monomethyl laktamu

Výše bylo uvedeno, že laktam **76** se nepodařilo připravit původně navrženou metodologií, která zahrnovala methylaci imidu (Schéma 21), regioselektivní redukcí (Schéma 23) a redukcí hydroxylaktamu (Schéma 25), z důvodu degradace výchozí látky při regioselektivní redukcí. Nově navržený přístup spočíval ve využití již připraveného laktamu **73**, ze kterého se nejdříve připravila sodná sůl za pomoci NaH, která pak byla alkylována dimethylsulfátem (Schéma 27).

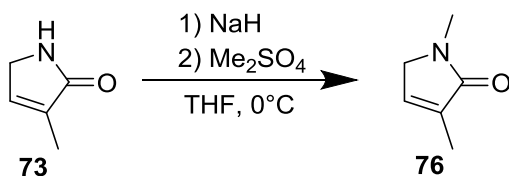


Schéma 27 – Alkylace laktamu **73**.

Celá reakce probíhala v bezvodém prostředí a inertní atmosféře. Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a izolován jako žlutá kapalina

s výtěžkem 34 %. Reakce byla zkoušena i s jiným alkylačním činidlem (CH₃I), ale v tomto případě k reakci vůbec nedošlo a byla izolována zpět výchozí látka.

4.1.6 Bromace laktamových kruhů

V literatuře popsaná radikálová bromace laktamu **75** využívala *N*-bromosukcinimidu (NBS) pro zdroj bromového radikálu a AIBN jako radikálový iniciátor. Reakce byla prováděna v CCl₄ při 80 °C s výtěžkem 75 %⁶⁵. Bromace laktamů **72**, **74**, **76** nebyly publikovány. Produkty **77**, **78**, **79**, **80** byly připraveny za podmínek podobných literatuře s tím rozdílem, že reakce byla navíc po celou dobu ozařována UV světlem (365 nm) (Schéma 28).

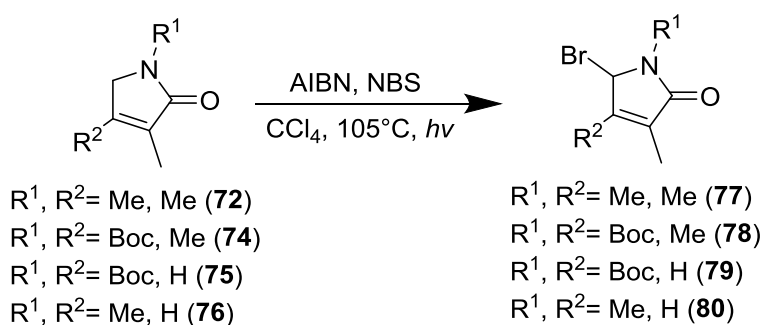


Schéma 28 – Bromace jednotlivých laktamů **72,74, 75, 76**.

Produkty **77** (oranžová kapalina, výtěžek 95 %), **78** (oranžová olejovitá kapalina, 92 %) a **80** (oranžová olejovitá kapalina, 80 %) byly získány v dostatečné čistotě a mohly být použity do další reakce. Látka **79** byla čištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a izolována s výtěžkem 70 % jako pevná světle žlutá látka.

4.2 Příprava ABC skeletu

Při syntéze ABC skeletu, který je součástí strigolaktonového analoga GR 24 (**6**), byl použit postup, který publikoval Mangnus a kolektiv⁵⁶. Jako výchozí látka byl použit 1-indanon (**81**), který se nejdříve acyloval v α -poloze pomocí diethylkarbonátu a následně alkylován pomocí ethyl bromoacetátu za vzniku keto diesteru **82**. Celá sekvence se provádí v jednom kroku. Produkt **82** je poté použit do další reakce, kde dochází v kyselém prostředí k hydrolyze esterů a následné dekarboxylaci α -karboxylové skupiny nacházejícího se na α -uhlíku. Produkt reakce **53** byl opět použit v dalším kroku bez předchozího přečištění (Schéma 29).

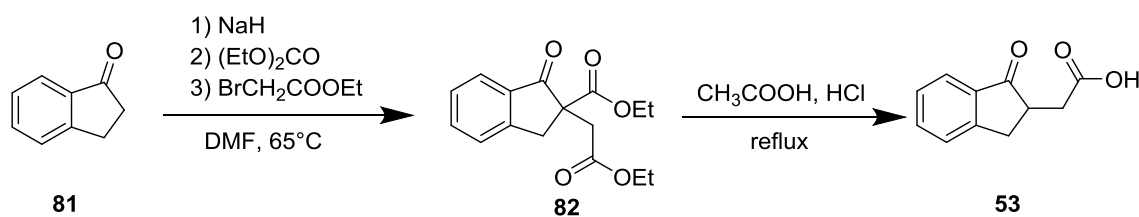


Schéma 29 – Příprava ketokyseliny **53**.

Vzniklá ketokyselina **53** byla redukována pomocí borohydridu sodného za vzniku hydroxy kyseliny **83**. Posledním krokem syntézy byla kyselá katalyzovaná laktonizace, kdy vzniká racemický ABC skelet **84** (Schéma 30).

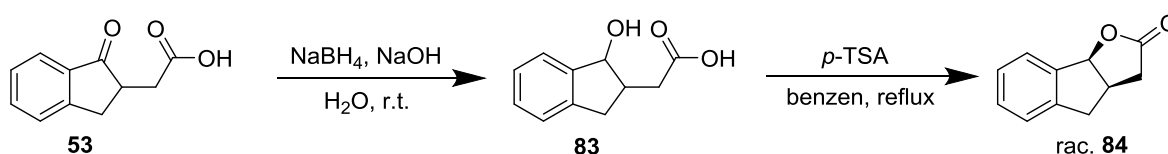


Schéma 30 – Příprava racemického ABC skeletu **84**.

Finální produkt **84** byl nakonec čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a izolován ve formě pevné bílé látky. Výtěžky jednotlivých reakčních kroků se shodovaly s publikovanými výsledky, kdy výtěžek celé syntézy vedoucí k ABC skeletu **84** činí 63 %⁵⁶.

4.3 Spojování ABC skeletu s laktamovými kruhy

Metoda, která byla použita, se využívá i při syntéze GR 24, která je popsána v kapitole 3.8.2. Připojování spočívá ve vygenerování draselného enolátu odvozeného od ABC skeletu **84** a následnou *O*-alkylací bromovaným D-kruhem. V případě přípravy GR 24 je připojování prováděno dvěma kroky. Nejdříve dochází ke generování draselného enolátu, které probíhá v THF, který je poté odpařen. Následně je ke vzniklé soli přidán DME. Nakonec je do reakce přidán bromovaný laktonový kruh. Výtěžky této reakce se pohybují v rozmezí 30-35 %⁵⁶.

V případě bromovaných laktamů **77**, **78**, **79**, **80** bylo využito obdobného postupu, s tím rozdílem, že příslušný enolát byl připraven rovnou v DME a po úplné konverzi, která byla sledována pomocí TLC, byl přidán bromovaný laktam (**77**, **78**, **79**, **80**) (Schéma 31).

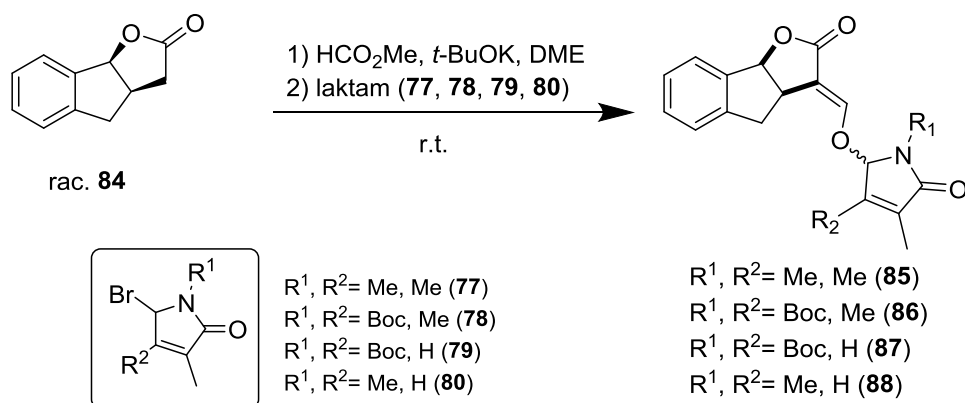


Schéma 31 – Připojování laktamových kruhů **77**, **78**, **79**, **80** k ABC skeletu **84**.

V případě produktů **85** a **88** byly získány výtěžky kolem 28 %, ale v případě produktů **86** a **87** byly získány výtěžky 64 % a 55 %.

Všechny finální produkty vznikaly jako směs diasteromerů a ve všech případech bylo potřeba použít silikagelu, který byl pasivován pomocí Et₃N. V případě použití silikagelu bez pasivace se nepovedlo odseparovat nezreagovaný enolát a bromovaný laktam, který se přidával v mírném přebytku. Předpokládalo se, že jednotlivé diasteromery půjdou od sebe rozdělit, což se podařilo pouze v případě produktu **87**, ale prozatím není určena jejich přesná stereochemie. Zbývající produkty byly izolovány jako směs diasteromerů. Řešením jejich separace by mohlo být použití preparativní HPLC, které se z časových důvodů neprovádělo. Dále byla zjišťována konfigurace dvojně vazby pomocí 1D NOE DIFF NMR experimentu a ve všech případech se jedná o *E*-izomery.

4.4 Spojování ABC skeletu s laktamovými kruhy pomocí Pd-couplingu

Kromě klasického přístupu, který je používán výše, lze k napojování D-kruhu strigolaktonů využít Pd-coupling. Reizelman a Zwanenburg publikovali syntézu GR 24, která využívá pro připojení D-kruhu enantioselektivní paladiem katalyzovaný coupling. Jako chirální ligand je využit Trostův DACH-fenyl fosfin. Autoři dosáhli výtěžku 90 % a vysokého enantiomerního přebytku, v případě GR 24 (**6**) byl 90 % a **57** byl 100 % (Schéma 32).

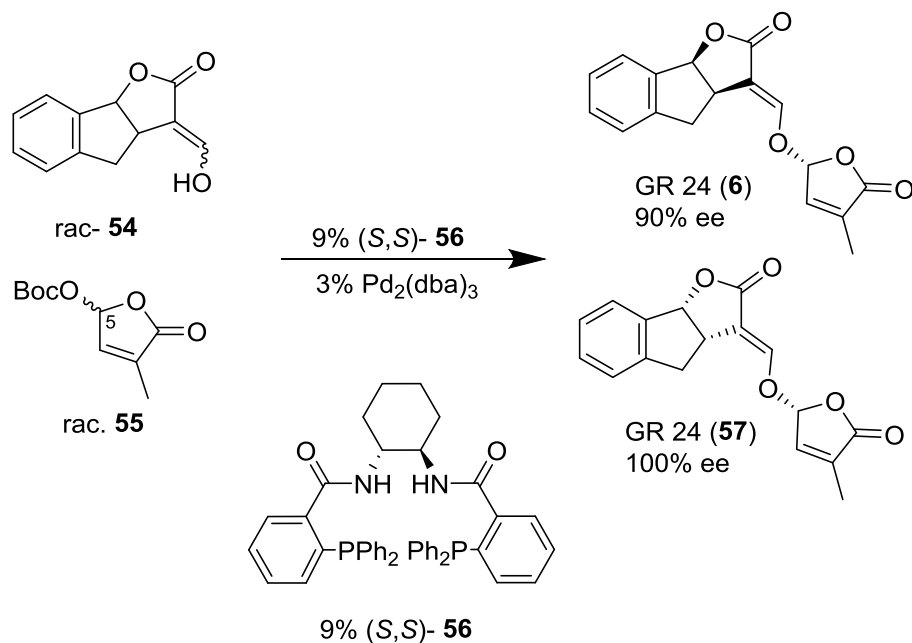


Schéma 32 – Klíčový krok enantioselektivní syntézy GR 24.

Tento postup byl použit pro laktamové kruhy **89** a **91**, které obsahovaly v pozici C-5 odstupující skupinu *tert*-butyl karbonát.

Příprava laktamů, které se využívají v couplingu, vycházela z již připravených hydroxy laktamů **67** a **68**, na které byla zavedena *tert*-butyloxykarbonylová skupina (Boc). Pro tuto reakci byly využity obdobné podmínky, ve kterých byla prováděna protekce laktamů **74** a **75** (Schéma 26).

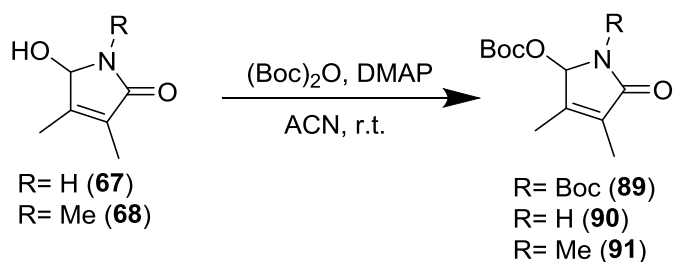


Schéma 33 – Příprava laktamů **89**, **90** a **91**.

Laktam **91** byl získán jako tmavě oranžová pevná látka s výtěžkem 90 % v dostatečné čistotě a mohl být použit do další reakce. Laktam **89** touto modou nepodařilo připravit. Docházelo pouze k navázání *tert*-butyloxykarbonylové skupiny na kyslík a laktamový dusík zůstal volný (**90**). Modifikované strategie přípravy **89** se využilo zavedením Boc skupiny již na výchozí imid **63**. Reakce byla provedena za

stejných podmínkách, použitých pro Boc protekci v předešlých případech. Produkt **92** byl získán v kvantitativním výtěžku a dostatečné čistotě jako světle červená kapalina. Dalším krokem byla redukce pomocí NaBH₄ v MeOH, kdy byla získána **93** jako bílá pevná látka s výtěžkem 70 % a dostatečné čistotě. Posledním krokem poté bylo zavedení *tert*-butyloxykarbonylové skupiny na kyslík za zisku laktamu **89**, který byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie a získán s výtěžkem 88 % jako světle žlutá kapalina (Schéma 34).

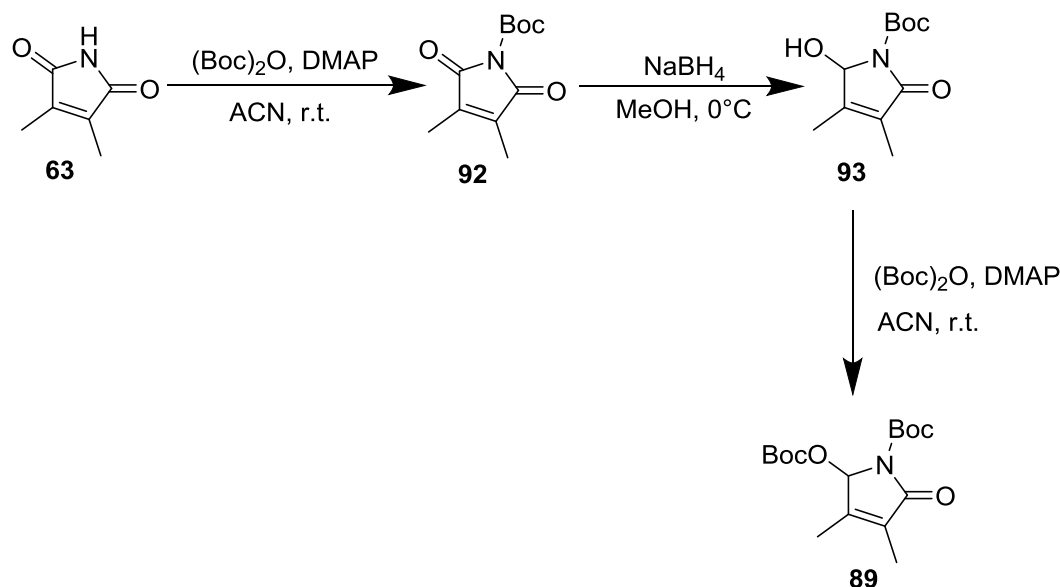


Schéma 34 – Druhá strategie přípravy laktamu **89**.

Druhá komponenta pro PD-coupling, enol **54**, byla připravena z ABC skeletu **84**. Výchozí látka byla rozpuštěna v methyl formiátu, který sloužil i jako činidlo, poté byl k roztoku přidán *tert*-butoxid draselný. Po okyselení a extrakci byl enol **54** vyizolován jako pevná bílá látka s výtěžkem 92 % a v dostatečné čistotě (Schéma 35)⁶⁶.

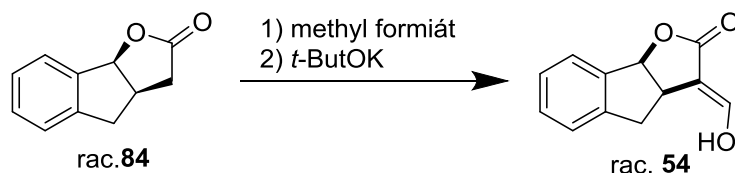


Schéma 35 – Příprava enolu **54**.

Samotný coupling byl proveden za podobných podmínek jako uvádí Reilzeman a Zwanenburg, s tím rozdílem, že byl použit jiný ligand. Jednalo se o DACH-pyridil

(**94**), který byl zvolen z důvodu jeho cenové dostupnosti. Celá reakce probíhala v suchém DCM, který byl zároveň zbavený kyslíku (freeze pump thaw). Jako báze byl použit suchý Et₃N (*Schéma 36*).

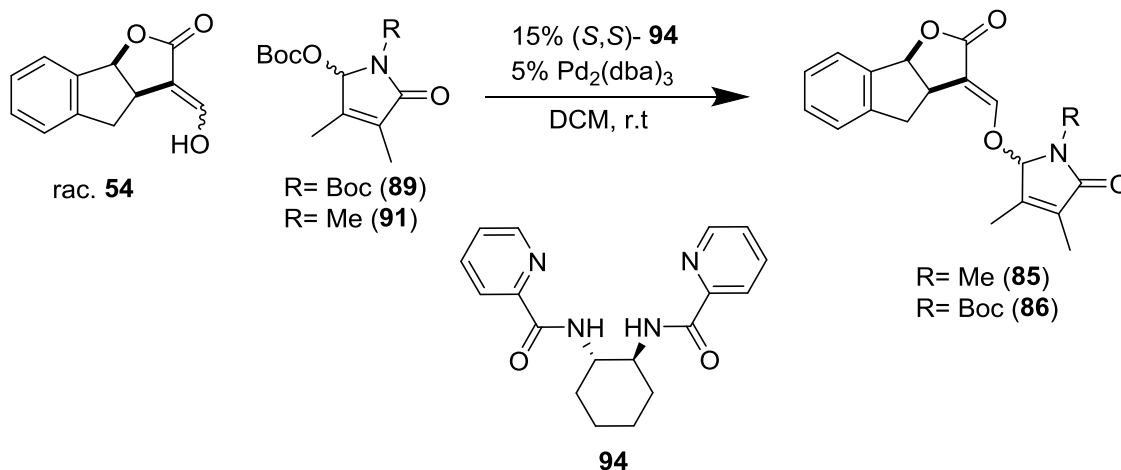


Schéma 36 – Příprava produktů 85 a 86 pomocí Pd-couplingu.

Jako první bylo zkoušeno připojit laktam **89**. Během reakce byl pozorován úbytek výchozího enolu **54** pomocí TLC. Po úplném zreagování byla reakce zpracována a bylo změřeno NMR. Podle analýzy nebyl viděn produkt **86** ani žádná z dalších reakčních komponent (**54**, **89**). Vzhledem ke komplexnosti reakční směsi nebyla směs dále analyzována. Ve druhém případě byly použity stejné podmínky, kdy bylo opět pozorováno úplné odreagování výchozího enolu **54**. Reakce byla zpracována a čištěna pomocí sloupcové chromatografie. Povedlo se izolovat majoritní produkt reakce jako světle žlutou pevnou látku. Srovnáním NMR spekter finálního produktu **85**, připraveného klasickou cestou a Pd-couplingem bylo potvrzeno, že se jedná o tytéž produkty. Pro porovnání lze uvést, že klasickou metodou byl produkt **85** získán s výtěžkem 28 % a za pomoci paladia byl výtěžek 16 %. Důvodem použití couplingu bylo ověření, jestli tuto metodu lze použít i pro laktamové kruhy. Nižší výtěžek může souviset s použitím jiného ligandu, než uvádí literatura a do budoucna by se mohlo zaměřit na optimalizaci této reakce a navýšit tak výtěžek reakce. Jednotlivé diasteromery nebyly separovány, tudíž nelze ověřit enantiomerní přebytek.

4.5 Strigolaktonová mimetika obsahující laktamový kruh

Strigolaktonová mimetika byla připravena z dostupného chloridu kyseliny benzoové a příslušných hydroxy laktamů **67**, **68** a **69**, které byly získány jako meziprodukty při

syntéze vedoucí k přípravě strigolaktonových analogů. Reakční podmínky byly převzaty z přípravy mimetik odvozených od hydroxybutenolidů²⁶. Reakce byly prováděny v suchém DCM a jako báze byl použit suchý pyridin (Schéma 37).

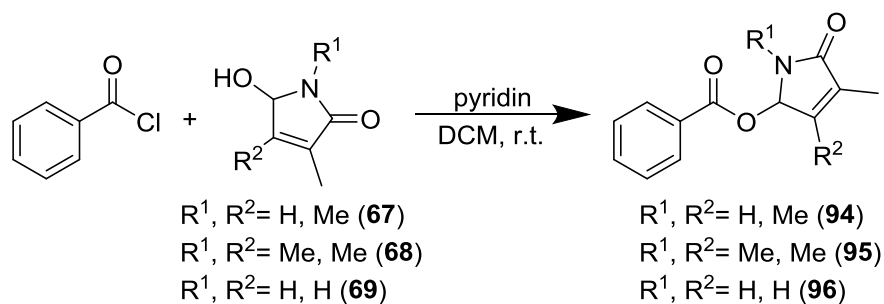


Schéma 37 – Příprava strigolaktonových mimetik **94**, **95**, **96**.

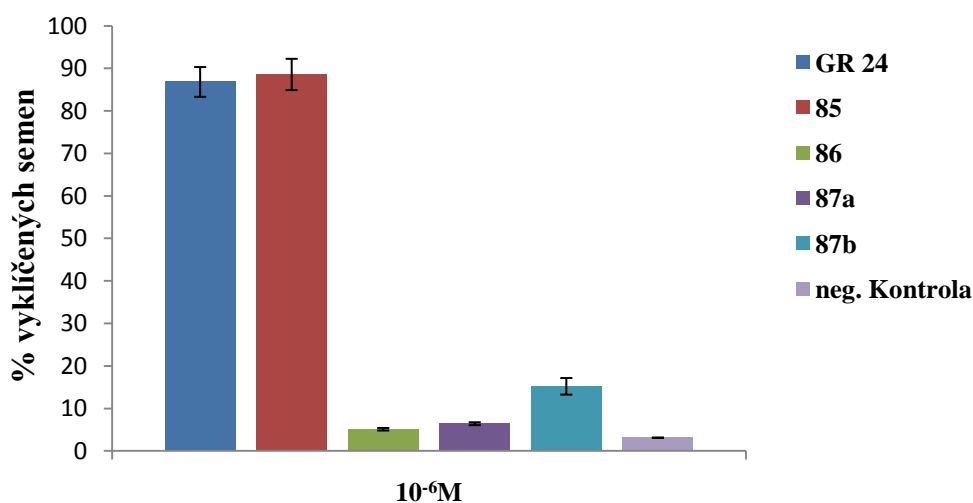
Ve všech případech byly produkty čištěny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Produkt **94** byl získán jako pevná světle žlutá látka s výtěžkem 66 %, produkt **95** jako bezbarvá olejovitá kapalina s výtěžkem 43 % a produkt **96** jako bílá pevná látka s výtěžkem 59 %. Poslední z hydroxylaktamů **70** se nepovedlo připravit, protože během redukce pomocí DIBAL-H došlo k jeho rozkladu viz. kapitola 4.1.3.

4.6 Biologické testování

Biologické testování bylo zaměřeno na zjištění, iniciaci klíčení semen parazitické rostliny *Striga hermonthica*. Testovány byly pouze analogy **85**, **86**, **87**, kdy u posledního zmíněného analogu se povedlo separovat jednotlivé diasteromery a byly otestovány každý zvlášť. Přesný postup biotestu je popsán v kapitole 5.3.

Biotest spočíval v porovnání aktivity jednotlivých analogů vůči GR 24, která sloužila jako pozitivní kontrola. Souběžně byl prováděn inhibiční test, který spočíval v aplikaci GR 24 a příslušného analoga současně. Smyslem tohoto testu bylo zjistit, zda-li některý z analogů je schopen snížit aktivitu GR 24 a tím inhibovat klíčení semen.

Všechny testované látky (GR 24, **85**, **86**, **87a**, **87b**) byly aplikovány ve vodném roztoku o koncentraci 10^{-6} M s 0,1 % acetonu (v/v). Negativní kontrolou byla voda obsahující 0,1 % acetonu (v/v). V případě pozitivní kontroly bylo pozorováno klíčení u 87 % semen. Nejvíce aktivním analogem byla **85**, která měla mírně vyšší aktivitu oproti pozitivní kontrole a iniciovala klíčení u 89 % semen. U ostatních analogů byla pozorována výrazně nižší aktivita. U látky **86** klíčilo 5 % semen, u **87a** 6 % a u **87b** 15 % (Graf 3)

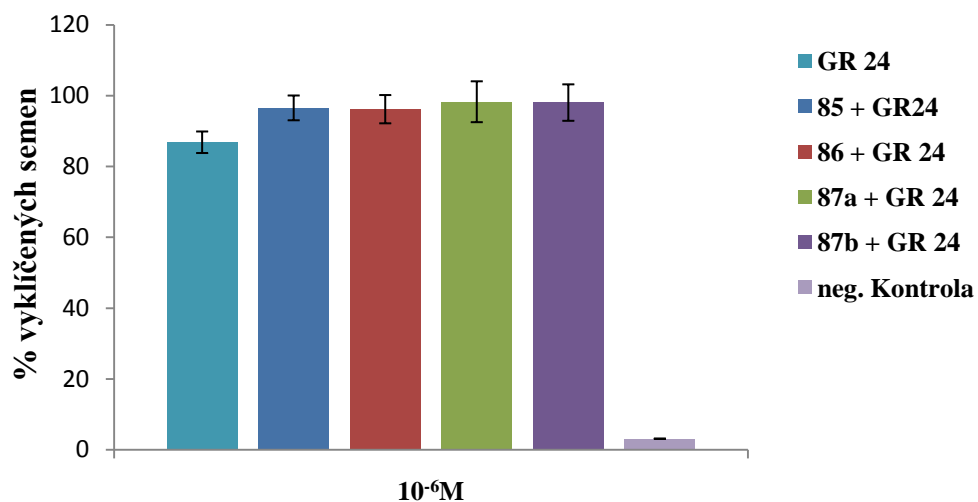


Graf 3 – Porovnání klíčivosti vůči semenům *Striga hermonthica* mezi GR24 a látkami **85**, **86**, **87a**, **87b**.

Vysoká aktivita analoga **85** bude muset být ještě potvrzena, protože aplikovaný roztok obsahoval 4 látky (2 sety diasteromerů, každý 2 enantiomery). V první řadě bude potřeba zkusit otestovat jednotlivé diasteromery a zjistit, který z nich je více aktivní. Další výzvou je otestování jednotlivých enantiomerů, které bude potřeba rozdělit na chirální koloně. Vysoká aktivita může být způsobena i kombinací jednotlivých látek a proto je důležité jednotlivé látky separovat a otestovat zvlášť.

V případě látky **86** a jednoho z diasteromerů **87a**, lze říci, že se nejedná o iniciátory klíčení. Protože při porovnání s negativní kontrolou, kde se klíčivost pohybovala okolo 3 %, jsou hodnoty podobné. Klíčení semen u negativní kontroly je v rozmezí standardní chyby biotestu, která se nevymyká obvykle pozorovanému klíčení.

Pro ověření, jestli jsou látky **86**, **87a** a **87b** inhibitory, byly jednotlivé látky společně s látkami **85** a **87b** testovány i v inhibičním testu. Jednotlivá analoga byla aplikována společně s GR 24, kdy koncentrace testované látky i GR 24. U látky **85** s GR 24 vzhledem k aktivitě testované látky klíčivost 86 % nepřekvapila, ovšem vysoká klíčivost byla pozorována i u ostatních testovaných látek **86**, **87a**, **87b** (Graf 4).



Graf 4 – Inhibiční test mezi GR 24 a látkami 85, 86, 87a, 87b.

Z výsledků nelze odvodit, zda látky **86**, **87a** a **87b** mohou být inhibitory klíčení. Pokud ano, jsou patrně účinné jen při vysoké koncentraci vzhledem ke koncentraci GR 24. Je důležité podotknout, že takovýto inhibiční test byl prováděn poprvé a jednalo se o testovací pokus, tudíž je potřeba tento test optimalizovat. Lze předpokládat, že látky **86**, **87a**, **87b** prostě nejsou biologicky aktivní vůči semenům *Striga hermonthica*.

5 Experimentální část

5.1 Metody

Reakce byly sledovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck). Pro vizualizaci TLC byla použita UV lampa (Camag) při vlnové délce λ 254 nm.

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla získána na přístroji Jeol 500 ECA při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Pro měření látek byly použity tyto rozpouštědla: deuterovaný chloroform (CDCl_3) a deuterované DMSO ($\text{DMSO-}d_6$). Chemické posuny jsou udávány v jednotkách ppm a jejich kalibrace byla provedena na rozpouštědlo δ (CHCl_3) = 7.24 ppm; δ ($\text{DMSO-}d_5$) = 2.49 ppm pro jádra ^1H , pro ^{13}C δ (CDCl_3) = 77 ppm; δ ($\text{DMSO-}d_6$) = 39.5 ppm.

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru značky Waters (Q-TOF MICRO). HPLC čistota připravených látek byla získána na koloně s reverzní fází (150 mm x 2,1 mm, 5 μm , Symmetry C18, Waters). Vzorokly byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanoseny na kolonu a eluovány lineárním gradientem (methanol/mravenčan amonný, pH = 4) při průtoku 0,3 ml/min. UV detekce probíhala v rozmezí vlnových délek 200-400 nm.

Bromace laktamových kruhů byla prováděna pomocí UV lampy značky Black-Ray B-100AP (100W, 365 nm). Semena parazitické rostliny *Striga hermonthica* byla inkubována v termostatu značky Biological thermostat BT 120. Vyklíčená semena byla počítána pomocí mikroskopu značky Motic Microscopy (SMZ 168 TL).

5.2 Příprava strigolaktonových analogů a mimetik

3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2,5-dion (63)

Anhydrid **61** (1 mmol) byl rozpuštěn v DMF (4 ml). Do roztoku byl za laboratorní teploty přidán HMDS (10 mmol) a methanol (5 mmol). Reakce byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 10 hodin. Po skončení reakce bylo DMF částečně odpařeno na vakuové odparce a odparek byl zředěn vodou. Produkt byl extrahován pomocí liquid:liquid extrakce (EtOAc : H_2O). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem chloridu sodného a vysušena bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a vyčištěn pomocí sloupcové

chromatografie (silikagel, petrolether : ethylacetát, 1:1). Čistý produkt byl získán jako pevná bílá látka s výtěžkem 90 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.96 (s, 6H), 7.43 (bs, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.70, 138.41, 172.42.

3-methyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion (64)

Anhydrid **62** (1 mmol) byl rozpuštěn v kyselině octové (3,7 ml). Následně byl přidán octan amonný (2,5 mmol). Reakční směs byla zahřáta na reflux pomocí olejové lázně. Po 5-ti hodinách byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu. Po skončení reakce bylo z reakční směsi odpařeno rozpouštědlo. Odparek byl zředěn studenou vodou a poté extrahován pomocí liquid:liquid extrakce (EtOAc : H_2O). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : ethylacetát, 1:1). Čistý produkt byl získán jako pevná bílá látka s výtěžkem 56 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.0-2.07 (m, 3H), 6.32-6.33 (m, 1H), 7.66 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.78, 128.30, 146.72, 170.80, 171.94.

1,3,4-trimethyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion (65)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Imid **63** (1 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (6,25 ml). K roztoku byl přidán uhličitan draselný (1,2 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 30-ti minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl do roztoku po kapkách přidán dimethylsulfát (1 mmol) a reakční směs byla refluxována po dobu 8 hodin a roztok byl následně ochlazen na laboratorní teplotu a poté zfiltrován. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a následně destilován za sníženého tlaku (b.p. 55-65°C/0,08 Torr). Čistý produkt byl získán ve formě bezbarvé olejovité kapaliny s výtěžkem 73 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.93 (s, 6H), 2.96 (s, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.64 (2xC), 23.72, 137.19 (2xC), 172.31 (2xC).

1,3-dimethyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion (66)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Imid **64** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém acetonu (6,25 ml). K roztoku byl přidán uhličitán draselný (1,2 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 30-ti minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl do roztoku přikapán dimethylsulfát (1,2 mmol) a reakční směs byla refluxována po dobu 4 hodin a roztok byl následně ochlazen na laboratorní teplotu a poté zfiltrován. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : ethylacetát, 3:1). Čistý produkt byl získán ve formě bezbarvé olejovité kapaliny s výtěžkem 52 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.06 (d, $J=1.83$ Hz, 3H), 2.97 (s, 3H), 6.30-6.32 (m, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.98, 23.75, 127.34, 145.76, 170.96, 171.96.

5-hydroxy-3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (67)

Imid **63** (1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (10 ml). Roztok byl ochlazen pomocí ledové lázně na 0°C . K roztoku byl po částech přidán borohydrid sodný (2,5 mmol). Reakce byla míchána 10 minut při 0°C a poté byla ohřáta na laboratorní teplotu. Po 1 hodině byla reakce ukončena přidáním 10 ml vody. Z reakční směsi byl odpařen methanol na vakuové odparce. Vodný roztok byl extrahován pomocí liquid:liquid extrakce (H_2O : EtOAc). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, DCM : MeOH, 9:1). Čistý produkt byl získán jako pevná bílá látka s výtěžkem 73 %.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.57 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 5.04 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.77 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.12 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.43, 11.74, 80.61, 127.84, 151.55, 173.19.

MS (ES+), m/z (%): 128.34 [M+1] (100)

5-hydroxy-1,3,4-trimethyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (68)

Imid **65** (1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (10 ml). Roztok byl ochlazen pomocí ledové lázně na 0°C. K roztoku byl po částech přidán borohydrid sodný (2,5 mmol). Reakce byla míchána 10 minut při 0°C a poté byla ohřata na laboratorní teplotu. Po 3 hodinách byla reakce ukončena přidáním 10 ml vody. Z reakční směsi byl odpařen methanol na vakuové odparce. Vodný roztok byl extrahován pomocí liquid:liquid extrakce (H₂O : EtOAc). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, DCM : MeOH, 9:1). Čistý produkt byl získán jako bezbarvá olejovitá kapalina s výtěžkem 92 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.69 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 2.90 (s, 3H), 4.89 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.32, 11.11, 26.10, 85.63, 128.76, 148.89, 171.43

MS (ES+), m/z (%): 142.40 [M+1] (100)

5-hydroxy-3-methyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (69)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Imid **64** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (10 ml). Následně byla reakční směs ochlazená na -78°C pomocí lázně (aceton/suchý led) a do takto zchlazeného roztoku byl přikapán DIBAL-H (1,5 mmol). Reakční směs byla míchána při -78°C po dobu 2 hodin a poté byla ohřata na laboratorní teplotu. Reakce byla ukončena přidáním roztoku vinanu

sodno-draselného. Vzniklý roztok byl míchán po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl produkt sorbován na silikagel jako vodný roztok a extrahován pomocí soxhletovy extrakce (rozpuštědlo EtOAc). Čistý produkt byl získán jako bílá pevná látka s výtěžkem 93 %.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.65-1.66 (m, 3H), 5.25 (m, 1H), 5.77 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.54-6.55 (m, 1H), 8.30 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.20, 77.92, 134.65, 141.67, 172.24.

MS (ES+), m/z (%): 114.30 [M+1] (100)

3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (71)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **67** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (10 ml). Poté byl za laboratorní teploty přidán Et_3SiH (1 mmol). Reakční směs byla ochlazena na -78°C pomocí lázně (aceton/ suchý led) a do takto zchlazeného roztoku byl po kapkách přidán $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 30-ti minut. Po uplynutí doby byl do roztoku přidán další ekvivalent Et_3SiH (1 mmol) a $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1 mmol). Reakční směs byla míchána při -78°C po dobu 10-ti minut a poté byla ohřáta na laboratorní teplotu, při které byla reakce míchána 3 hodiny. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO_3 (10 ml). Vzniklý roztok byl extrahován pomocí liquid:liquid extrakce ($\text{H}_2\text{O} : \text{DCM}$). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a byl získán v dostatečné čistotě s výtěžkem 97 % jako bílá pevná látka.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.77 (br. s, 3H), 1.95 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 7.18 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.19, 13.22, 49.99, 128.34, 148.95, 176.39.

MS (ES+), m/z (%): 112.40 [M+1] (100)

1,3,4-trimethyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (72)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **68** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (10 ml). Poté byl za laboratorní teploty přidán Et_3SiH (1 mmol). Reakční směs byla ochlazena na -78°C pomocí lázně (aceton/suchý led) a do takto zchlazeného roztoku byl po kapkách přidán $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 30-ti minut. Po uplynutí doby byl do roztoku přidán další ekvivalent Et_3SiH (1 mmol) a $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1 mmol). Reakční směs byla míchána při -78°C po dobu 10-ti minut a poté byla ohřáta na laboratorní teplotu, při které byla reakce míchána přes noc. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO_3 (10 ml). Vzniklý roztok byl extrahován pomocí liquid:liquid extrakce (H_2O : DCM). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem NaCl a bezvodým Na_2SO_4 , který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a byl získán v dostatečné čistotě s výtěžkem 97 % jako světle žlutá kapalina.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.78 (br. s, 3H), 1.94 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 3.70 (s, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.80, 12.95, 29.12, 56.28, 128.99, 145.13, 172.96

MS (ES+), m/z (%): 126.37 [M+1] (100)

3-methyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (73)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **69** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (10 ml). Poté byl za laboratorní teploty přidán Et_3SiH (1 mmol). Reakční směs byla zchlazena na -78°C pomocí lázně (aceton/suchý led) a do takto zchlazeného roztoku byl po kapkách přidán $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 30-ti minut. Po uplynutí doby byl do roztoku přidán další ekvivalent Et_3SiH (1 mmol) a $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1 mmol). Reakční směs byla míchána při -78°C po dobu 10-ti minut a poté byla ohřáta na laboratorní

teplotu, při které byla reakce míchána přes noc. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃ (10 ml). Vzniklý roztok byl extrahován do DCM (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem NaCl a bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a byl získán v dostatečné čistotě s výtěžkem 92 % jako bílá pevná látka.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.89-1.88 (m, 3H), 3.89-3.90 (m, 2H), 6.74 (s, 1H), 7.62 (br. s, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 10.92, 46.56, 135.39, 138.32, 175.82

***tert*-butyl 3,4-dimethyl-2-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (74)**

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Laktam **71** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém acetonitrilu (10 ml). Za laboratorní teploty byl přidán (Boc)₂O (1,25 mmol) a poté DMAP (0,6 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byl roztok zředěn DCM (20 ml) a poté extrahován 5% HCl. Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem NaCl a bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a byl získán v dostatečné čistotě s výtěžkem 88 % jako světle oranžová olejovitá kapalina.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.53 (s, 9H), 1.77 (br. s, 3H), 1.98 (br. s, 3H), 4.08 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.47, 13.39, 28.21, 52.92, 82.56, 129.03, 149.05, 149.90, 170.39.

***tert*-butyl 3-methyl-2-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (75)**

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Laktam **73** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém acetonitrilu (10 ml). Za laboratorní teploty byl přidán (Boc)₂O (1,25 mmol) a poté DMAP (0,6 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byl roztok zředěn DCM (20 ml)

a poté extrahován 5% HCl (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem NaCl a bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán ve formě světle žluté pevné látky s výtěžkem 63 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.53 (s, 9H), 1.85-1.87 (m, 3H), 4.18-4.16 (m, 2H), 6.78-6.77 (m, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 11.12, 28.18, 49.45, 82.85, 135.64, 137.89, 149.96, 169.95.

1,3-dimethyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (76)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Do suchého THF (10 ml) byl přidán NaH (1,5 mmol). Poté byl roztok ochlazen na 0°C pomocí ledové lázně. K takto ochlazenému roztoku byl po kapkách přidán laktam **73** (1 mmol) rozpuštěný v suchém THF (2 ml). Reakční směs byla míchána 10 minut při 0°C a poté ponechána ohřát na laboratorní teplotu, při které byla míchána po dobu 30-ti minut. Po uplynutí doby byl do reakční směsi přidán dimethylsulfát (1,05 mmol). Reakce byla míchána po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byl produkt filtrován přes křemelinu a filtrát poté zakoncentrován na vakuové odparce. Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, DCM : MeOH, 9:1) a izolován jako žlutá kapalina s výtěžkem 38 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.87-1.89 (m, 3H), 3.03 (s, 3H), 3.80 (br. s, 2H), 6.61-6.63 (m, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 11.52, 29.46, 52.61, 134.61, 136.02, 172.22.

5-bromo-1,3,4-trimethyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (77)

Reakce byla provedena v inertní atmosféře (argon). Laktam **72** (1 mmol) byl rozpuštěn v CCl₄ (10 ml), poté byl přidán NBS (1,1 mmol) a AIBN (0,006 mmol) za laboratorní

teploty. Reakční smě byla zahřáta na 80°C pomocí olejové lázně a zároveň ozařována UV lampou (365 nm) po dobu 5-ti hodin. Po uplynutí doby byla reakční smě ochlazena na laboratorní teplotu a poté zchlazena na -20°C. Zchlazený roztok byl poté zfiltrován a zakoncentrován na vakuové odparce. Produkt byl získán v dostatečné čistotě jako oranžová kapalina s výtěžkem 95 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.82-1.83 (m, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 5.95 (br. s, 1H).

***tert*-butyl 2-bromo-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (78)**

Reakce byla provedena v inertní atmosféře (argon). Laktam **74** (1 mmol) byl rozpuštěn v CCl₄ (10 ml), poté byl přidán NBS (1,1 mmol) a AIBN (0,006 mmol) za laboratorní teploty. Reakční smě byla zahřáta na 80°C pomocí olejové lázně a zároveň ozařována UV lampou (365 nm) po dobu 4 hodin. Po uplynutí doby byla reakční smě ochlazena na laboratorní teplotu a poté zchlazena na -20°C. Zchlazený roztok byl poté zfiltrován a zakoncentrován na vakuové odparce. Produkt byl získán v dostatečné čistotě jako oranžová kapalina s výtěžkem 92 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.58 (s, 9H), 1.83 (br. s, 3H), 2.10 (br. s, 3H), 6.29 (br. s, 1H).

***tert*-butyl 5-bromo-3-methyl-2-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (79)**

Reakce byla provedena v inertní atmosféře (argon). Laktam **75** (1 mmol) byl rozpuštěn v CCl₄ (10 ml), poté byl přidán NBS (1,1 mmol) a AIBN (0,006 mmol) za laboratorní teploty. Reakční smě byla zahřáta na 80°C pomocí olejové lázně a zároveň ozařována UV lampou (365 nm) po dobu 4 hodin. Po uplynutí doby byla reakční smě ochlazena na laboratorní teplotu a poté zchlazena na -20°C. Zchlazený roztok byl poté zfiltrován a zakoncentrován na vakuové odparce. Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : EtOAc, 2:1) a izolován jako pevná žlutá látka s výtěžkem 70 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.59 (s, 9H), 1.95-1.94 (m, 3H), 6.43-6.45 (m, 1H), 6.88-6.90 (m, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.85, 28.12, 57.86, 84.51, 134.85, 140.67, 147.73, 167.13.

5-bromo-1,3-dimethyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (80)

Reakce byla provedena v inertní atmosféře (argon). Laktam **76** (1 mmol) byl rozpuštěn v CCl_4 (10 ml), poté byl přidán NBS (1,1 mmol) a AIBN (0,006 mmol) za laboratorní teploty. Reakční směs byla zahřáta na 80°C pomocí olejové lázně a zároveň ozařována UV lampou (365 nm) po dobu 6,5 hodiny. Po uplynutí doby byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu a poté zchlazena na -20°C . Zchlazený roztok byl poté zfiltrován a zakoncentrován na vakuové odparce. Produkt byl získán v dostatečné čistotě jako oranžová olejovitá kapalina s výtěžkem 80 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.94-1.95 (m, 3H), 2.99 (s, 3H), 6.07 (br. s, 1H), 6.83-6.84 (m, 1H)

ethyl 2-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-karboxylát (82)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). K NaH (2,2 mmol) bylo přidáno suché DMF (1,4 ml) a diethylkarbonát (4 mmol) při laboratorní teplotě. Vzniklý roztok byl ohřát na 65°C pomocí olejové lázně. K ohřáté reakční směsi byl po kapkách přidán indanon **81** (1 mmol) rozpuštěný v 1 ml DMF. Reakce byla míchána při 65°C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí doby byl do reakční směsi přidán ethyl bromoacetát (1,5 mmol). Reakce byla míchána při 65°C další 2 hodiny a poté ochlazena na laboratorní teplotu, při které byla reakční směs zneutralizována pomocí AcOH. Surová reakční směs byla zakoncentrována na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve směsi $\text{Et}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}$ (10 ml : 10 ml) a poté vodná fáze extrahována Et_2O (3 x 10 ml). Organická fáze byla protřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na_2SO_4 , který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a získán jako hnědá kapalina s výtěžkem 80 %, která byla použita do další reakce bez předchozího čištění.

2-(1-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl) octová kyselina (53)

Keto diester **82** (1 mmol) byl rozpuštěn ve směsi AcOH (0,3 ml) a 6M HCl (0,3 ml). Vzniklý roztok byl zahřát na reflux pomocí olejové lázně a nechán refluxovat po dobu 4 hodin. Po uplynutí doby byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu, poté byla zředěna H₂O (5 ml) a vodná fáze extrahována EtOAc (5 x 10 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : EtOAc, 4:1). Čistý produkt byl získán ve formě oranžové pevné látky s výtěžkem 87 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 2.63 (q, *J* = 9.8 Hz, 1H), 2.89 (dd, *J* = 17.0, 4.4 Hz, 1H), 3.00-3.05 (m, 2H), 3.47 (dd, *J* = 17.1, 7.6 Hz, 1H), 7.39-7.39 (m, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.60 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 33.17, 35.20, 43.78, 123.96, 126.63, 127.47, 134.92, 136.38, 153.54, 174.35, 207.17

2-(1-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl) octová kyselina (83)

Ketokyselina **53** (1 mmol) byla rozpuštěna v H₂O (10 ml) a 0,2 M NaOH (1 mmol). K roztoku byl přidán NaBH₄. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byla reakce ochlazena na 0°C pomocí ledové lázně a poté okyselena 6M HCl na pH 4. Reakční směs byla extrahována do Et₂O. Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a získán jako žlutá pevná látka s výtěžkem 90 %, která byla použita do následné reakce bez dalšího čištění.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 2.50 (dd, *J* = 16.5, 8.9 Hz, 1H), 2.83-2.97 (m, 4H), 3.37-3.43 (m, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.83 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 33.17, 35.20, 43.78, 123.96, 126.63, 127.47, 134.92, 136.38, 153.54, 174.35, 207.17.

3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-inden[1,2-b]furan-2-on (84)

Hydroxy kyselina **83** (1 mmol) byla rozpuštěna v benzenu (4 ml). K roztoku byla za laboratorní teploty přidána *p*-TSA (0,03 mmol). Reakční směs byla zahřáta na 80°C pomocí olejové lázně a míchána po dobu 8 hodin. Po uplynutí doby byl benzen odpařen na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v Et_2O a poté extrahován nasyceným roztokem Na_2CO_3 . Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na_2SO_4 , který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, DCM). Čistý produkt byl získán ve formě pevné bílé látky s výtěžkem 85 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.38 (dd, $J = 18.0, 5.5$ Hz, 1H), 2.86-2.93 (m, 2H), 3.29-3.37 (m, 2H), 5.88 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.26-7.36 (m, 3H), 7.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 35.77, 37.42, 38.00, 87.78, 125.44, 126.46, 127.67, 130.08, 138.82, 142.58, 177.07.

MS (ES+), m/z (%): 175.02 [M+1] (100)

(E)-1,3,4-trimethyl-5-((2-oxo-3a,4-dihydro-2H-indeno[1,2-b]furan-3(8bH)-ylidene)methoxy)-1H-pyrrol-2(5H)-on (85)

Pro přípravu látky byly použity následující dva postupy:

1) Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). ABC skelet **84** byl rozpuštěn v suchém DME (10 ml). Poté byl do roztoku přidán methyl formiát (1,5 mmol). Reakční směs byla ochlazená na 0°C pomocí ledové lázně a následně byl přidán *tert*-butoxid draselný (1,2 mmol) ve třech porcích. Reakční směs byla ohřáta na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Po úplném odreagování **84** byl přidán bromovaný laktam **77** rozpuštěný v DME (3 ml). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Poté bylo DME odpařeno na vakuové odparce. Odparek

byl rozpuštěn ve směsi DCM : H₂O (10 ml : 10 ml) a vodná fáze extrahována DCM (3 x 15 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel pasivovaný pomocí Et₃N, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán ve formě pevné bílé látky s výtěžkem 28 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.8-1.85 (m, 6H), 1.81-1.91 (m, 6H), 2.92 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 3.10-3.12 (m, 2H), 3.44-3.50 (m, 2H), 3.94-3.99 (m, 2H), 5.35 (s, 2H), 5.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.1-7.19 (m, 2H), 7.22-7.34 (m, 8H), 7.49 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.80, 8.83, 11.29, 11.32, 26.92, 29.79, 37.62, 37.66, 39.05, 39.09, 85.81, 92.64, 111.79, 111.84, 125.19, 126.57, 127.60, 130.06, 133.24, 133.34, 139.08, 139.11, 142.63, 143.94, 144.06, 149.51, 149.65, 170.89, 170.98, 171.78

MS (ES+), *m/z* (%): 326.62 [M+1] (100)

2) Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Laktam **91** (2 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (7,7 ml), který byl předem zbavený kyslíku pomocí freeze pump thaw. Do roztoku byl za laboratorní teploty přidán Pd₂(dba)₃ (5 %) a ligand **94** (15 %). Reakční směs byla míchána po dobu 20-ti minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl přidán enol **54** (1 mmol) a Et₃N (1 mmol) a roztok byl míchán po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl odpařen DCM a reakční směs byla okamžitě nanesena na sloupcovou chromatografii (silikagel pasivovaný pomocí Et₃N, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán s výtěžkem 16 % jako pevná bílá látka.

(E)-tert-butyl-3,4-dimethyl-2-oxo-5-((2-oxo-3a,4-dihydro-2H-indeno[1,2-b]furan-3(8bH)-ylidene)methoxy)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-karboxylát (86)

Pro přípravu látky byly použity následující dva postupy:

1) Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). ABC skelet **84** byl rozpuštěn v suchém DME (10 ml). Poté byl do roztoku přidán methyl formiát (1,5 mmol). Reakční směs byla ochlazena na 0°C pomocí ledové lázně a následně byl přidán *tert*-butoxid draselný (1,2 mmol) ve třech přidáních. Reakční směs byla ohřáta na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Po úplném odreagování **84** byl přidán bromovaný laktam **78** rozpuštěný v DME (3 ml). Reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě přes noc. Po uplynutí doby bylo DME odpařeno na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve směsi DCM : H₂O (10 ml : 10 ml) a vodná fáze extrahována DCM (3 x 15 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel pasivovaný pomocí Et₃N, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán ve formě pevné žluté látky s výtěžkem 64 %.

2) Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Laktam **89** (2 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (7,7 ml), který byl předem zbavený kyslíku pomocí freeze pump thaw. Do roztoku byl za laboratorní teploty přidán Pd₂(dba)₃ (5 %) a ligand **94** (15 %). Reakční směs byla míchána po dobu 20-ti minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl přidán enol **54** (1 mmol) a Et₃N (1 mmol) a roztok byl míchán po dobu 1 hodiny při laboratorní teploty. Po uplynutí doby byl odpařen DCM a poté změřeno NMR, které neukázalo přítomnost produktu.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.43 (s, 9H), 1.54 (s, 9H), 1.85-1.86 (m, 6H), 1.96-1.97 (m, 6H), 3.00-3.07 (m, 2H), 3.35-3.45 (m, 2H), 3.89-3.93 (m, 2H), 5.83-5.87 (m, 2H), 5.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.17-7.32 (m, 8H), 7.47-7.49 (m, 2H), 7.52 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 28.20, 37.49, 37.63, 38.95, 60.49, 84.40, 84.46, 85.81, 91.18, 91.93, 125.14, 125.27, 126.50, 126.59, 127.54, 127.57, 130.04, 131.57, 131.90, 146.41, 146.60, 148.21, 148.37, 153.48, 154.46, 167.84, 168.01, 171.81, 171.84

MS (ES+), m/z (%): 412.77 [M+1] (100)

(E)-tert-butyl-3-methyl-2-oxo-5-((2-oxo-3a,4-dihydro-2H-indeno[1,2-b]furan-3(8bH)-ylidene)methoxy)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-karboxylát (87)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). ABC skelet **84** byl rozpuštěn v suchém DME (10 ml). Poté byl do roztoku přidán methyl formiát (1,5 mmol). Reakční směs byla ochlazena na 0°C pomocí ledové lázně a následně byl přidán *tert*-butoxid draselný (1,2 mmol) ve třech přidáních. Reakční směs byla ohřáta na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Po úplném odreagování **84** byl přidán bromovaný laktam **79** rozpuštěný v DME (3 ml). Reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě přes noc. Po uplynutí doby bylo DME odpařeno na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve směsi DCM : H₂O (10 ml : 10 ml) a vodná fáze extrahována DCM (3 x 15 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel pasivovaný pomocí Et₃N, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán ve formě pevné žluté látky s výtěžkem 55 %.

87a

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.56 (s, 9H), 1.97-1.98 (m, 3H), 3.09-3.13 (m, 1H), 3.38-3.43 (m, 1H), 3.88-3.93 (m, 1H), 5.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.07-6.08 (m, 1H), 6.63-6.64 (m, 1H), 7.20-7.33 (m, 4H), 7.49 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 28.17, 37.40, 38.96, 48.86, 88.67, 110.52, 125.17, 126.55, 127.54, 130.00, 135.71, 138.87, 139.14, 142.66, 148.28, 153.14, 167.45, 171.78, 175.60

MS (ES+), m/z (%): 398.76 [M+1] (25)

87b

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.46 (s, 9H), 1.98 (br. s, 3H), 3.02-3.06 (m, 1H), 3.36-3.41 (m, 1H), 3.89-3.92 (m, 1H), 5.95 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.05 (br. s, 1H), 6.67 (br. s, 1H), 7.20 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.27-7.33 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.54-7.55 (m, 1H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 10.91, 28.07, 37.43, 38.95, 84.76, 85.80, 89.47, 110.13, 125.26, 126.50, 127.53, 130.03, 135.86, 138.49, 142.58, 148.14, 154.12, 167.64, 171.79

MS (ES+), *m/z* (%): 398.76 [M+1] (45)

(*E*)-1,3-dimethyl-5-((2-oxo-3a,4-dihydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-3(8*bH*)-ylidene)methoxy)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (88)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). ABC skelet **84** byl rozpuštěn v suchém DME (10 ml). Poté byl do roztoku přidán methyl formiát (1,5 mmol). Reakční směs byla ochlazena na 0°C pomocí ledové lázně a následně byl přidán *tert*-butoxid draselný (1,2 mmol) ve třech přidáních. Reakční směs byla ohřáta na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Po úplném odreagování **84** byl přidán bromovaný laktam **80** rozpuštěný v DME (3 ml). Reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě přes noc. Po uplynutí doby bylo DME odpařeno na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve směsi DCM : H₂O (10 ml : 10 ml) a vodná fáze extrahována DCM (3 x 15 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel pasivovaný pomocí Et₃N, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán ve formě pevné žluté látky s výtěžkem 27 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.95-1.96 (m, 3H), 2.95-2.96 (m, 3H), 3.05-3.10 (m, 1H), 3.41-3.46 (m, 2H), 3.91-3.97 (m, 1H), 5.55-5.56 (m, 1H), 5.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.53-6.54 (m, 1H), 7.23-7.32 (m, 4H), 7.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.27, 15.35, 26.89, 39.02, 56.81, 57.29, 65.95, 85.98, 89.93, 90.16, 90.29, 111.67, 125.23, 126.53, 127.59, 130.10, 134.11, 134.16, 140.60, 142.65, 150.04, 150.16, 169.67, 170.30, 172.02

***tert*-butyl (1,3,4-trimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-2-yl) karbonát (91)**

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **68** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém acetonitrilu (14 ml). Za laboratorní teploty byl přidán $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1,25 mmol) a poté DMAP (0,6 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byl roztok zředěn DCM (20 ml) a poté extrahován H_2O (3 x 15 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na_2SO_4 , který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a získán jako tmavě oranžová pevná látka v dostatečné čistotě. Výtěžek reakce byl kvantitativní.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.52 (s, 9H), 1.79 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 2.92 (s, 3H), 6.06 (br. s, 1H).

***tert*-butyl 3,4-dimethyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (92)**

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Imid **63** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém acetonitrilu (10 ml). Za laboratorní teploty byl přidán $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1,25 mmol) a poté DMAP (0,6 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byl roztok zředěn DCM (20 ml) a poté extrahován 5% HCl (3 x 15 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na_2SO_4 , který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a získán jako světle červená kapalina v dostatečné čistotě. Výtěžek reakce byl kvantitativní.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.55 (s, 9H), 1.97 (s, 6H).

***tert*-butyl 2-hydroxy-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (93)**

Imid **92** (1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (10 ml). Roztok byl ochlazen pomocí ledové lázně na 0°C. K roztoku byl po částech přidán borohydrid sodný (2 mmol). Reakce byla míchána 10 minut při 0°C a poté byla ohřáta na laboratorní teplotu. Po 3 hodinách byla reakce ukončena přidáním 10 ml vody. Z reakční směsi byl odpařen methanol na vakuové odparce. Vodný roztok byl extrahován EtOAc (5 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a získán jako pevná bílá látka s výtěžkem 70 % a dostatečné čistotě.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.56 (s, 9H), 1.78 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 5.64 (br. s, 1H).

***tert*-butyl-2-((*tert*-butoxykarbonyl)oxy)-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-karboxylát (89)**

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **93** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém acetonitrilu (10 ml). Za laboratorní teploty byl přidán (Boc)₂O (1,05 mmol) a poté DMAP (0,4 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byl roztok zředěn DCM (20 ml) a poté extrahován 5% HCl (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether: EtOAc, 4:1). Čistý produkt byl izolován jako světle žlutá kapalina s výtěžkem 88 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.51 (s, 18H), 1.79 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 6.67 (br. s, 1H).

(*E*)-3-(hydroxymethylen)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-2-on (54)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). ABC skelet **84** (1 mmol) byl rozpuštěn v methyl formiátu (10,5 ml). Vzniklý roztok byl ochlazen na 0°C pomocí ledové lázně. Do zchlazené reakční směsi byl přidán *t*-ButOK (5 mmol).

Reakce byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním 1M HCl (10 ml). Vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a získán v dostatečné čistotě s výtěžkem 92 % jako bílá pevná látka.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.97 (dd, $J = 17.0, 2.9$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 16.8, 8.9$ Hz, 2H), 3.82-3.87 (m, 1H), 5.86 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.21-7.30 (m, 3H), 7.40 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 11.20 (br. s, 1H).

3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-yl benzoát (94)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **67** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (3,3 ml). Poté byl do roztoku přidán chlorid kyseliny benzoové (1,5 mmol) a suchý pyridin (2,0 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním H_2O (10 ml) a poté okyselena na pH 4. Vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : EtOAc, 2:1). Čistý produkt byl získán jako pevná světle žlutá látka s výtěžkem 66 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.85 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 6.25 (br. s, 1H), 6.81 (br. s, 1H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.57-7.60 (m, 1H), 8.01-8.03 (m, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.37, 11.91, 81.23, 128.65, 129.13, 129.91, 131.32, 133.83, 147.45, 167.00, 173.68.

1,3,4-trimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-yl benzoát (95)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **68** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (3,3 ml). Poté byl do roztoku přidán chlorid kyseliny benzoové (1,5 mmol) a suchý pyridin (2,0 mmol).

Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním H₂O (10 ml) a poté okyselena na pH 4. Vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán jako bezbarvá olejovitá kapalina s výtěžkem 43 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.86 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 6.56 (br. s, 1H), 7.45-7.49 (m, 2H), 7.60-7.63 (m, 1H), 8.05-8.06 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.76, 11.52, 27.21, 84.75, 128.72, 129.09, 130.00, 131.53, 133.87, 145.12, 166.63, 171.79

4-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-yl benzoát (96)

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Hydroxylaktam **69** (1 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (3,3 ml). Poté byl do roztoku přidán chlorid kyseliny benzoové (1,5 mmol) a suchý pyridin (2,0 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby byla reakce ukončena přidáním H₂O (10 ml) a poté okyselena na pH 4. Vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakoncentrován na vakuové odparce a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : EtOAc, 1:1). Čistý produkt byl získán jako pevná bílá látka s výtěžkem 59 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.96 (s, 3H), 6.43 (s, 1H), 6.74 (br. s, 1H), 6.78 (br. s, 1H), 7.43-7.46 (m, 2H), 7.57-7.61 (m, 1H), 8.00-8.03 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 10.78, 79.20, 128.64, 129.02, 129.93, 133.84, 136.83, 138.69, 166.84, 172.82

5.3 Biologické testování

Biotest byl prováděn na semenech parazitické rostliny *Striga hermonthica*. Nejdříve byla semena sterilizována pomocí vodného roztoku chlornanu sodného (2 g aktivního chlóru/100 ml) a přidaného Tritonu X-100 1% (v/v). Sterilizace probíhala 5 minut, poté byla semena přefiltrována přes skleněnou fritu a promyta destilovanou vodou. Semena byla ponechána volně vyschnout po dobu 3 hodin.

Do 6-ti jamkové plastové destičky byly přidány 2 kusy filtračního papíru do každé jamky, které byly navlhčeny 3 ml destilované vody. Do každé jamky byly přidány 3 skelné filtrační disky o průměru 1 cm. Na tyto disky byla přidána semena (okolo 25 na každý skelný disk). Semena byla přikryta druhým skelným filtračním diskem. Do každé jamky byly opět přidány 3 ml destilované vody. Destička byla uzavřena a vložena do uzavíratelného plastového sáčku. Takto nachystané destičky byly dány do inkubátoru, kde byly inkubovány ve tmě při 27°C po dobu 2 týdnů.

Po uplynutí doby inkubace byly jednotlivé skelné filtrační disky vyjmuty z destičky a vysušeny na filtračním papíře po dobu 1 hodiny. Před vrácením skelných filtračních disků byly z 6-ti jamkové destičky odebrány filtrační papíry, dno bylo vysušeno buničinou a poté byly přidány skelné filtrační disky se semeny (3 disky do každé jamky).

Jednotlivá analoga byla aplikována v jedné koncentraci, která byla připravena ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok jednotlivých látek (GR 24, **85**, **86**, **87a**, **87b**) byl připraven rozpuštěním jednotlivých látek v 1 ml acetonu, kdy byla získána koncentrace 10^{-3} M. Tento roztok byl dále ředěn 100x, kdy byla získána koncentrace 10^{-5} M a dále byl ředěn ještě 10x, kdy byla získána finální koncentrace 10^{-6} M s objemovým obsahem acetonu 0,1%. Negativní kontrola byla ředěna stejným způsobem bez přítomnosti jakékoliv látky. Roztoky pro inhibiční test byly ředěny ze zásobního roztoku o koncentraci 10^{-5} M tak, aby finální roztok obsahující GR 24 a příslušný analog kdy koncentrace testované látky i GR 24 byla 10^{-6} M s obsahem acetonu 0,2 %.

Na jednotlivé skelné filtrační disky bylo napipetováno 100 μ l příslušné látky, popřípadě směsi GR24 a jednotlivých analogů. Poté bylo napipetováno 4 ml destilované vody do mezikruží 6-ti jamkové destičky. Destička byla uzavřena a vložena do

plastového uzavíratelného sáčku. Takto připravená semena byla inkubována ve tmě po dobu 6 dní při teplotě 27°C.

Po uplynutí doby inkubace byla vyklíčená semena spočítána pod mikroskopem a stanoveny procenta vyklíčených semen.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce byla připravena 4 strigolaktonová analoga a 3 strigolaktonová mimetika, která ve své struktuře obsahují laktamový D-kruh. V rámci přípravy těchto látek byly úspěšně aplikovány syntetické postupy uplatňující se při syntéze strigolaktonových analogů a mimetik obsahující D-laktonový kruh.

Látky **85**, **86**, **87a** a **87b** byly podrobeny biologickému testování zaměřeného na aktivitu vůči iniciaci klíčení semen parazitické rostliny *Striga hermonthica* a inhibiční test, který měl určit, zda-li některá z látek působí jako inhibitor. Výbornou aktivitu měla látka aktivita látky **85**, jež měla aktivitu vyšší než použitá pozitivní kontrola GR 24 (89 % oproti 87 %). Ostatní testované látky nebyly příliš aktivní a nejedná se patrně o iniciátory klíčení.

V rámci dalšího studia tohoto tématu by bylo záhodno se zaměřit na níže uváděné problémy. V případě látky **85** by bylo dobré potvrdit její aktivitu. Zejména pak oddělit a otestovat všechny diasteromery zvlášť a v další fázi i enantiomery a určit, která z látek je zodpovědná za aktivitu. Dále je nutné otestovat i zbývající připravené látky **88**, **94**, **95** a **96**, aby toto testování bylo kompletní. Kromě testu klíčivosti by mohla být připravená analoga a mimetika otestována i v ostatních oblastech strigolaktonové aktivity.

Syntetická část by mohla být obohacena o optimalizaci kroku používající Pd-coupling pro připojení ABC skeletu a D-laktamového kruhu. Navíc byl navržen postup přípravy zbývajícího strigolaktonového mimetika **97**, který využívá bromovaného laktamu **80** a sodnou sůl kyseliny benzoové (*Schéma 38*).

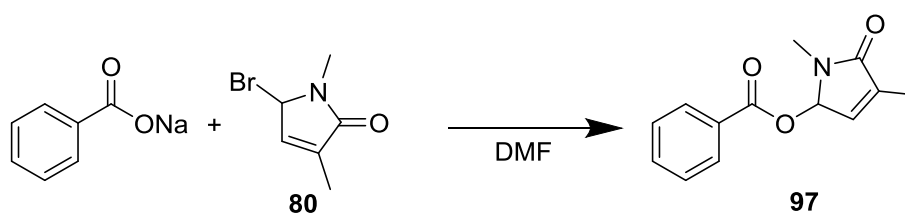


Schéma 38 – Alternativní přístup pro přípravu 97.

7 Literatura

1. Smith, J. L.; De Moraes, C. M.; Mescher, M. C. *Pest Management Science* **2009**, *65*, 497.
2. Sato, D.; Awad, A. A.; Takeuchi, Y.; Yoneyama, K. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2005**, *69*, 98.
3. Xie, X.; Yoneyama, K.; Yoneyama, K. *Annual review of phytopathology* **2010**, *48*, 93.
4. Brown, R.; Greenwood, A. D.; Johnson, A. W.; Long, A. G. *Biochemical Journal* **1951**, *48*, 559.
5. Brown, R.; Greenwood, A. D.; Johnson, A. W.; Long, A. G.; Tyler, G. J. *Biochemical Journal* **1951**, *48*, 564.
6. Brown, R.; Greenwood, A. D.; Johnson, A. W.; Lansdown, A. R.; Long, A. G.; Sunderland, N. *Biochemical Journal* **1952**, *52*, 571.
7. Cook, C. E.; Whichard, L. P.; Turner, B.; Wall, M. E.; Egle, G. H. *Science* **1966**, *154*, 1189.
8. Siame, B. A.; Weerasuriya, Y.; Wood, K.; Ejeta, G.; Butler, L. G. *Journal of agricultural and food chemistry* **1993**, *41*, 1486.
9. Hauck, C.; Müller, S.; Schildknecht, H. *Journal of plant physiology* **1992**, *139*, 474.
10. Yokota, T.; Sakai, H.; Okuno, K.; Yoneyama, K.; Takeuchi, Y. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1967.
11. Akiyama, K.; Matsuzaki, K.-i.; Hayashi, H. *Nature* **2005**, *435*, 824.
12. Smith, S. E.; Read, D. In *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*; Academic Press: London, 2008, p 13.
13. Goldwasser, Y.; Yoneyama, K.; Xie, X.; Yoneyama, K. *Plant Growth Regulation* **2008**, *55*, 21.
14. Yoneyama, K.; Xie, X.; Sekimoto, H.; Takeuchi, Y.; Ogasawara, S.; Akiyama, K.; Hayashi, H.; Yoneyama, K. *New Phytologist* **2008**, *179*, 484.
15. Gomez-Roldan, V.; Fermas, S.; Brewer, P. B.; Puech-Pages, V.; Dun, E. A.; Pillot, J.-P.; Letisse, F.; Matusova, R.; Danoun, S.; Portais, J.-C.; Bouwmeester,

- H.; Becard, G.; Beveridge, C. A.; Rameau, C.; Rochange, S. F. *Nature* **2008**, 455, 189.
16. Umehara, M.; Hanada, A.; Yoshida, S.; Akiyama, K.; Arite, T.; Takeda-Kamiya, N.; Magome, H.; Kamiya, Y.; Shirasu, K.; Yoneyama, K.; Kyojuka, J.; Yamaguchi, S. *Nature* **2008**, 455, 195.
 17. Matusova, R.; Rani, K.; Verstappen, F. W. A.; Franssen, M. C. R.; Beale, M. H.; Bouwmeester, H. J. *Plant physiology* **2005**, 139, 920.
 18. Johnson, A. W.; Gowada, G.; Hassanali, A.; Knox, J.; Monaco, S.; Razavi, Z.; Rosebery, G. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1981**, 1734.
 19. Johnson, A. W.; Rosebery, G.; Parker, C. *Weed Research* **1976**, 16, 223.
 20. Zwanenburg, B.; Mwakaboko, A. S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19, 7394.
 21. Mangnus, E. M.; Zwanenburg, B. *Journal of agricultural and food chemistry* **1992**, 40, 1066.
 22. Hamiaux, C.; Drummond, Revel S. M.; Janssen, Bart J.; Ledger, Susan E.; Cooney, Janine M.; Newcomb, Richard D.; Snowden, Kimberley C. *Current Biology* **2012**, 22, 2032.
 23. Kagiya, M.; Hirano, Y.; Mori, T.; Kim, S.-Y.; Kyojuka, J.; Seto, Y.; Yamaguchi, S.; Hakoshima, T. *Genes to Cells* **2013**, 18, 147.
 24. Zhao, L.-H.; Zhou, X. E.; Wu, Z.-S.; Yi, W.; Xu, Y.; Li, S.; Xu, T.-H.; Liu, Y.; Chen, R.-Z.; Kovach, A.; Kang, Y.; Hou, L.; He, Y.; Xie, C.; Song, W.; Zhong, D.; Xu, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, C.; Melcher, K.; Xu, H. E. *Cell Res* **2013**, 23, 436.
 25. Nakamura, H.; Xue, Y.-L.; Miyakawa, T.; Hou, F.; Qin, H.-M.; Fukui, K.; Shi, X.; Ito, E.; Ito, S.; Park, S.-H.; Miyauchi, Y.; Asano, A.; Totsuka, N.; Ueda, T.; Tanokura, M.; Asami, T. *Nature communications* **2013**, 4.
 26. Zwanenburg, B.; Nayak, S. K.; Charnikhova, T. V.; Bouwmeester, H. J. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2013**, 23, 5182.
 27. Zwanenburg, B.; Pospíšil, T.; Čavar Zeljković, S. *Planta* **2016**, 1.
 28. Ueguchi-Tanaka, M.; Matsuoka, M. *Current Opinion in Plant Biology* **2010**, 13, 503.

29. Ueguchi-Tanaka, M.; Nakajima, M.; Katoh, E.; Ohmiya, H.; Asano, K.; Saji, S.; Hongyu, X.; Ashikari, M.; Kitano, H.; Yamaguchi, I.; Matsuoka, M. *The Plant Cell* **2007**, *19*, 2140.
30. Jiang, L.; Liu, X.; Xiong, G.; Liu, H.; Chen, F.; Wang, L.; Meng, X.; Liu, G.; Yu, H.; Yuan, Y.; Yi, W.; Zhao, L.; Ma, H.; He, Y.; Wu, Z.; Melcher, K.; Qian, Q.; Xu, H. E.; Wang, Y.; Li, J. *Nature* **2013**, *504*, 401.
31. Alder, A.; Jamil, M.; Marzorati, M.; Bruno, M.; Vermathen, M.; Bigler, P.; Ghisla, S.; Bouwmeester, H.; Beyer, P.; Al-Babili, S. *Science* **2012**, *335*, 1348.
32. Isin, E. M.; Guengerich, F. P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2007**, *1770*, 314.
33. Booker, J.; Sieberer, T.; Wright, W.; Williamson, L.; Willett, B.; Stirnberg, P.; Turnbull, C.; Srinivasan, M.; Goddard, P.; Leyser, O. *Developmental Cell* **2005**, *8*, 443.
34. Seto, Y.; Sado, A.; Asami, K.; Hanada, A.; Umehara, M.; Akiyama, K.; Yamaguchi, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 1640.
35. Zhang, Y.; van Dijk, A. D. J.; Scaffidi, A.; Flematti, G. R.; Hofmann, M.; Charnikhova, T.; Verstappen, F.; Hepworth, J.; van der Krol, S.; Leyser, O.; Smith, S. M.; Zwanenburg, B.; Al-Babili, S.; Ruyter-Spira, C.; Bouwmeester, H. *J. Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 1028.
36. Motonami, N.; Ueno, K.; Nakashima, H.; Nomura, S.; Mizutani, M.; Takikawa, H.; Sugimoto, Y. *Phytochemistry* **2013**, *93*, 41.
37. Mori, K.; Matsui, J.; Yokota, T.; Sakai, H.; Bando, M.; Takeuchi, Y. *Tetrahedron Lett* **1999**, *40*, 943.
38. Ueno, K.; Nomura, S.; Muranaka, S.; Mizutani, M.; Takikawa, H.; Sugimoto, Y. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, *59*, 10485.
39. Müller, S.; Hauck, C.; Schildknecht, H. *Journal of Plant Growth Regulation* **1992**, *11*, 77.
40. Mori, K.; Matsui, J.; Bando, M.; Kido, M.; Takeuchi, Y. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 6023.

41. Wigchert, S. C. M.; Kuiper, E.; Boelhouwer, G. J.; Nefkens, G. H. L.; Verkleij, J. A. C.; Zwanenburg, B. *Journal of agricultural and food chemistry* **1999**, *47*, 1705.
42. Zwanenburg, B.; Mwakaboko, A. S.; Reizelman, A.; Anilkumar, G.; Sethumadhavan, D. *Pest Management Science* **2009**, *65*, 478.
43. Xie, X.; Yoneyama, K.; Kusumoto, D.; Yamada, Y.; Yokota, T.; Takeuchi, Y.; Yoneyama, K. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 427.
44. Zwanenburg, B.; Pospíšil, T. *Molecular Plant* **2013**, *6*, 38.
45. Reizelman, A.; Scheren, M.; Nefkens, G. H. L.; Zwanenburg, B. *Synthesis* **2000**, *2000*, 1944.
46. Reizelman, A.; Zwanenburg, B. *nepublikované výsledky* **2001**.
47. Zwanenburg, B.; Čavar Zeljković, S.; Pospíšil, T. *Pest Management Science* **2016**, *72*, 15.
48. Thuring, J. W. J. F.; Nefkens, G. H. L.; Schaafstra, R.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5047.
49. Sugimoto, Y.; Wigchert, S. C. M.; Thuring, J. W. J. F.; Zwanenburg, B. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 1259.
50. Reizelman, A.; Zwanenburg, B. *Eur J Org Chem* **2002**, 810.
51. MacAlpine, G. A.; Raphael, R. A.; Shaw, A.; Taylor, A. W.; Wild, H.-J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1974**, 834.
52. Heather, J. B.; Mittal, R. S. D.; Sih, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98*, 3661.
53. Brooks, D. W.; Bevinakatti, H. S.; Powell, D. R. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 3779.
54. Dailey, O. D. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 1984.
55. Reizelman, A.; Zwanenburg, B. *Synthesis* **2000**, *2000*, 1952.
56. Mangnus, E. M.; Dommerholt, F. J.; De Jong, R. L. P.; Zwanenburg, B. *Journal of agricultural and food chemistry* **1992**, *40*, 1230.
57. Malik, H.; Rutjes, F. P. J. T.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7198.
58. Fukui, K.; Ito, S.; Ueno, K.; Yamaguchi, S.; Kyojuka, J.; Asami, T. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21*, 4905.
59. Davis, P. D.; Bit, R. A. *Tetrahedron Lett* **1990**, *31*, 5201.

60. Kuehne, P.; Hesse, M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4575.
61. Bessho, J.; Shimotsu, Y.; Mizumoto, S.; Mase, N.; Yoda, H.; Takabe, K. *Heterocycles* **2004**, *63*, 1013.
62. Khan, A.; Marson, C. M.; Porter, R. A. *Synthetic Communications* **2001**, *31*, 1753.
63. Mase, N.; Nishi, T.; Hiyoshi, M.; Ichihara, K.; Bessho, J.; Yoda, H.; Takabe, K. *J Chem Soc Perk T 1* **2002**, 707.
64. Pedregal, C.; Ezquerra, J.; Escribano, A.; Carreño, M. C.; García Ruano, J. L. *Tetrahedron Lett* **1994**, *35*, 2053.
65. Bermejo, F. A.; Rico-Ferreira, R.; Bamidele-Sanni, S.; García-Granda, S. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 8287.
66. Bromhead, L. J.; Visser, J.; McErlean, C. S. P. *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 1516.