

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie

Habilitační práce

Chirální sulfoxidy – význam v redoxních biologických procesech
a jejich asymetrická příprava

RNDr. Jiří Míšek, Ph.D.

Praha 2019

Obsah

1. Úvod	3
2. Methioninsulfoxid jako post-translační modifikace a jeho redukce methioninsulfoxidreduktázami (Msr)	5
2.1. Oxidace methioninu v proteinech a její význam.....	5
2.2. Role methioninsulfoxidreduktáz (Msr) v organismech.....	6
3. Biologicky aktivní chirální sulfoxidy a jejich asymetrická syntéza.....	7
3.1. Biologicky aktivní chirální sulfoxidy	7
3.2. Asymetrická příprava chirálních sulfoxidů.....	8
4. Shrnutí vlastních výsledků	10
4.1. Vývoj fluorescenčních sond pro sledování aktivity Msr a jejich aplikace	10
4.2. Vývoj enzymatických metod pro enantioselektivní syntézu chirálních sulfoxidů.....	14
5. Závěr	18
6. Seznam literatury	19
7. Poděkování	22
8. Přílohy.....	23

1. Úvod

Homochiralita je fenomén, který je vlastní všem formám života. Základní stavební bloky všech organismů (DNA, proteiny) jsou složeny pouze z jednoho ze dvou možných enantiomerů (D-cukry, L-aminokyseliny).^[1] Tento fakt je příčinou toho, že živé organizmy mohou na molekulární úrovni interagovat se dvěma enantiomery jedné chirální molekuly zcela odlišným způsobem. Tento jev je v posledních dekádách jedním z ústředních témat ve farmaceutickém průmyslu. Chirální léčiva jsou často produkována v enantiomerně čisté formě, jelikož daný enantiomer má preferované farmakologické vlastnosti.^[2–4] V extrémních případech může opačný enantiomer působit nikoliv jako léčivo, ale naopak jako toxin.^[5] Na druhé straně je živými organizmy, zejména rostlinami, produkována široká skupina fyziologicky aktivních sekundárních metabolitů ve stereoizomerně čistých formách.^[6] Stereoizomerní čistota je dána enzymy, které katalyzují jednotlivé kroky biosyntéz, a proto se tyto sekundární metabolity vyskytují též převážně pouze v jedné enantiomerní formě.

Nicméně v organizmech včetně člověka mohou vznikat i nová stereogenní centra, a to v obou stereoizomerních formách *R* a *S*. Takovým příkladem může být vznik sulfoxidů methioninu, a to buď volného nebo vázaného v proteinech.^[7] Tyto methioninsulfoxidy vznikají následkem oxidačního stresu, který je nevyhnutelnou součástí života aerobních organismů. Oxidačním působením různých endogenních i exogenních reaktivních částic dochází k oxidaci methioninu na methioninsulfoxid. Na základě nedávných experimentů se předpokládá, že na globální úrovni proteinů vznikají oba epimery methioninsulfoxidu *R* a *S* v poměru zhruba jedna ku jedné.^[8] Na přítomnost methioninsulfoxidu v proteinech lze nahlížet jako na druh post-translační modifikace, která má zásadní vliv na funkci různých proteinů. V organizmech existují dva enzymy, které jsou schopné redukovat methioninsulfoxid v proteinech zpět na methionin. Jedná se o methioninsulfoxidreduktázu A (MsrA) a methioninsulfoxidreduktázu B (MsrB).^[9,10] Tyto reduktázy jsou exkluzivně stereoselektivní, MsrA redukuje (*S*)-epimer a MsrB redukuje (*R*)-epimer methioninsulfoxidu. Aktivita těchto enzymů hraje zásadní roli při regulaci úrovně methioninsulfoxidů v proteinech, a tím má i přímý vliv na jejich funkci. Odchýlená aktivita těchto enzymů byla též prokázána v příčinné souvislosti s různými onemocněními, např. s nádory prsu.^[11]

Tato habilitační práce shrnuje výsledky mého výzkumu v oblasti vývoje nových chirálních fluorescenčních sond pro selektivní sledování aktivity výše zmíněných enzymů a jejich využití při studiu oxidačního stresu v organizmech. Dále popisuje objev nových enzymů s podobnou aktivitou, které mohou mít zásadní vliv na antibakteriální strategie využívající oxidačního stresu. Ve druhé části této práce je popsáno využití těchto enzymů v přirozené nebo modifikované formě k asymetrické přípravě různých chirálních sulfoxidů, což je skupina biologicky aktivních látek, z nichž některé jsou důležitými léčivy. Efektivní způsob asymetrické přípravy těchto léčiv je též dokumentován.

2. Methioninsulfoxid jako post-translační modifikace a jeho redukce methioninsulfoxidreduktázami (Msr)

2.1. Oxidace methioninu v proteinech a její význam

Nevyhnutelným důsledkem života aerobních organismů je vznik tzv. reaktivních kyslíkových částic (ROS). ROS jsou produkty neúplné redukce kyslíku na vodu během buněčné respirace. Tyto vedlejší reakce vedou k produktům jako např. superoxid nebo peroxid vodíku, které mohou dále reagovat s buněčnými složkami a generovat další reaktivní druhy kyslíku, dusíku a chloru (hydroxylový radikál, peroxyinitrit, chloraminy, kyselina chlorná atd.).^[12–17] Tyto reaktivní molekuly hrají důležitou roli v buněčné signalizaci. Nicméně, jejich zvýšená hladina může narušit normální redoxní rovnováhu, a tím způsobit oxidační stres, který může zásadně narušit celkovou integritu organismu, a je považován za jednu z hlavních příčin stárnutí a nemocí souvisejících se stárnutím.^[18] Proto je v buňkách udržována redoxní rovnováha, která je zajištěna řadou enzymů a obecně celkovým reduktivním prostředím zprostředkovaným vysokými koncentracemi glutathionu. Oxidace proteinů ROS je spojena hlavně s cysteinovými postranními řetězci, ale též s postranními řetězci methioninu.^[19–21] Zatímco oxidace cysteinu a její role v redoxní regulaci a buněčné signalizaci jsou relativně dobře známy a byly důkladně studovány,^[22] oxidace methioninu a její role byly studovány v daleko menší míře, přestože methionin v proteinech může být oxidován ROS stejně snadno jako cystein.^[19] Hlavním produktem oxidace methioninu je odpovídající methioninsulfoxid. Protože methioninsulfoxid má chirální centrum na atomu síry, může oxidace methioninu na methioninsulfoxid pomocí ROS vést ke směsi epimerů *R* a *S*. Tento fakt byl nedávno potvrzen na globální úrovni u prokaryotických i eukaryotických organismů.^[8] Je odhadováno, že až 6 % všech methioninů v proteinech je spontánně oxidováno za aerobních podmínek.^[23] Tento podíl může být výrazně vyšší za podmínek oxidačního stresu. Například u proteinů buněčné obálky bakterií *Escherichia coli* (*E. coli*) může být při oxidačním stresu vlivem imunitního systému až 40 % methioninových zbytků ve formě methioninsulfoxidu. Hlavním důsledkem oxidace methioninu na methioninsulfoxid v proteinech je ztráta funkce proteinů, a to díky konformačním změnám a následné denaturaci proteinů. Jako dobře studované příklady této regulace mohou být uvedeny proteiny jako calmodulin, NF-κB nebo ribosomální protein L12.^[24–28] Tyto proteiny hrající klíčovou roli při regulaci metabolismu, imunitního systému

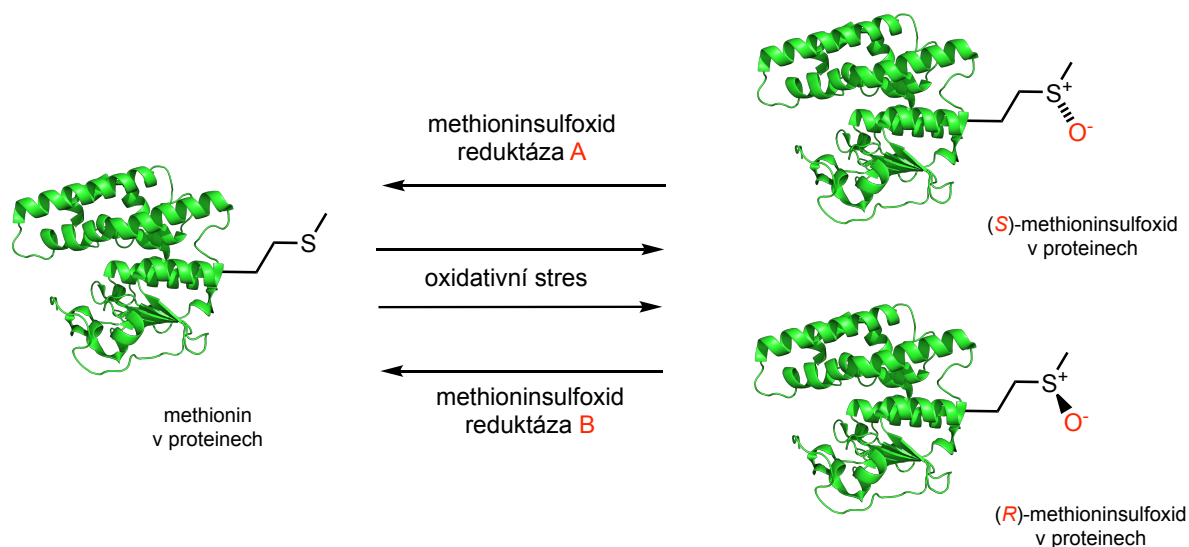
a zánětlivých procesech obsahují methioninové zbytky, které oxidací na methioninsulfoxid způsobují ztrátu funkce těchto proteinů. Nicméně v poslední době se ukazuje, že oxidace methioninu na methioninsulfoxid nemusí nutně vést pouze k deaktivaci proteinů. Například kináza CAMKII a transkripční faktor HypT obsahují methioninové zbytky, jejichž oxidace na methioninsulfoxid je klíčová pro aktivaci těchto proteinů.^[29,30] Těchto několik příkladů poukazuje na vzrůstající důležitost rovnováhy methionin-methioninsulfoxid při redoxní regulaci buněčných procesů, a lze předpokládat, že v budoucnu bude nalezeno mnoho dalších proteinů, jejichž funkce je ovlivňována touto rovnováhou. Zde je třeba poznamenat, že analýza této oxidační post-translační modifikace není nijak jednoduchá, jelikož neexistuje specifická protilátka nebo reaktivní malá molekula, která by byla schopna selektivního značení nutného pro kvantitativní analýzu.

2.2. Role methioninsulfoxidreduktáz (Msr) v organizmech

Methioninsulfoxid generovaný v organizmech může být redukován zpět na methionin pomocí enzymů methioninsulfoxidreduktáz (Obrázek 1). Oxidace methioninu v proteinech na methioninsulfoxid a jeho zpětná redukce tak může být skutečně označena jako post-translační modifikace. První methioninsulfoxidreduktáza byla identifikována v bakterii *E. coli* v roce 1981 a později byla nazvána methioninsulfoxidreduktáza A (MsrA).^[9] Bližší studium MsrA ukázalo, že tento enzym je exkluzivně stereoselektivní, neboť redukuje pouze (S)-epimer methioninsulfoxidu.^[31] Trvalo dalších více než dvacet let, než byla objevena methioninsulfoxidreduktáza B (MsrB), která má opačnou stereoselektivitu a redukuje (R)-epimer methioninsulfoxidu.^[10] Dosud byla charakterizována celá řada Msr z nejrůznějších organismů. Msr jsou enzymy, které se vyskytují ve všech aerobních organizmech ve všech třech doménách života, což poukazuje na jejich význam.^[32]

Důležitost této třídy enzymů byla prokázána „knockout“ studii MsrA u řady organismů (bakterie, kvasinky, myši).^[33–36] U těchto organismů byla nepřítomnost MsrA spojena s výrazně zvýšenou náchylností k oxidačnímu stresu. Naopak, zvýšená exprese MsrA též zvyšuje odolnost proti oxidačnímu stresu v buňkách, rostlinách a octomilkách (*Drosophilla*).^[37–39] Zajímavým fenoménem je fakt, že zvýšená exprese MsrA v octomilkách téměř zdvojnásobuje jejich průměrnou délku života, nicméně uměle zvýšená aktivita MsrB

žádný vliv na stárnutí a délku života nevykazuje.^[40,41] Jak již bylo naznačeno v předešlé kapitole, značné množství buněčných proteinů je buď aktivováno nebo deaktivováno oxidací methioninu na methioninsulfoxid, a v centru tohoto důležitého regulačního mechanismu leží právě MsrA a MsrB. U těchto enzymů bylo prokázáno, že hrají důležitou roli při vzniku některých závažných neurologických poruch (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba) a nádorových onemocnění.^[11,42,43] Například u nádoru prsu byla snížená aktivita MsrA spojena s výrazně horší prognózou u pacientek. Na myších modelech tohoto onemocnění bylo prokázáno, že úplné vyřazení exprese MsrA vede k dramatickému urychlení růstu těchto prsních nádorů. Je zřejmé, že Msr hrají centrální roli v redoxní rovnováze a signalizaci, nicméně sledování aktivity těchto enzymů v reálném čase *in vivo* bylo až doposud téměř nemožné.



Obrázek 1. Znázornění reverzibilní oxidace methioninových zbytků v proteinech.

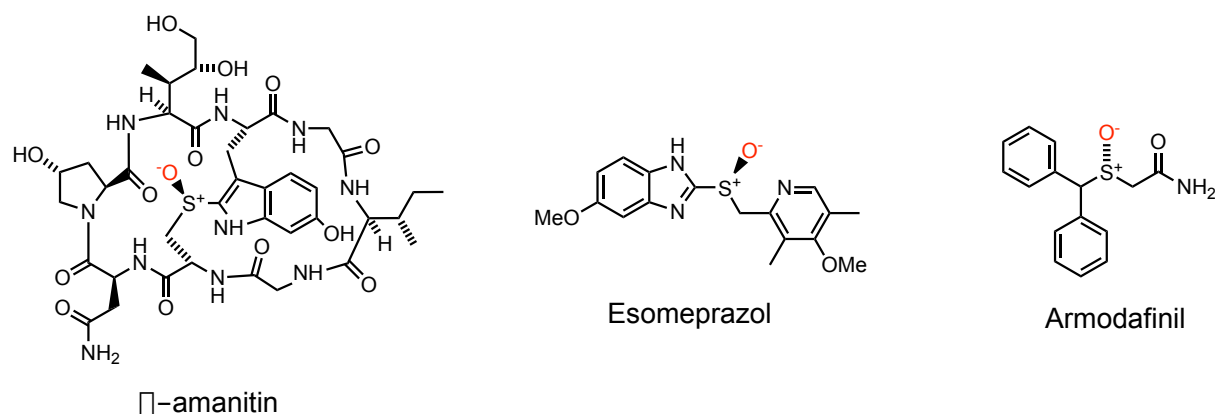
3. Biologicky aktivní chirální sulfoxidy a jejich asymetrická syntéza

3.1. Biologicky aktivní chirální sulfoxidy

V přírodě se kromě již zmíněných methioninsulfoxidů v proteinech vyskytují i další chirální sulfoxidy, jejichž absolutní konfigurace na atomu síry výrazně ovlivňuje jejich biologickou aktivitu.^[44] Příkladem může být houbový toxin α -amanitin nebo sulfoxidy odvozené od penicilinů a cefalosporinů. α -Amanitin je peptidový toxin z muchomůrky zelené, který obsahuje ve své struktuře chirální sulfoxid (Obrázek 2). V přírodě se vyskytující α -amanitin má

sulfoxid v konfiguraci *R*. Změna konfigurace sulfoxidu na *S* má za následek dramatické až dvacetinásobné snížení toxicity tohoto selektivního inhibitoru RNA polymerázy.^[45] Ve skupině penicilinových antibiotik je známo, že (*R*)-sulfoxid fenoxymethylpenicilinu je pětikrát účinnější než jeho (*S*)-diastereoizomer.^[46]

Chirální sulfoxidy patří též mezi úspěšná léčiva (Obrázek 2). Esomeprazol jako jedno z nejprodávanějších léčiv poslední dekády je na trhu jako enantiomerně čistý (*S*)-sulfoxid.^[47] Biodostupnost a farmakokinetický profil (*S*)-enantiomeru tohoto inhibitoru protonové pumpy je daleko lepší než v případě opačného enantiomeru nebo racemické směsi. Dalším příkladem je Armodafinil, který se používá k léčbě narkolepsie.^[48] Armodafinil obsahuje ve své molekule (*R*)-sulfoxid, který jej činí metabolicky stabilnějším než opačný enantiomer, a má tedy lepší farmakokinetický profil. Mezi další léčiva s chirálními sulfoxidy lze uvést Sulindac nebo Ricobendazole.^[49] Chirální sulfoxidy jsou také užitečné synthony, ligandy a pomocné skupiny při asymetrické přípravě dalších chirálních sloučenin.^[50]

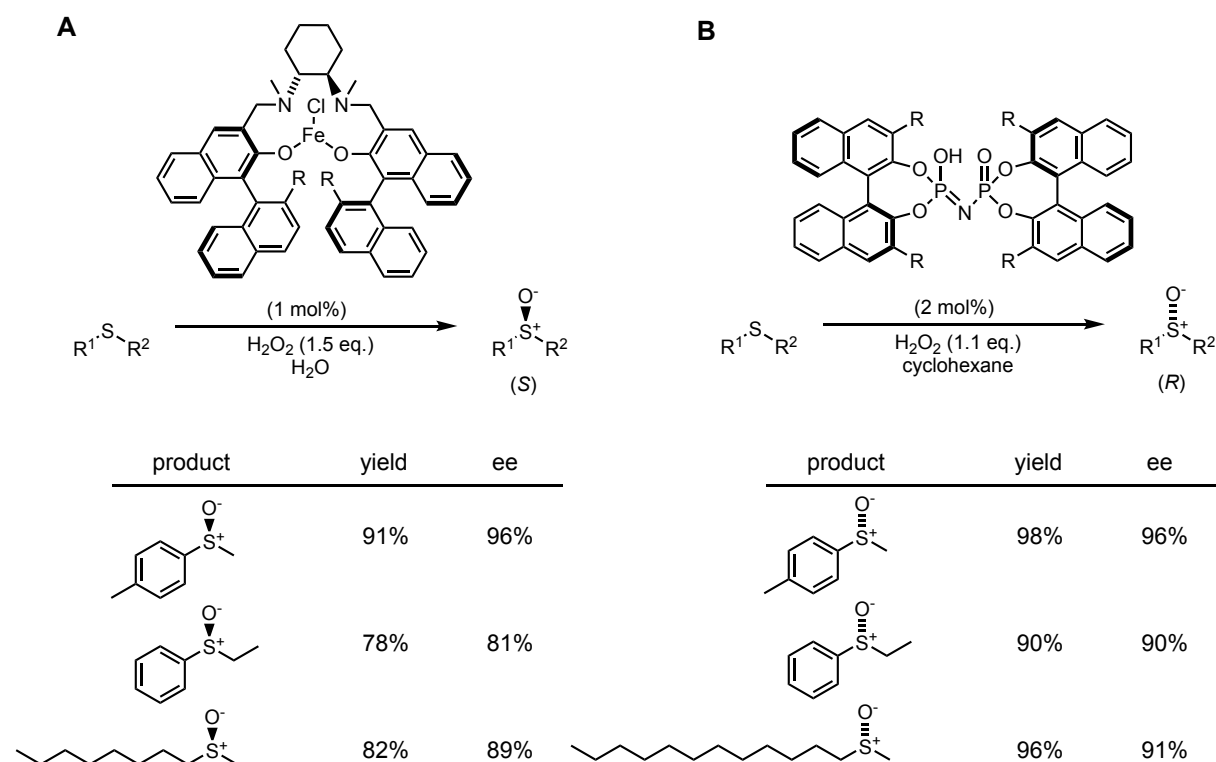


Obrázek 2. Příklady biologicky aktivních sloučenin s chirálními sulfoxidy.

3.2. Asymetrická příprava chirálních sulfoxidů

V posledních desetiletích bylo vyvinuto velké množství metod pro přípravu chirálních sulfoxidů.^[51] Mezi první relativně obecné metody patří Andersenův přístup využívající diastereoizomerních sulfinátů,^[52] který byl dále rozvinut a zobecněn Kaganem v 80. a 90. letech.^[53] Přes nespornou užitečnost tohoto přístupu se jedná o metodu vyžadující stechiometrické množství chirální pomocné skupiny, netriviální separaci diastereoizomerních meziproductů a poskytující nízké výtěžky pro některé enantiomery. Mnoho pozornosti bylo

proto věnováno vývoji katalytických metod pro asymetrickou oxidaci prochirálních sulfidů na sulfoxidy. Dva příklady takových metod z nedávné doby jsou uvedeny na Obrázku 3.^[54,55] Jedná se o velmi efektivní a obecné metody, které poskytují vysoce enantiomerně obohacené produkty, a to zejména ve skupině alkyl(aryl)sulfoxidů. Nicméně substráty s komplexnějšími alkylovými substituenty nebo prochirální alkyl(alkyl)sulfidy patří mezi notoricky obtížné substráty poskytující chirální sulfoxidy s podstatně nižšími enantiomerními nadbytky. Taktéž přítomnost heteroatomů v molekule substrátu vede často k potlačení reaktivity/enantioselektivity u těchto metod. Nutno říci, že pro tuto reakci byla též použita řada přirozených oxidáz, nicméně jejich substrátová specifita je daleko vyšší než je tomu u chemokatalytických metod.^[56]



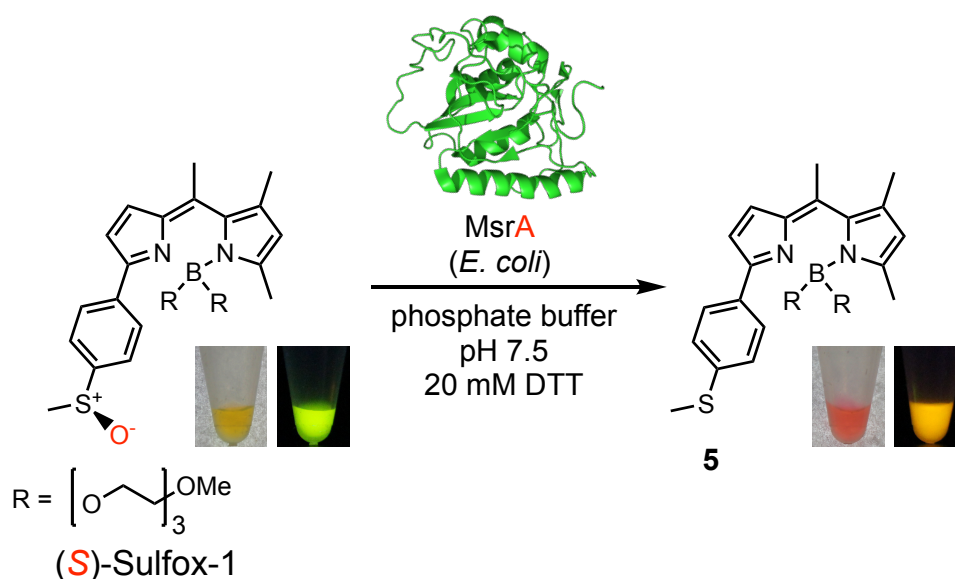
Obrázek 3. Příklady dvou efektivních metod pro asymetrickou přípravu chirálních sulfoxidů.

4. Shrnutí vlastních výsledků

4.1. Vývoj fluorescenčních sond pro sledování aktivity Msr a jejich aplikace

Jak již bylo naznačeno v předešlé části, methioninsulfoxidreduktázy (Msr) jsou důležitými regulátory oxidačního stresu v organizmech a jejich odchýlená aktivita se může podílet na vzniku a rozvoji vážných onemocnění. Z těchto důvodů je žádoucí mít jednoduchou metodu pro sledování aktivity těchto enzymů *in vivo* v reálném čase. Nicméně do nedávné doby existovaly pouze nepřímé metody založené na fluorescenčně nebo radioizotopicky značeném methioninsulfoxidu.^[57,58] Takto značený methioninsulfoxid je inkubován s lyzátem příslušných buněk či tkání a úroveň redukce na methionin je sledována pomocí chromatografických metod. Tento způsob měření má samozřejmě řadu nedostatků. Měřená aktivita enzymů v lyzátu může být odlišná od aktivity v přirozeném prostředí buňky. Dále se v lyzátech ztrácí časové a prostorové informace o aktivitě enzymů v buňkách, tkáních a celých organizmech. Tato omezení bránila hlubšímu vhledu do molekulárně-biologických funkcí Msr. Proto jsme si položili otázku, zda by bylo možné vytvořit nový efektivní nástroj pro sledování aktivity Msr. Jako optimální se jevila fluorescenční sonda, jež by nesla reaktivní sulfoxid, který by redukcí Msr vyvolal změnu ve fluorescenčních vlastnostech sondy. Jelikož taková sonda neexistovala, bylo v mojí laboratoři navrženo několik fluorescenčních sond, které by mohly takovou funkci vykonávat. Jako optimální se ukázala sonda na bázi BODIPY fluoroforu, která byla nazvána Sulfox-1. Sulfox-1 má ve své struktuře BODIPY jádro, na které je v poloze 2 přes benzenové jádro připojena methylsulfoxidová funkční skupina. Jak je známo z předešlých prací o BODIPY fluoroforu, připojením arylových substituentů v této poloze dochází k bathochromnímu posunu fluorescence, jelikož je rozšířen konjugovaný systém fluoroforu.^[59] Navíc bylo ukázáno, že různé substituenty na arylové skupině mohou dále ovlivňovat emisní maximum centrálního fluoroforu tak, že elektrondonorní skupiny zvyšují posun emisního maxima do červené oblasti.^[60] Sulfox-1 byl připraven jako čistý (*S*)-enantiomer společně s jeho redukovanou formou sulfidem **5** (Obrázek 4).^[61] Měření spektroskopických vlastností těchto dvou látek skutečně ukázalo, že sulfid **5** má emisní maximum posunuto o 25 nm do červené oblasti při zachování vysokého kvantového výtěžku fluorescence. Tyto experimenty prokázaly, že (*S*)-Sulfox-1 by mohl sloužit jako tzv. podílová (ratiometric) sonda pro sledování aktivity MsrA. V dalším kroku byla testována reaktivita (*S*)-Sulfox-1 s rekombinantní MsrA (*E. coli*).

Ukázalo se, že MsrA ochotně redukuje sulfoxidovou funkční skupinu (*S*)-Sulfoxu-1, a měření kinetiky dle Michaelise a Mentenové ukázalo, že (*S*)-Sulfox-1 je minimálně stejně dobrým substrátem jako přirozený substrát methioninsulfoxid. Byla též připravena enantiomerní sonda (*R*)-Sulfox-1, která však byla za daných podmínek s MsrA zcela nereaktivní. Tyto experimenty prokázaly možnost použití (*S*)-Sulfox-1 jako selektivní fluorescenční sondy pro sledování aktivity MsrA v reálném čase (Obrázek 4). (*S*)-Sulfox-1 byl první takovou sondou svého druhu a byl následován řadou dalších podobných sond vyvinutých v jiných laboratořích.^[62,63] Užitečnost sondy (*S*)-Sulfox-1 byla ověřena v *in vivo* studiích s bakteriemi *E. coli*. Jak je již známo, bakterie *E. coli* mají zvýšenou aktivitu MsrA při některých stresových podmínkách (růst ve stacionární fázi nebo nedostatek živin).^[64] Sonda (*S*)-Sulfox-1 byla schopna postihnout přirozené variace aktivity MsrA v *E. coli*, a tím prokázat možnost použití *in vivo*.



Obrázek 4. Signální mechanismus chirální fluorescenční sondy (*S*)-Sulfox-1.

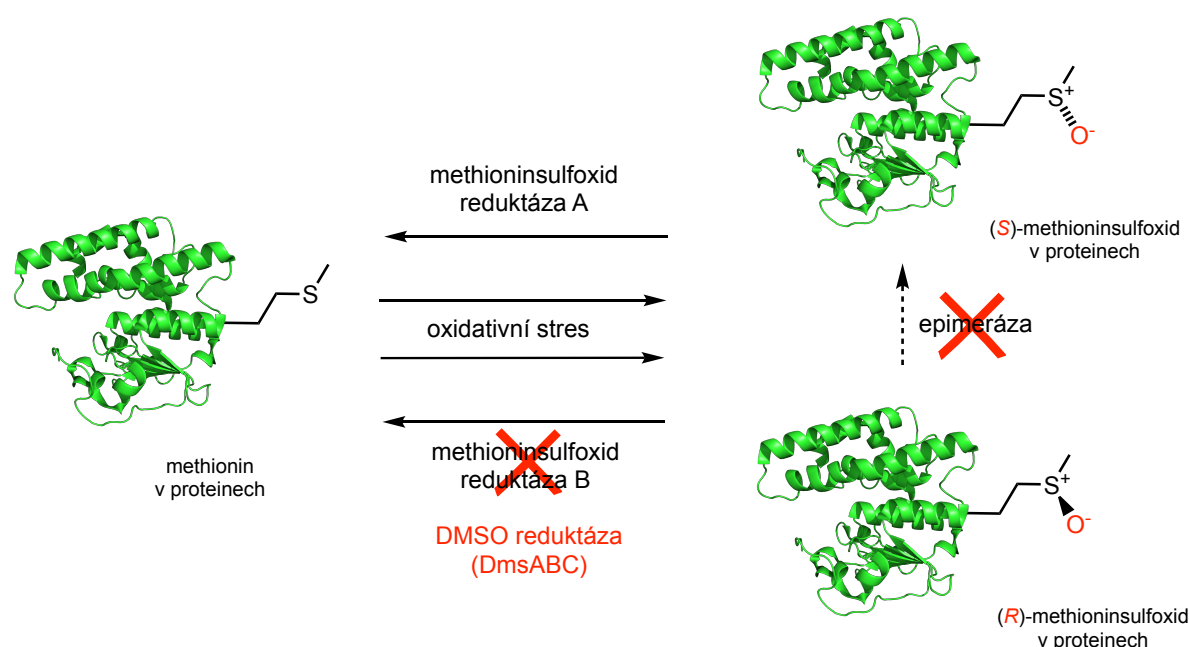
Jak již bylo zmíněno, redukce reaktivního sulfoxidu (*S*)-Sulfox-1 na sulfid **5** pomocí MsrA je spojena s posunem emisního maxima o 25 nm do červené oblasti. Tento fakt je využit pro sledování aktivity pomocí tzv. podílové (ratiometric) analýzy. Tato metoda má určitou výhodu proti tzv. intenzitním (*off/on*) fluorescenčním sondám. Měření podílu intenzit při dvou vlnových délkách přirozeně odstraňuje nedostatky intenzitních sond jako je nerovnoměrná

distribuce sondy v buňce nebo tkáni či fluorescenční pozadí. Cílem dalšího projektu bylo upravit design sondy Sulfox-1 tak, aby rozdíl v emisních maximech oxidované a redukované formy byl větší než zmíněných 25 nm. Toto by umožnilo využití sondy se standardnějšími fluorescenčními filtry, a tím by dále usnadnilo její použitelnost. Pro design nové sondy bylo využito předpokladu, že vliv redukce sulfoxidu na sulfid na BODIPY fluoroforu má aditivní charakter, jak bylo naznačeno v některých studiích.^[59] Proto by použití dvou místo jedné sulfoxidové funkční skupiny mohlo zvětšit rozdíl v emisních maximech substrátu a produktu redukce pomocí MsrA. Po intenzivní optimalizaci Suzukiho kaplingu byla připravena sonda nazvaná (*S,S*)-Sulfox-2. Jak je též patrné z názvu sondy, (*S,S*)-Sulfox-2 obsahuje dvě methylsulfoxidové funkční skupiny s absolutní konfigurací *S*. Přestože zavedení dvou feny(methyl)sulfoxidových jednotek na centrální BODIPY fluorofor činí tuto sondu stericky náročnější, jsou oba sulfoxidy plně redukovány při reakci s MsrA, jak bylo potvrzeno HPLC-MS analýzou. Tato redukce je spojena s bathochromním posunem emisního maxima výsledného bis-sulfidu o 40 nm oproti (*S,S*)-Sulfox-2, což potvrdilo naši hypotézu.^[65] Rozšířením konjugace došlo též k posunutí emisních maxim jak u (*S,S*)-Sulfox-2, tak u produktu redukce oproti Sulfoxu-1. Tento fakt činí novou sondu (*S,S*)-Sulfox-2 komplementární k (*S*)-Sulfox-1, a při fluorescenční mikroskopii tak mohou být obě sondy sledovány zároveň ve vícekanálovém uspořádání. Teoreticky použitím jedné sondy s opačnou chiralitou na sulfoxidu může být současně sledována aktivita jak MsrA tak MsrB.

Vyvinutím fluorescenčních sond Sulfox-1 a Sulfox-2 jsme dostali do rukou nástroj, první svého druhu, pro efektivní sledování aktivity enzymů Msr v reálném čase *in vivo*. Cílem přípravy těchto sond bylo poskytnout novou metodologii pro výzkum molekulárně-biologických souvislostí exprese a aktivity Msr. Jednou z nejasností v molekulární biologii Msr je fakt, že přestože methioninsulfoxid v proteinech vzniká v přibližně stejném množství v obou epimerních formách *S* a *R*, exprese, aktivita a buněčná lokalizace striktně stereospecifických MsrA a MsrB se výrazně liší v různých organizmech včetně člověka.^[29] Jako modelový příklad může sloužit fakt, že *E. coli* při stresových podmínkách růstu ve stacionární fázi nebo při nedostatku živin výrazně zvyšuje aktivitu MsrA, avšak zvýšená aktivita MsrB popsána nebyla. Aktivita MsrB je v *E. coli* regulována zcela jinými mechanismy. Zvýšená aktivita MsrA ve stresovaných *E. coli* je vysvětlována následovně. Při oxidačním stresu

v průběhu logaritmické fáze růstu dochází k oxidaci methioninů v proteinech, a tím jejich přirozené degradaci, avšak buňky mají dostatek stavebních bloků pro syntézu nových proteinů, které jejich funkci mohou nahradit. Avšak při oxidačním stresu ve stacionární fázi růstu (nebo při nedostatku živin) je syntéza nových proteinů obtížnější, a proto je v buňkách zvýšená aktivita ochranných mechanismů včetně zvýšené aktivity MsrA. MsrA tedy redukuje (S)-epimer methioninsulfoxidu v proteinech, nicméně otázkou zůstává, co se děje s opačným epimerem, který je též produkován. Bylo vzneseno několik možných hypotéz. Jednou možností je přítomnost jiného dosud neidentifikovaného enzymu, který je schopen redukovat (R)-epimer methioninsulfoxidu v proteinech. Další hypotéza, která byla vyslovena, je možná existence epimerázy, která by transformovala (R)-epimer na (S)-epimer, a tím umožnila úplnou redukci pouze pomocí MsrA. Takový enzym však doposud nebyl popsán. Poslední hypotézou je, že pro přežití *E. coli* buňky je dostatečná redukce pouze (S)-epimerů methioninsulfoxidu v proteinech. Pro vyřešení tohoto problému byly využity naše nové enantiomerní sondy (S)-Sulfox-1 a (R)-Sulfox-1. Inkubací obou sond s bakteriemi *E. coli* ve stacionární fázi růstu bylo učiněno zajímavé zjištění. Podle očekávání byla detegována zvýšená aktivita MsrA pomocí (S)-Sulfox-1. Avšak za daných podmínek docházelo i k redukci (R)-Sulfox-1. Navíc tato (R)-selektivní aktivita byla podstatně vyšší než aktivita MsrA detekovaná sondou (S)-Sulfox-1. Tento fakt spolu se sérií kompetitivních experimentů vyvrátil existenci předpokládané epimerázy. Při pokusu o izolaci této aktivity bylo zjištěno, že tato aktivita je lokalizována v membránové frakci, a jako externí reduktant vyžaduje NADH a nikoliv dithiothreitol (DTT), který je reduktantem pro MsrA. Jelikož MsrA i MsrB mají stejný mechanismus katalýzy, který využívá katalytický cystein, nulová aktivita v membránové frakci při použití DTT naznačila, že se jedná o enzym s odlišným mechanismem redukce. Sérií inhibičních, proteomických a reverzně genetických experimentů byla tato aktivita jednoznačně připsána enzymu dimethylsulfoxidreduktáze (DmsABC) (Obrázek 5).^[66] Tento enzym byl již v minulosti popsán,^[67] nicméně jeho role při redukci oxidačního stresu v buňkách *E. coli* a jeho stereoselektivita byla námi popsána vůbec poprvé. Na základě těchto experimentů lze říci, že tato nově objevená funkce DmsABC je důležitější pro životní cyklus *E. coli* než dříve popsaná a velmi specifická funkce umožňující využití dimethylsulfoxidu jako terminálního akceptoru elektronů při anaerobní respiraci. Tato nová funkce DmsABC při boji

E. coli proti oxidačnímu stresu ukazuje, že celkový obraz redoxních procesů a jejich regulace může být složitější, než se předpokládalo. Tento fakt může mít vliv na aplikaci antibakteriálních strategií, které se snaží využít zvýšení oxidačního stresu inhibicí antioxidačně působících enzymů.^[68] Objev funkce DmsABC při redukci oxidačního stresu poukazuje na značnou redundanci enzymů bojujících proti oxidačnímu stresu, které může být obtížné zacílit jednotnou strategií. Na základě těchto experimentů samozřejmě vyvstává otázka, jestli i v eukaryotických organizmech existují další reduktázy, které jsou schopné ovlivňovat rovnováhu methionin-methioninsulfoxid v proteinech. Dostupnost námi navržených fluorescenčních sond by mohla v budoucnu pomoci s odpovědí i na tuto otázku.



Obrázek 5. Schématické znázornění objevu nového enzymu v redoxní rovnováze methionin-methioninsulfoxid v bakteriích *E. coli*.

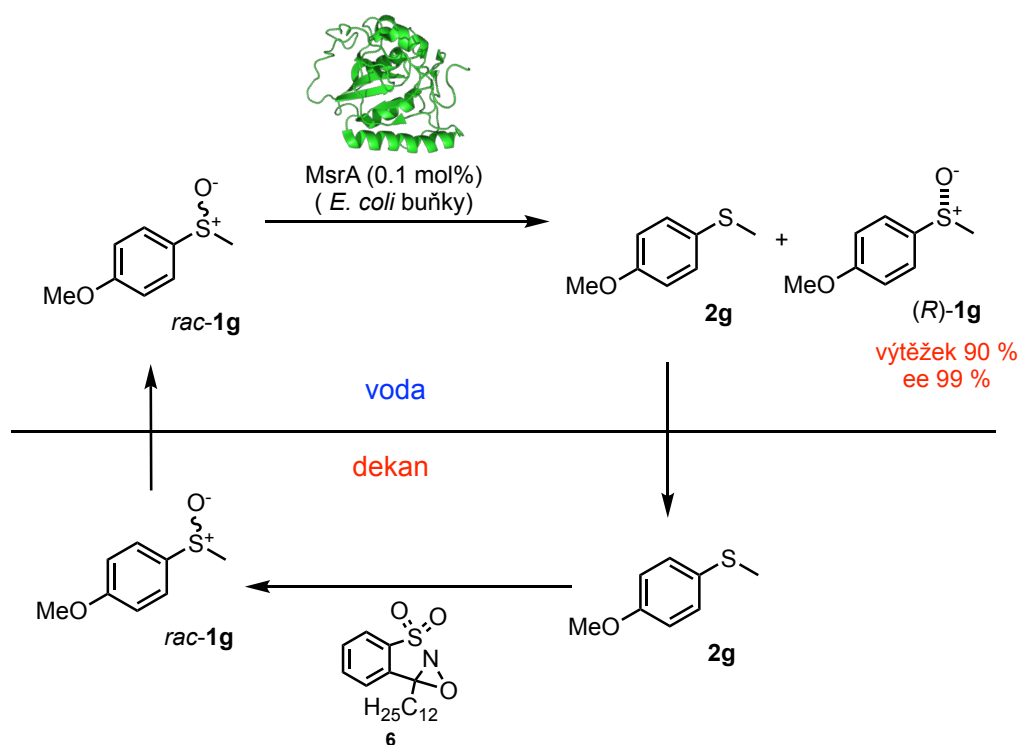
4.2. Vývoj enzymatických metod pro enantioselektivní syntézu chirálních sulfoxidů

Chirální sulfoxidy jsou důležité biologicky aktivní sloučeniny a řada z nich tvoří aktivní složku komerčních léčiv. Dále jsou to též populární chirální ligandy, katalyzátory a stavební bloky v asymetrické syntéze. Z těchto důvodů byla věnována značná pozornost vývoji metod pro jejich asymetrickou přípravu. Přestože existuje celá plejáda těchto metod, obecná asymetrická příprava sulfoxidů s vysokými enantiomerními nadbytky (ee >99 %) je stále netriviální úkol.

I proto se řada farmaceuticky významných chirálních sulfoxidů připravuje krystalizací diastereoizomerních solí intermediárních kyselin anebo dočišťováním produktů krystalizací po nedokonalé asymetrické syntéze. V naší laboratoři byla v rámci předešlých projektů rekombinantně připravena MsrA. Při použití výše zmíněných enantiomerních fluorescenčních sond se tento enzym ukázal jako velmi efektivní pro kinetické rozlišení s téměř absolutní enantioselektivitou. Proto byla MsrA testována jako vhodný enzymatický kandidát pro obecné kinetické rozlišení chirálních sulfoxidů. Skutečně se ukázalo, že MsrA má poměrně nízkou substrátovou specifitu a je schopná efektivního kinetického rozlišení celé řady chirálních sulfoxidů. Enantioselektivita enzymu vůči všem reaktivním substrátům je výjimečná i mezi ostatními enzymy. Klasickým příkladem enzymů široce využívaných pro kinetické rozlišení chirálních esterů jsou lipázy. Lipázy jsou vysoce selektivní vůči jednomu enantiomeru esteru, nicméně po konverzi preferovaného enantiomeru v racemické směsi mohou pomalu reagovat i s enantiomerem opačným. Experimenty s MsrA ukázaly, že při použití 0.1 mol % enzymu dochází u racemických sulfoxidů k 50 % konverzi během 1-4 hodin a dále již reakce neprobíhá, což bylo ověřeno v časovém intervalu dalších 24 hodin. Izolované sulfoxidy z těchto reakcí mají enantiomerní nadbytek vyšší než 99 %, což dokazuje extrémně vysokou enantioselektivitu MsrA. Tato metoda představuje první využití enzymu MsrA k efektivnímu kinetickému rozlišení chirálních sulfoxidů. Dalším významným rysem MsrA je poměrně nízká substrátová specifita, a tudíž ji lze využít pro efektivní kinetické rozlišení u široké škály substrátů.

Přes výše zmíněnou efektivitu kinetického rozlišení je často zmiňovaným nedostatkem pouze maximální možný výtěžek reakce 50 %. Také izolace čistých enzymů může činit obtíže při přípravě enantiomerně obohacených produktů v preparativním měřítku. Pro odstranění těchto nedostatků byla v naší laboratoři vyvinuta metoda deracemizace chirálních sulfoxidů, která poskytuje vysoce enantiomerně obohacené sulfoxidy ve výtěžku až více než 90 % bez nutnosti izolace enzymu MsrA.^[69] Tato metoda využívá bakterie *E. coli* s rekombinantně zvýšenou produkcí MsrA a lipofilní oxidant ve dvoufázovém systému vodný pufr-dekan (Obrázek 6). Racemický sulfoxid je ve vodném prostředí enantioselektivně redukován MsrA v bakteriích *E. coli* na sulfid. Takto vzniklý sulfid má značně lipofilní charakter a přechází do organické fáze (dekan), kde je zpět oxidován na racemický sulfoxid derivátem oxaziridinu. Racemický sulfoxid poté přechází do vodné fáze, a tím se uzavírá celý cyklus. Touto

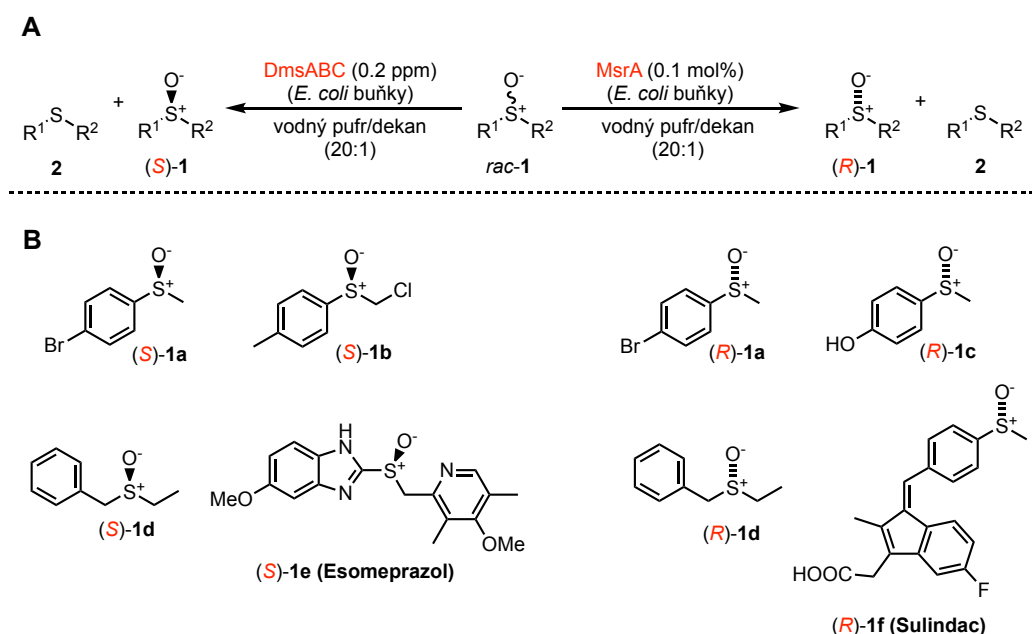
metodou může být deracemizována celá škála racemických sulfoxidů včetně farmaceuticky významného léčiva Sulindac.



Obrázek 6. Proces deracemizace chirálních sulfoxidů chemoenzymatickou cestou ve dvoufázovém uspořádání.

Jak již bylo uvedeno, v přírodě existuje též enzym MsrB, který je svou aktivitou enantiokomplementární k MsrA. To nás vedlo k hypotéze, že bude možné vyvinout enantiokomplementární metodu pro obecné kinetické rozlišení/deracemizaci chirálních sulfoxidů s opačnou absolutní konfigurací. Pro tento účel bylo rekombinantně připraveno několik MsrB z různých organismů s nejvyššími dokumentovanými aktivitami. Měřením aktivity pomocí sondy (*S*)-Sulfox-1 se jako nejaktivnější ukázala MsrB z houseničky rolního (*A. thaliana*).^[70] Kinetické rozlišení s modelovým substrátem **1a** vedlo ke konverzi 44 % až po 44 hodinách s použitím 1 mol % enzymu, což je desetkrát více než v reakcích s MsrA (0.1 mol %). Enantiomerní nadbytek získaného sulfoxidu činil 63 %, což dává hodnotu selektivity pouhých 17 (u MsrA je hodnota selektivity >200). Tyto experimenty ukázaly, že enzymy MsrB zřejmě nejsou vhodné pro vyvinutí ekvivalentního enantiokomplementárního kinetického rozlišení k MsrA, a to díky nízké aktivitě a enantioselektivitě. Nutno podotknout, že obecně nižší aktivita enzymů MsrB a jejich nižší enantioselektivita při vyšších katalytických

koncentracích byla pozorována již v dřívějších pracích.^[71] Nicméně zhruba ve stejné době byla v naší laboratoři objevena enantioselektivní reduktáza DmsABC, která se ukázala být enantiokomplementární k MsrA. Tohoto objevu bylo využito pro vyvinutí zamýšlené enantiokomplementární metody. Jelikož je DmsABC třídoménový membránový protein, není jeho izolace v aktivní formě zcela triviální. Proto byly vyvinuty podmínky využívající celých buněk *E. coli* bez nutnosti izolace proteinu. Další výhodou je, že není potřeba externího reduktantu, jelikož buněčná koncentrace NADH je dostačující k průběhu reakce. Touto metodou bylo možné provést kinetické rozlišení na široké škále substrátů a získat opticky čisté sulfoxidy s opačnou absolutní konfigurací, než je tomu v případě MsrA (Obrázek 7).^[72] Obecně je substrátová specifita DmsABC nižší než u MsrA, nicméně spektrum substrátů, které lze efektivně připravit ve vysoké optické čistotě, je u obou enzymů podobné. Zajímavým substrátem je sulfoxid **1b** s chloromethylovým substituentem, který lze též připravit v enantiomerně čisté formě. Tento substrát lze využít k další funkcionalizaci pomocí nukleofilní substituce nebo reakcí s organokovovými činidly, a tím podstatně rozšířit spektrum dostupných sulfoxidů v enantiomerně čisté formě. Touto enzymatickou metodou bylo též možné připravit vysoce enantiomerně obohacené léčivo Esomeprazol, které je v posledních letech jedno z nejprodávanějších na světě.



Obrázek 7. A. Znázornění enantiokomplementárních metod pro kinetické rozlišení sulfoxidů. B. Příklady produktů získaných těmito metodami.

5. Závěr

Cílem této práce je přesvědčit čtenáře o tom, že výzkum na pomezí chemických a biologických oborů skrývá potenciál, který může výrazně obohatit obě odvětví. Na jedné straně je možné využitím metod organické chemie vytvořit nové chemicko-biologické nástroje pro sledování biologických procesů, které jsou jinými metodami nepostižitelné, a tím umožnit hlubší vhled do těchto dějů. Na straně druhé lze využít některých robustních biologických nástrojů (enzymů) k přípravě pokročilých chemických sloučenin a farmaceuticky významných látek, které je obtížné získat pomocí standardních chemických metod.

V první části této práce je dokumentován vývoj nových chirálních fluorescenčních sond, ve kterých je chiralita klíčová pro jejich funkci. Přípravou fluorescenčních sond s reaktivním chirálním sulfoxidem v obou enantiomerních formách bylo umožněno poprvé sledovat aktivitu důležitých enzymů methioninsulfoxidreduktáz *in vivo* v reálném čase. Použitím těchto sond byla objevena zcela nová funkce enzymu DmsABC pro udržování redoxní homeostázy v bakteriích *E. coli*, což může mít vliv na antibakteriální strategie využívající oxidačního stresu a otevírá další otázky v odvětví redoxních regulací funkcí proteinů.

V části druhé je popsán vývoj nových metod pro (chemo)enzymatickou přípravu vysoce enantiomerně obohacených sulfoxidů. Pro tento účel bylo využito jak známých, tak i námi nově objevených enzymatických aktivit enzymů MsrA a DmsABC. Tyto dva enzymy se vyznačují svojí enantiokomplementaritou, což umožnilo přípravu celé řady enantiomerně čistých sulfoxidů v obou enantiomerních formách. Z farmaceuticky významných sulfoxidů byly připraveny například vysoce enantiomerně obohacený Esomeprazol nebo Sulindac. V širším kontextu lze říci, že přírodní zdroje stále skrývají nové nečekané enzymatické aktivity, které mohou být užitečné, jak ukazuje i náš příklad.

6. Seznam literatury

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry, 4th Edition*, Wiley, Hoboken, NJ, **2010**.
- [2] L. A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 85–100.
- [3] E. J. Ariëns, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *26*, 663–668.
- [4] J. McConathy, M. J. Owens, *Prim. Care Companion CNS Disord.* **2003**, *5*, 70–73.
- [5] G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler, *Arzneimittelforschung* **1979**, *29*, 1640–1642.
- [6] D. S. Seigler, *Plant Secondary Metabolism*, Springer US, **1998**.
- [7] A. Drazic, J. Winter, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 1367–1382.
- [8] L. Tarrago, Z. Péterfi, B. C. Lee, T. Michel, V. N. Gladyshev, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 332–338.
- [9] N. Brot, L. Weissbach, J. Werth, H. Weissbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1981**, *78*, 2155–2158.
- [10] R. Grimaud, B. Ezraty, J. K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P. J. Derrick, F. Barras, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48915–48920.
- [11] A. D. Luca, F. Sanna, M. Sallèse, C. Ruggiero, M. Grossi, P. Sacchetta, C. Rossi, V. D. Laurenzi, C. D. Ilio, B. Favalaro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, *107*, 18628–18633.
- [12] D. Roos, C. C. Winterbourn, *Science* **2002**, *296*, 669–671.
- [13] J. M. Albrich, C. A. McCarthy, J. K. Hurst, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1981**, *78*, 210–214.
- [14] M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 93–109.
- [15] W. A. Prütz, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *332*, 110–120.
- [16] P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424.
- [17] M. J. Gray, W.-Y. Wholey, U. Jakob, *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 141–160.
- [18] I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757–772.
- [19] A. V. Peskin, C. C. Winterbourn, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 572–579.
- [20] D. I. Pattison, M. J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1453–1464.
- [21] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513–886.
- [22] H. Antelmann, J. D. Hellmann, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 1049–1063.
- [23] H. Rosen, S. J. Klebanoff, Y. Wang, N. Brot, J. W. Heinecke, X. Fu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 18686–18691.
- [24] R. K. Bartlett, R. J. Bieber Urbauer, A. Anbanandam, H. S. Smallwood, J. L. Urbauer, T. C. Squier, *Biochemistry* **2003**, *42*, 3231–3238.
- [25] J. Snijder, R. J. Rose, R. Raijmakers, A. J. R. Heck, *J. Struct. Biol.* **2011**, *174*, 187–195.
- [26] A. Kanayama, J.-I. Inoue, Y. Sugita-Konishi, M. Shimizu, Y. Miyamoto, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24049–24056.
- [27] R. G. Midwinter, F.-C. Cheah, J. Moskovitz, M. C. Vissers, C. C. Winterbourn, *Biochem. J.* **2006**, *396*, 71–78.
- [28] P. Caldwell, D. C. Luk, H. Weissbach, N. Brot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 5349–5352.

- [29] A. Drazic, H. Miura, J. Peschek, Y. Le, N. C. Bach, T. Kriehuber, J. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 9493–9498.
- [30] J. R. Erickson, M. A. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C. V. Oddis, R. K. Bartlett, J. S. Lowe, S. E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, et al., *Cell* **2008**, *133*, 462–474.
- [31] J. Moskovitz, J. M. Poston, B. S. Berlett, N. J. Nosworthy, R. Szczepanowski, E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14167–14172.
- [32] H. Weissbach, L. Resnick, N. Brot, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 203–212.
- [33] W. L. Lee, B. Gold, C. Darby, N. Brot, X. Jiang, L. P. S. D. Carvalho, D. Wellner, G. S. John, W. R. J. Jr, C. Nathan, *Mol. Microbiol.* **2009**, *71*, 583–593.
- [34] A. Kaya, A. Koc, B. C. Lee, D. E. Fomenko, M. Rederstorff, A. Krol, A. Lescure, V. N. Gladyshev, *Biochemistry* **2010**, *49*, 8618–8625.
- [35] J. Moskovitz, S. Bar-Noy, W. M. Williams, J. Requena, B. S. Berlett, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 12920–12925.
- [36] A. B. Salmon, V. I. Pérez, A. Bokov, A. Jernigan, G. Kim, H. Zhao, R. L. Levine, A. Richardson, *FASEB J.* **2009**, *23*, 3601–3608.
- [37] F. Cabreiro, C. R. Picot, M. Perichon, B. Friguet, I. Petropoulos, *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *11*, 215–226.
- [38] J. Moskovitz, E. Flescher, B. S. Berlett, J. Azare, J. M. Poston, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 14071–14075.
- [39] H. M. Romero, B. S. Berlett, P. J. Jensen, E. J. Pell, M. Tien, *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 3784–3794.
- [40] H. Ruan, X. D. Tang, M.-L. Chen, M. A. Joiner, G. Sun, N. Brot, H. Weissbach, S. H. Heinemann, L. Iverson, C.-F. Wu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 2748–2753.
- [41] V. A. Shchedrina, G. Vorbrüggen, B. C. Lee, H.-Y. Kim, H. Kabil, L. G. Harshman, V. N. Gladyshev, *Mech. Ageing Dev.* **2009**, *130*, 429–443.
- [42] S. P. Gabbita, M. Y. Aksenov, M. A. Lovell, W. R. Markesbery, *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 1660–1666.
- [43] F. Liu, J. Hindupur, J. L. Nguyen, K. J. Ruf, J. Zhu, J. L. Schieler, C. C. Bonham, K. V. Wood, V. J. Davisson, J.-C. Rochet, *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 242–255.
- [44] R. Bentley, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 609–624.
- [45] T. Wieland, C. Goetzendoerfer, J. Dabrowski, W. N. Lipscomb, G. Shoham, *Biochemistry* **1983**, *22*, 1264–1271.
- [46] E. H. Flynn, *Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology*, Academic Press, **2013**.
- [47] S. Thitiphuree, N. J. Talley, *Int. J. Clin. Pract.* **2000**, *54*, 537–541.
- [48] M. Darwish, M. Kirby, E. T. Hellriegel, P. Robertson, *Clin. Drug Investig.* **2009**, *29*, 613–623.
- [49] H. C. Rawden, G. O. Kokwaro, S. A. Ward, G. Edwards, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *49*, 313–322.
- [50] F. Lang, D. Li, J. Chen, J. Chen, L. Li, L. Cun, J. Zhu, J. Deng, J. Liao, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 843–846.
- [51] T. Toru, C. Bolm, *Organosulfur Chemistry in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [52] K. K. Andersen, William. Gaffield, N. E. Papanikolaou, J. W. Foley, R. I. Perkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**,

- 86, 5637–5646.
- [53] F. Rebiere, O. Samuel, L. Ricard, H. B. Kagan, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5991–5999.
- [54] J. Fujisaki, K. Matsumoto, K. Matsumoto, T. Katsuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 56–61.
- [55] S. Liao, I. Čorić, Q. Wang, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10765–10768.
- [56] T. Matsui, Y. Dekishima, M. Ueda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7699–7706.
- [57] N. Brot, J. Werth, D. Koster, H. Weissbach, *Anal. Biochem.* **1982**, *122*, 291–294.
- [58] D. Brunell, H. Weissbach, P. Hodder, N. Brot, *ASSAY Drug Dev. Techn.* **2010**, *8*, 615–620.
- [59] A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, F. Bergström, L. B.-Å. Johansson, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7813–7819.
- [60] V. Leen, T. Leemans, N. Boens, W. Dehaen, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 4386–4396.
- [61] N. Makukhin, V. Tretyachenko, J. Moskovitz, J. Míšek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12727–12730.
- [62] L. Zhang, S. Peng, J. Sun, J. Yao, J. Kang, Y. Hu, J. Fang, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2966–2972.
- [63] L. Zhang, S. Peng, J. Sun, R. Liu, S. Liu, J. Fang, *Chem. Comm.* **2019**, *55*, 1502–1505.
- [64] J. Moskovitz, M. A. Rahman, J. Strassman, S. O. Yancey, S. R. Kushner, N. Brot, H. Weissbach, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 502–507.
- [65] N. Makukhin, V. Nosek, J. Míšek, *Synthesis* **2018**, *50*, 772–777.
- [66] N. Makukhin, V. Havelka, E. Poláčková, P. Rampírová, V. Tarallo, K. Strisovsky, J. Míšek, *FEBS J.* **2019**, *286*, 4024–4035.
- [67] P. T. Bilous, J. H. Weiner, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 1511–1518.
- [68] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, J. J. Collins, *Cell* **2007**, *130*, 797–810.
- [69] V. Nosek, J. Míšek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9849–9852.
- [70] C. V. D. Santos, E. Laugier, L. Tarrago, V. Massot, E. Issakidis-Bourguet, N. Rouhier, P. Rey, *FEBS Let.* **2007**, *581*, 4371–4376.
- [71] L. Tarrago, V. N. Gladyshev, *Biochemistry Mosc.* **2012**, *77*, 1097–1107.
- [72] V. Nosek, J. Míšek, *Chem. Comm.* **2019**, *55*, 10480–10483.

7. Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem svým současným a minulým spolupracovníkům, bez nichž by tato práce jistě nemohla vzniknout. Také bych chtěl poděkovat všem svým mentorům, kteří mě na mojí životní cestě ovlivnili nejen po stránce vědecko-pedagogické, ale i osobní. Zvláštní poděkování patří mojí manželce Barboře a celé rodině za podporu, zázemí a lásku.

8. Přílohy

1. Makukhin, N.; Tretyachenko, V.; Moskovitz, J.; Míšek, J., Ratiometric Fluorescent Probe for Imaging of Methionine Sulfoxide Reductase A Activity in Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55* (41), 12727.
2. Makukhin, N.; Nosek, V.; Míšek, J., Development of a Ratiometric Fluorescent Probe with Two Reactive Sulfoxides for Monitoring the Activity of Methionine Sulfoxide Reductase A. *Synthesis*, **2017**, *50* (4), 772. (published as part of the Bürgenstock Special Section 2017 - Future Stars in Organic Chemistry)
3. Makukhin, N.; Havelka, V.; Polachova, E.; Rampirova, P.; Tarallo, V.; Strisovsky, K.; Míšek, J., Resolving Oxidative Damage to Methionine by an Unexpected Membrane-associated Stereoselective Reductase Discovered Using Chiral Fluorescent Probes. *FEBS J.*, **2019**, *286*, 4024.
4. Nosek, V.; Míšek, J., Chemoenzymatic Deracemization of Chiral Sulfoxides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57* (31), 9849.
5. Nosek, V.; Míšek, J., Enzymatic Kinetic Resolution of Chiral Sulfoxides – An Enantiocomplementary Approach. *Chem. Comm.*, **2019**, *55*, 10480.