

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**HLEDÁNÍ A TESTOVÁNÍ NOVÝCH INHIBITORŮ
VYBRANÉHO MYKOBAKTERIÁLNÍHO ENZYMU**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Bc. Jitka Komrsková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím, aby byla má práce půjčována ke studijním účelům a citována dle platných norem.

V Hradci Králové dne

Bc. Jitka Komrsková

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Evě Novotné, Ph.D., za odborné vedení této práce, za vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala, dále za připomínky a cenné rady během práce v laboratoři i mimo ní.

Dále děkuji všem pracovníkům Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy za milé pracovní prostředí, ochotu a pomoc.

Poděkování patří také mé rodině, přátelům a spolužákům za podporu a povzbuzení.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Jitka Komrsková
Školitel: Mgr. Eva Novotná, Ph.D.
Název diplomové práce: Hledání a testování nových inhibitorů mykobakteriálního enzymu

Mycobacterium tuberculosis zůstává i nadále jedním ze smrtících patogenů, které jsou hrozbou pro celý svět. Efektivní léčba sice existuje v podobě kombinace antituberkulotik, nicméně je velmi zdoluhavá a ne vždy úspěšná, neboť se velkým problémem posledních let stávají i multirezistentní formy tuberkulózy a také koinfekce virem HIV. Proto se stává v současnosti téměř nutností nalézt nové antituberkulotikum, které bude účinné proti rezistentním kmenům mykobakterií a zároveň také při léčbě HIV. Za potenciální terč mykobakterií se považuje enzym isocitrátlyasa, který hraje klíčovou roli v glyoxylátovém cyklu, kde katalyzuje přeměnu isocitrátu na sukcinát a glyoxylát. Tento enzym mykobakterie vyžadují zejména pro přežití během akutní fáze infekce.

Cílem této práce je stanovit, zda *S*-benzylisothiosemikarbazony a flavonoidy inhibují aktivitu enzymu isocitrátlyasy a mohou se tak stát potenciálními novými antituberkulotiky.

V naší studii byla spektrofotometricky stanovena aktivita tohoto enzymu na základě množství vzniklého glyoxylátu po proběhlé enzymatické reakci v jamkách mikrotitrační destičky.

Výsledky těchto pokusů ukázaly nízkou inhibiční vlastnost flavonoidů, ze kterých nejvíce snižoval aktivitu isocitrátlyasy (-)-epigallokatechin gallát a kvercetin hydrát. Ze skupiny *S*-benzylisothiosemikarbazonů měly největší schopnost inhibice 5-bromsalicylaldehyd-*S*-4-fluorbenzylisothiosemikarbazon, benzaldehyd-*S*-4-brombenzylisothiosemikarbazon, salicylaldehyd-*S*-4-chlorbenzylisothiosemikarbazon a salicylaldehyd-*S*-4-brombenzylisothiosemikarbazon.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Jitka Komrsková
Supervisor: Mgr. Eva Novotná, Ph.D.
Title of Diploma Thesis: Identification of new potent inhibitors of selected mycobacterial enzyme

Mycobacterium tuberculosis remains one of the deadly pathogens, which are threat for people around the world. The combination of antituberculous drugs is effective but the treatment is prolonged and sometimes it is not successful because of multiresistant forms of tuberculosis and also co-infection with HIV, that are the problems in last a few years. Therefore, it is necessity to find a new drug against tuberculosis, which will be effective against resistant forms of mycobacterium and can be used for HIV therapy. Enzyme isocitratelase performs a potentially drug target against *Mycobacterium tuberculosis*. This enzyme plays a key role of glyoxylate pathway, where catalyzes the conversion of isocitrate to succinate and glyoxylate. This enzyme is necessary for mycobacterial survive during acute phase of the infection.

The aim of this work is to determine that the activity of isocitratelase is inhibited by *S*-benzylisothiosemicarbazones and flavonoids and so they could be new potentially antituberculous drugs.

Activity of this enzyme was determined by spectrophotometric method in our research and discovered on the basis of glyoxylate's quantity in well plates.

Results of our study have shown low inhibition property of flavonoids - the most inhibit isocitratelase (-)-epigallocatechine gallate and quercetin hydrate. These compounds of the group of *S*-benzylisothiosemicarbazones have had the most ability to inhibit isocitratelase: 5-bromosalicylaldehyde-*S*-4-fluorbenzylisothiosemicarbazone, benzaldehyde-*S*-4-brombenzylisothiosemicarbazone, salicylaldehyde-*S*-4-chlorbenzylisothiosemicarbazone and salicylaldehyde-*S*-4-brombenzylisothiosemicarbazone.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
POUŽITÉ ZKRATKY	8
1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Tuberkulóza	12
2.1.1 Diagnostika TBC	13
2.2 Mykobakterie	14
2.2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.2.1.1 Druhové variace <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.2.2 Klíčové metabolické dráhy mykobakterií	18
2.3 Isocitrátlyása	20
2.3.1 Struktura isocitrátlyásy a ovlivnění její funkce dvojmocnými kationty ..	21
2.3.2 Známé inhibitory ICL	23
2.4 Antituberkulotika	24
2.4.1 Přírodní látky jako nová antituberkulotika	29
2.5 Flavonoidy	30
2.5.1 Flavonoly	31
2.5.2 Flavony	32
2.5.3 Flavanony	34
2.5.4 Anthokyanidiny	35
2.5.5 Isoflavony	36
2.5.6 Flavan-3-oly (katechiny)	36
2.5.7 Deriváty kyseliny hydroxyskořicové	37
2.5.8 Deriváty kyseliny benzoové	38
2.5.9 Dihydrochalkony	38
2.6 <i>S</i> -Benzylisothiosemikarbazony	39
2.7 Enzymová kinetika a inhibice enzymů	41
2.7.1 Enzymová kinetika	41
2.7.2 Inhibice enzymů	42

2.7.3 Měření enzymové kinetiky	44
2.7.4 Možnosti měření aktivity ICL	45
3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	46
4. PRAKTICKÁ ČÁST	47
4.1 Materiály a pomůcky	47
4.1.1 Chemikálie	47
4.1.2 Přístroje	48
4.1.3 Laboratorní pomůcky	49
4.1.4 Pufry, roztoky a jiný materiál	49
4.2 Metodika práce	52
4.2.1 Expresce isocitrátlyásy	52
4.2.2 Odštěpení His-Tagu	53
4.2.3 Gelová vertikální SDS elektroforéza	53
4.2.4 Převedení do fosfátového pufru	54
4.2.5 Měření koncentrace proteinu	54
4.2.6 Příprava reakčního pufru	55
4.2.7 Příprava inhibitorů a substrátu	55
4.2.8 Enzymová reakce	55
5. VÝSLEDKY	57
5.1 Expresce a izolace enzymu	57
5.2 Stanovení aktivity enzymu	60
5.2.1 Kyselina 3-nitropropionová jako inhibitor ICL	61
5.2.2 Stanovení inhibice flavonoidů a S-benzylisothiosemikarbazonů	63
6. DISKUZE	68
7. POUŽITÉ ZDROJE	70
SEZNAM OBRÁZKŮ	79
SEZNAM TABULEK	81

POUŽITÉ ZKRATKY

Acetyl-CoA	acetyl koenzym A
AMK	aminokyselina
AT	antituberkulotikum
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E	enzym
<i>E .coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGCG	epigallokatechin gallát
f.e	for electrophoresis, pro elektroforézu
GABA	kyselina- γ -aminomáselná
HCl	kyselina chlorovodíková
His-Tag	polyhistidinový konec
I	inhibitor
ICL	isocitrátlyasa
INH	izoniazid
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KB	kochův bacil
LB	Luria Bertani médium
LDH	laktátdehydrogenáza
LDL	low density lipoprotein
MCL	2-methylisocitrátlyasa
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NP	kyselina 3-nitropropionová
P	produkt
p.a	per analysis, pro analýzu
PAGE	polyakrylamidová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce

PFGE	pulzní gelová elektroforéza
PPAR	receptory aktivované peroxizomovými proliferátory
RFLP	analýza délky restrikčních fragmentů
Rpm	rotations per minute, otáčky za minutu
RTBC	registr tuberkulózy
S	substrát
SDS	dodecyl síran sodný
TBC	tuberkulóza
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
V	volt
VNTR	variabilní počet tandemových repetice

1. ÚVOD

Rozvoj nových antituberkulotik se stává velmi aktuálním tématem současné vědy, neboť se stále rozšiřuje spektrum multirezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis* komplex, které jsou původcem infekčního onemocnění – tuberkulózy (TBC). Příčin vzniku rezistentních forem TBC může být mnoho, nejvýznamnějšími z nich jsou především chybně vedená léčba a migrace obyvatelstva. Samotná rezistence mykobakterií pak vzniká genetickou mutací, selekcí a následným pomnožením rezistentních mutant (Bártů, 2007).

Stav pacientů s TBC je aktivně sledován a o jejich onemocnění se podává kontrolní hlášení. Tato dispenzarizace se týká nejen osoby nemocné, ale také osob vyskytující se v její blízkosti. Případy onemocnění TBC jsou hlášeny v ČR do Registru tuberkulózy (RTBC), který spadá pod Informační systém orgánů ochrany veřejného zdraví (Bártů, 2008). Podle RTBC bylo v roce 2011 hlášeno 609 případů onemocnění, tj. 5,8 případu / 100 tisíc obyvatel. Celkem 112 případů se týkalo cizinců v ČR, z toho nejvíce pocházelo z Ukrajiny. V tomto roce na tuberkulózu zemřelo 28 lidí. Výskyt TBC v ČR za poslední roky má poměrně příznivý vývoj, kdy se počet onemocnění dlouhodobě snižuje. Oproti roku 2010 počet případů klesl o 10 %. Z hlediska věku se nejvíce nemocných nacházelo ve věkové kategorii nad 75 let, z hlediska regionu bylo nejvíce nemocných nahlášeno v kraji Hl. m. Praha. Nejméně nemocných se vyskytovalo v kraji Jihočeském (ÚZIS, 2012).

Naopak v Evropě se za posledních deset let zvýšila incidence výskytu z 360 tisíc případů za rok na 380 tisíc případů za rok, přitom od roku 1990 do roku 2005 se incidence zvýšila z 360 tisíc případů za rok na 560 tisíc případů ročně. Od roku 2006 poté došlo k úbytku nových případů za rok. Až dvojnásobný přírůstek nových případů tuberkulózy za posledních deset let je hlášen v Africe, podobnou situaci hlásí i severovýchodní Asie, kde došlo ke zvýšení počtu nových případů za rok z 2,9 milionů na 3,5 milionů. Velký nárůst incidence byl odhalen také v oblasti východního Středomoří. V oblastech západního Pacifiku a Ameriky se situace naopak zlepšuje (WHO, 2012).

Z této statistiky uveřejněné WHO vyplývá, že nárůst výskytu tuberkulózy je především v zemích s nedostatečnými hygienickými podmínkami a lékařskou péčí a má velkou souvislost s onemocněním AIDS, kdy pacienti HIV pozitivní jsou mnohem vnímavější vůči TBC než populace zdravá. Z celosvětového počtu 12 milionů pacientů s TBC v roce 2011 byla prokázána HIV pozitivita u 1,1 milionů nemocných (WHO, 2012).

Jak z výše uvedených vyplývá, tuberkulóza se stává poměrně rozšířeným infekčním onemocněním, a proto není divu, že žádné jiné onemocnění nevyvolalo ve světovém měřítku

tak velkou pozornost ve zdravotnictví a sociální politice. V posledních desetiletích se v široké veřejnosti často setkáváme s falešným názorem o minimálním výskytu tuberkulózy, vzhledem ke snižující se incidenci v ČR (Netval et al., 2004).

Úkolem této práce bylo nalézt sloučeniny, které by mohly sloužit jako potenciální antituberkulotika. Cílem této práce bylo nalézt nové inhibitory mykobakteriálního enzymu – isocitrátlyasy, enzymu, který se podílí na perzistentní fázi onemocnění. Na základě zadání diplomové práce je nejprve stručně popsána tuberkulóza a její původce. Na tuto kapitolu navazuje význam enzymu isocitrátlyasy a metody měření aktivity tohoto enzymu. Na závěr jsou uvedeny výsledky praktické části a diskuze.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza je onemocnění staré stejně jako lidstvo samo. Typické nálezy na kostech lidí pochází již z mladší doby kamenné a původním názvem tohoto onemocnění byly souchotiny. Až po zavedení léčby se začal používat dnešní název tuberkulóza, pocházející z latinského slova *tuberculum*, které v překladu znamená hrbolek či nádorek (Krawiecová, 2007). Tuberkulóza dnes rozumíme infekční onemocnění, které vyvolávají kmeny komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Zdrojem nákazy bývá nemocný člověk, v menší míře i domácí či hospodářská zvířata. Přenos onemocnění se uskutečňuje nejčastěji cestou inhalační, tedy formou kapénkovou při osobním kontaktu s nemocným nebo vdechováním mykobakterií přítomných ve vzduchu bez nakaženého jedince. Druhou cestou přenosu mohou být ojedinělé případy tuberkulózy vyskytující se např. u veterinárních pracovníků při přímém kontaktu. Nejčastější branou vstupu infekce jsou u člověka tedy z 85 % plíce (Netval et al., 2004).

Mycobacterium tuberculosis se označuje také jako Kochův bacil (KB) podle svého objevitele v roce 1882. Není charakterizován tvorbou toxinů, které bychom mohli považovat za faktory patogenity, ale schopností přežít uvnitř makrofágů neimunního jedince. Imunitní odpověď na KB odpovídá typu buněčné přecitlivělosti a výsledná obranná reakce se projevuje destrukcí tkáně. Forma tuberkulózy může být buď primární, nebo postprimární (Votava, 2003).

U primární tuberkulózy infekce začíná obvykle v plicích po inhalaci mykobakterií a jejich následným pohlcením alveolárními makrofágy. Mykobakterie se mohou v makrofázích množit, protože brání zrání fagosomů a jejich následnému spojení s lysozomy. Přežívající mykobakterie jsou makrofágy dopraveny do hilových uzlin a vzniká tak primární komplex. Dále se mykobakterie dostávají do krve a dalších orgánů. Do 10 dnů se začnou tvořit klony T-lymfocytů, které jsou specifické pro mykobakteriální antigen. Uvolňují lymfokiny, které způsobí shlukování makrofágů do tzv. granulomů kolem ložiska infekce. Makrofágy, které jsou tímto aktivovány, se vzhledem k podobnosti s epitelovými buňkami nazývají jako epiteloidní buňky, které mohou splývat a vytvářet tak mnohojaderné buňky neboli Langhansovy buňky. Pokud je granulom větší, může jeho střed obsahovat směs nekrotické tkáně a nabývat sýrovitého vzhledu. Tento jev potom označujeme jako kaseifikace. Aktivované makrofágy zabraňují replikaci mykobakterií, přitom ale bohužel ničí i okolní tkáně. Aby se redukoval počet infikovaných fagocytů, působí na místo léze cytotoxické T-

lymfocyty, jejichž receptory rozeznají napadený makrofág a zničí jej díky enzymu zvaného granulolyzin. Šíření nemoci se zastaví při převaze aktivovaných makrofágů nad neaktivovanými v jádře zánětu. K omezení primární infekce obvykle postačí tvorba granulomu, kdy přilehlé fibroblasty vytvoří později kalcifikující jizvu. Zhruba po 7 týdnech od začátku infekce se vyvine tzv. tuberkulinová reakce, která se projeví přecitlivělostí na tuberkulin, jakožto známka prodělané latentní tuberkulózní infekce. Mykobakterie bohužel v malém množství v organismu přežívají a po reaktivaci mohou způsobit postprimární onemocnění (Votava, 2003, Netval et al., 2004).

Postprimární tuberkulóza se vyvíjí po měsících až letech, kdy dochází buď k aktivaci dosud klidného ložiska, nebo k exogenní reinfekci. Reaktivace může být důsledkem jiného onemocnění, snížené imunity nebo vzniká spontánně. Nejčastější příčiny reaktivace jsou stáří, abusus alkoholu a drog a při infekci HIV. Téměř vždy k ní dochází jen v plicních lalocích a rozsev mykobakterií do uzlin a jiných orgánů bývá vzácný. Opět se tvoří granulom, ale nekróza je na rozdíl od primární tuberkulózy velmi intenzivní a oblast kaseifikace tak rozsáhlá, že hovoříme o tzv. tuberkulomu, který uvnitř proteolytické enzymy makrofágů zkapalňuje, poté se zvětšuje tento kapalný obsah a může se vyprázdnit do bronchů. Tím vznikne dutina, ve které se dobře množí mykobakterie vzhledem k vysokému obsahu oxidu uhličitého. Z této dutiny se mykobakterie uvolňují do sputa a šíří se dále do ostatních částí plic, laryngu, ale i do střev. Destrukce tkání vede k hemoptýze, neboli vykašlávání krve, dále se uvolňují faktory nekrózy a vyvolávají tak typické příznaky tuberkulózy – hubnutí, horečka (Greenwood et al. 1999, Votava, 2003, Netval et al., 2004).

2.1.1 Diagnostika TBC

Celková diagnostika tuberkulózy spočívá v postupech přímého průkazu, tedy v mikroskopii a kultivaci a dnes již také v molekulárně biologických metodách. Základním vzorkem k průkazu plicní TBC je sputum, které se zasílá 3 dny po sobě. Z jiných vyšetření se využívá bronchoalveolární laváž či žaludeční šťáva. U mimoplicních forem se vyšetřuje moč, hnis či likvor (Pokorný et al., 1998).

Pro rychlou a jednoduchou metodou pro potvrzení TBC nebo kontroly účinnosti léčby se používá mikroskopie. Preparát se barví dle Ziehl-Neelsena tak, že se obarví karbolfuchsinem a po opláchnutí ho přelijeme několikrát zředěnou anorganickou kyselinou. Nakonec se preparát vloží do nádoby s kontrastním barvivem, aby bylo možné snáze identifikovat červené mykobakterie na zeleném pozadí. Nález acidorezistentních tyčinek se

hodnotí kvantitativně jejich počtem v zorných polích. Přítomnost těchto bakterií musí být vždy potvrzena kultivací (Votava, 2003).

Jelikož sputum i jiné vzorky obsahují mimo testované mykobakterie také mnoho jiných bakterií či hub a mohly by tak znehodnotit půdu, provádí se ještě před kultivací tzv. dekontaminační postupy vedoucí k jejich odstranění. Ke klasické kultivaci poté dochází buď na pevné vaječné půdě, nebo na Šulově tekuté půdě. Naočkované půdy se odečítají po třech, šesti a devíti týdnech, kdy hodnocení spočívá v makroskopickém vzhledu médií (Homolka a Votava, 2012).

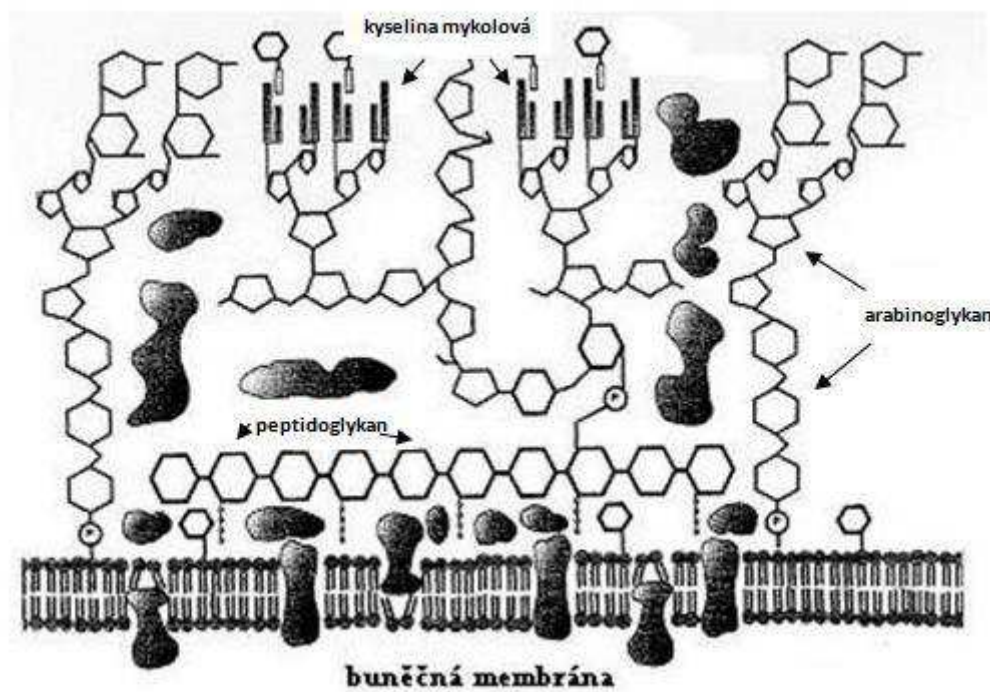
Mezi novější metody průkazu mykobakterií můžeme zařadit radiometrickou metodu BACTEC systém, která umožňuje detekci růstu mykobakterií v průběhu 2 týdnů. Princip spočívá v přeměně kyseliny palmitové za vzniku CO₂, jehož množství hodnotíme. Do popředí se dnes dostávají především metody molekulárně genetické a to zejména identifikace díky DNA sondám, kdy dochází k tvorbě stabilních hybridů mezi nukleovými kyselinami a dále polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňující amplifikaci specifického úseku DNA a následnou detekci vzorku. K ověření interpersonální transmise slouží analýza délky restričních fragmentů (RFLP), kdy v případě stejných kmenů jsou fragmenty DNA totožné (Netval et al., 2004, Čermák, 2007).

2.2 Mykobakterie

Tento rod zahrnuje skupinu bakterií s neobvyklými morfologickými, kultivačními, patogenními a terapeutickými vlastnostmi. Název rodu má vztah se zdánlivou podobností těchto bakterií s plísněmi, zejména ve smyslu pomalejšího růstu a vzhledu kolonie. Ve skutečnosti ale s plísněmi nemají nic společného a mezi příbuzné rody patří zejména rod *Corynebacterium* (Votava, 2003).

Co se týče morfologie, jsou mykobakterie nepohyblivé, nesporulující tyčinky štíhlého tvaru, bez pouzdra, které nelze barvit dle Grama. To je dáno vysokým podílem lipidů v mykobakteriální stěně, které obsahují dlouhé řetězce mykolových kyselin. Tyto bakterie se nazývají acidorezistentní a obarví se karbolfuchsinem nebo fluorescenčním barvivem auraminem za přítomnosti fenolu. Název acidorezistentní vychází z rezistence k odbarvení, a to ani směsí alkoholu s HCl. Buněčná stěna mykobakterií se vyznačuje podobností ke gram pozitivním mikrobům (Obr. 1). Rozdíl tvoří polysacharid arabinogalaktan a mykolové kyseliny, které jsou navázány na vrstvu peptidoglykanu. Vnější hydrofobní vrstva se skládá

z rozmanitých lipidů a polypeptidů, které jsou odpovědné za stimulaci buněčné imunity a jejichž extrakt je využíván ke zjišťování pozdní přecitlivělosti na mykobakteriální antigeny (Bednář et al., 1996).



Obrázek 1: Mykobakteriální buněčná stěna. Převzato z Menezes-de-Lima a Henriques, 1997.

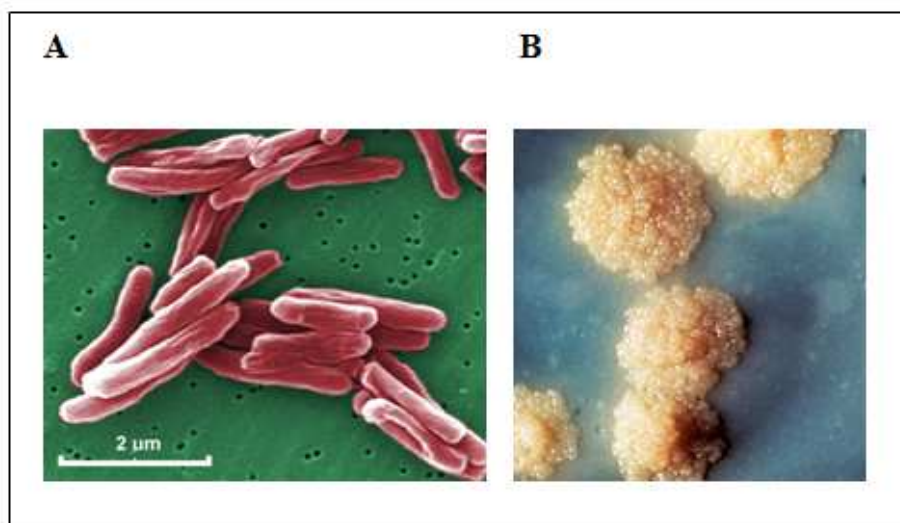
Mykobakterie jsou aerobní a charakterizovány dlouhou generační dobou. Kolonie vyrůstající na poměrně jednoduchých půdách mají žlutou pigmentaci a drsný povrch. Mykobakterie se vyznačují poměrně velkou odolností na zevní vlivy, zejména na vysychání a chemické látky a to díky vysokému obsahu volných a vázaných lipidů v buněčné stěně. Mykobakterie se dělí do dvou skupin, a to na mykobakterie pravé, které zahrnují *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* a *Mycobacterium microti*. Tyto mykobakterie jsou součástí již zmíněného tuberkulózního komplexu. Druhou skupinu tvoří mykobakterie netuberkulózní, které se dále dělí podle rychlosti růstu na pomalu rostoucí a rychle rostoucí. Nejvýznamnějšími potenciálními patogeny pomalu rostoucími jsou *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium avium*. Do skupiny rychle rostoucích mykobakterií spadají *Mycobacterium fortuitum* a *Mycobacterium chelonae* (Netval et al. 2004).

2.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mikrob *Mycobacterium tuberculosis* (MT) se taxonomicky řadí do rodu *Mycobacterium*, čeledi *Mycobacteriaceae*, řádu *Actinomycetales* a kmene *Actinobacteria*. Bakterií MT je nakažena až jedna třetina lidské populace, z čehož u deseti procent se objeví během života příznaky tuberkulózy. Morfologicky se jedná o velmi štíhlé a zcela acidorezistentní tyčinky o velikosti $0,3\text{--}0,6 \times 1\text{--}4 \mu\text{m}$, které mohou být lehce zahnuté (Obr. 2A). V preparátech z klinického materiálu se mohou vyskytovat samostatně, popřípadě ve formě shluků tyčinek. Pro virulentní kmeny jsou typické útvary hadovitého tvaru, které nazýváme *cording* podle glykolipidu zvaného cord faktor, spjatého s virulencí. Jiné toxiny, které bychom mohli považovat za faktory patogenity, MT netvoří (Votava, 2003).

V laboratorní diagnostice se nejvíce využívá kultivace na Löwenstein–Jensenově médiu (Obr. 2B), které se připraví z vajec, glycerolu, asparaginu a minerálních solí a nechá se ztuhnout. V půdě se vyskytuje také malachitová zeleň pro zabránění růstu kontaminujících bakterií a dále zejména kvůli barevnému kontrastu, který vznikne po nárůstu kolonií mykobakterie. Lidské mykobakterie se množí přímým dělením a narostou na této půdě zhruba za dva týdny, kde kolonie jsou šedivé a drobné. MT roste na tomto médiu do výšky, čímž se dá dobře odlišit od *Mycobacterium bovis*, pro které je typický plochý tvar kolonií. Dalším odlišením těchto dvou skupin mykobakterií je schopnost *Mycobacterium bovis* růst lépe při snížené tenzi kyslíku a tudíž několik milimetrů pod povrchem plotny. *Mycobacterium tuberculosis* řadíme mezi obligátně aerobní bakterie, které rostou proto na povrchu půdy a jejich teplotní optimum je 37 °C (Greenwood et al., 1999).

Všechny tuberkulózní bakterie přežívají v organických látkách nebo mléce tak dlouho, dokud se nevystaví ultrafialovému světlu, na které jsou velmi citlivé. Dále jsou citlivé na zahřátí, alkohol, formaldehyd a v malé míře i k chlorovým a fenolovým dezinfekčním činidlům (Greenwood et al., 1999).



Obrázek 2: *Mycobacterium tuberculosis*. **A.** *MT pod elektronovým mikroskopem*. **B.** *Kolonie Mycobacterium tuberculosis na Löwenstein–Jensenově půdě. Převzato z <http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/mycobacterium%20tuberculosis%20photos/MYTU20.html>, http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Mycobacterium_tuberculosis.html*

2.2.1.1 Druhové variace *Mycobacterium tuberculosis*

MT vykazuje genetickou variabilitu a liší se tak fenotypovým projevem u jednotlivých izolovaných druhů, které jsou typické vždy pro určitou geografickou oblast. Proto při rozšíření nákazy tuberkulózy se klade důraz na druhovou typizaci, která může potvrdit či vyvrátit přenos nemoci z člověka na člověka (Kamerbeek et al., 1997). Až do roku 2000 byly tyto druhové variace rozlišeny díky pulzní gelové elektroforéze (PFGE), nyní se typizace provádí pomocí metody variabilních počtů tandemových repetitivních sekvencí (VNTR), která umožňuje lepší rozlišení mezi druhy MT a využívá přítomnosti opakujících se sekvencí DNA v genomu MT (Parish a Brown, 2009).

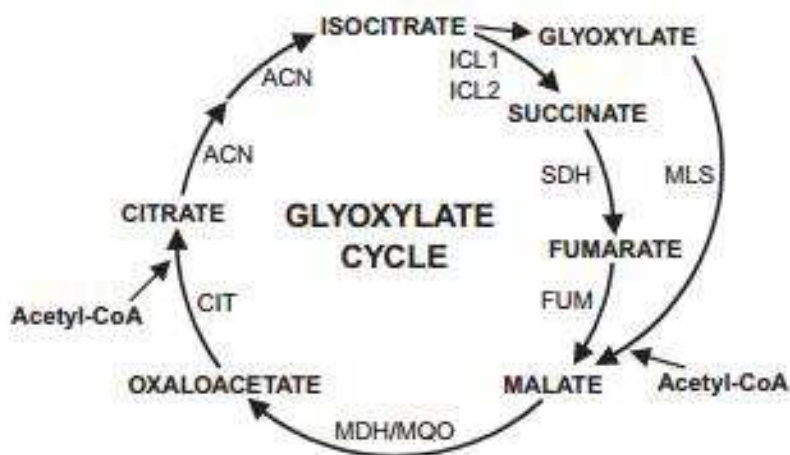
Nejčastější příčinou zvýšeného výskytu TBC jsou tzv. hypervirulentní druhy MT, které mohou způsobovat silný zánět, nebo ho mohou také potlačovat. Tyto druhy jsou charakterizovány delecí enzymů a regulátorů v buněčné stěně, jejichž úkolem je odpovídat na podněty z vnějšího prostředí. Dále bylo zjištěno, že tyto mutantní formy MT obsahují mechanismy, jimiž dokážou zamaskovat svou patogenitu včetně granulomu. Hypervirulence je charakterizována vysokou prevalencí v celosvětové populaci, kratším časovým úsekem od stanovení diagnózy k propuknutí aktivní nemoci či smrti a zvýšenou transmisí. Mezi nejlépe prostudované hypervirulentní druhy řadíme CD1551 a HN878. Hypervirulentní druh MT

CD1551 byl izolován u pacientů v roce 1990 na hranici Tennessee a Kentucky. Experimentální studie na myších později odhalila, že imunokompetentní myši nakažené druhem CD1551 přežívají o poznání déle než myši, které byli infikovány laboratorním druhem MT H37Rv, jehož genom byl publikován roku 1998. Dále byla zjištěna silnější imunitní reakce hostitele, která se projevila zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů. Druh HN878 byl hlavní příčinou epidemie v Texasu roku 1990. Na rozdíl od CD1551 zde imunokompetentní myši při experimentální studii zahynuli podstatně dříve než druh H37Rv a infekce byla spojena se sníženou indukcí prozánětlivých cytokinů. Z těchto poznatků je zřejmé, že oba hypervirulentní druhy vykazují při infekci zdánlivě opačné fenotypy. Klíčovým regulačním cytokinem při tvorbě granulomu je tumor nekrotizující faktor α (TNF α), který byl v případě nakažených myší deficitní. To poté vedlo k tvorbě abnormálního granulomu a rychlejší morbiditě (Parish a Brown, 2009).

2.2.2 Klíčové metabolické dráhy mykobakterií

U mykobakterií byly při podmínkách *in vitro* objeveny dvě různé metabolické cesty, které jsou mykobakteriemi využívány. Jedná se o Krebsův cyklus (citrátový cyklus), ke kterému dochází zejména ve fázi proliferace, a dále o cyklus glyoxylátový, který se uplatňuje v období klidovém, tj. při nedostatku kyslíku a mezi jeho nejvýznamnější členy spadá enzym isocitrátlyasa (ICL), podílející se na persistenci a virulenci *Mycobacterium tuberculosis* (Franěk, 2000).

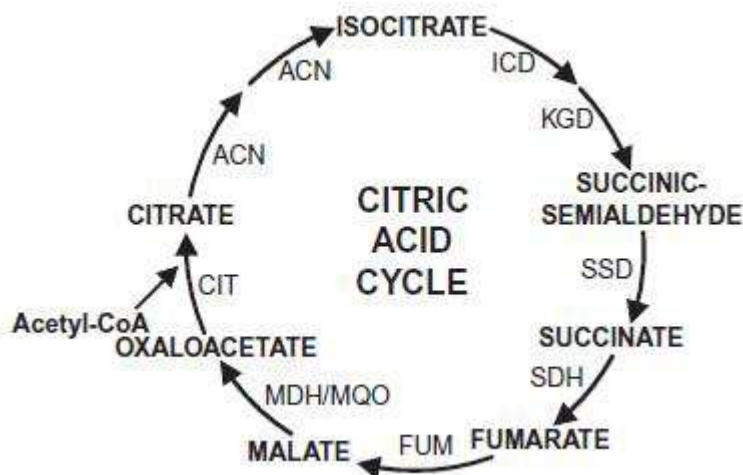
Glyoxylátový cyklus (Obr. 3) využívají mykobakterie pro přizpůsobení se prostředí makrofágů, kde mohou takto dlouho přežít, aniž by byly rozpoznány imunitním systémem hostitele (Mũnos-Elíaz et al., 2006). Jedná se o sled biochemických reakcí, při kterých dochází ke vzniku sukcinátu a glyoxylátu z acetyl-koenzymu A (acetyl-CoA). Oproti Krebsovu cyklu se zde vyskytují navíc dva enzymy - isocitrátlyasa a malátsyntasa. Hlavním zdrojem acetyl-CoA je zde β -oxidace mastných kyselin. ICL převádí isocitrát na glyoxylát a sukcinát a malátsyntasa následně kondenzuje glyoxylát a acetyl-CoA na malát. Hlavní podmínkou pro tento cyklus je zmíněná β -oxidace mastných kyselin jako zdroj acetyl-CoA a dále snížená tvorba pyruvátu glykolýzou (Gould et al., 2006).



Obrázek 3: Glyoxylátový cyklus u MT. ACN - akonitasa , CIT- citrát syntasa, MDH/MQO- malátdehydrogenasa / malátoxidoreduktasa, FUM-fumarasa, SDH-sukcinátdehydrogenasa, ICL 1- isocitrátlyasa (isoforma 1), ICL 2- isocitrátlyasa (isoforma 2), MLS- malátsyntasa. Převzato z Muñoz-Elías et al., 2006.

Citrátový cyklus (Obr. 4) zahrnuje řadu reakcí, které vytvářejí společnou metabolickou dráhu pro oxidaci sacharidů, lipidů a proteinů (Ledvina et al., 2009). Pro tento methylcitrátový cyklus jsou nejvýznamnější tři enzymy, a to methylcitrátsyntasa (MCS), methylcitrátdehydratasa (MCD) a 2-methyl-isocitrátlyasa (MCL, Muñoz-Elías et al., 2006). První reakce zahrnuje sloučení acetyl-CoA s oxalacetátem a následný vznik citrátu, který se přes sled dalších biochemických reakcí přeměňuje zpět na oxalacetát. Produkty Krebsova cyklu jsou 2 molekuly CO_2 , 1 molekula adenosintrifosfátu (ATP) a dále molekuly $\text{NADH} + \text{H}^+$ a FADH_2 , které se poté dále přeměňují v dýchacím řetězci (Wayne a Lin, 1982).

Citrátový cyklus je nezbytný pro metabolismus propionátu u *Mycobacterium tuberculosis* a pro množení této bakterie v makrofázích. Rozsáhlejší studie na myších dále prokázaly postradatelnost Krebsova cyklu u MT z hlediska virulence a persistence (Muñoz-Elías et al., 2006).



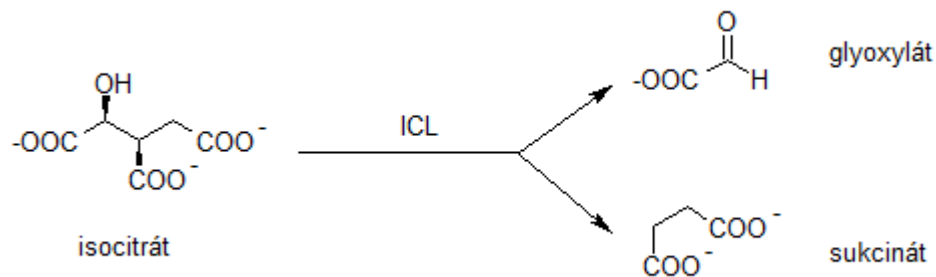
Obrázek 4: Cyklus kyseliny citronové u MT. ACN- akonitasa, CIT-citrátsyntasa, MDH/MQO-malátdehydrogenasa /malátoxidoreduktasa, FUM-fumarasa, SDH- sukcinátdehydrogenasa, SSD-sukcinát-semialdehyddehydrogenasa, KGD-2-ketoglutarátdekarboxylasa, ICD-isocitrátdehydrogenasa. Převzato z Muñoz-Elíaz et al., 2006.

2.3 Isocitrátlyasa

Isocitrátlyasa je bezpochyby nejdůležitější enzym glyoxylátového cyklu, který katalyzuje štěpení isocitrátu na glyoxylát a sukcinát, a tím se podílí na udržování vnitrobuněčné infekce MT v makrofázích (Muñoz-Elíaz et al., 2006). Kromě bakterií probíhá glyoxylátový cyklus také u rostlin a umožňuje tak jejich růst na acetátu stejně jako u MT. U rostlin však tento cyklus probíhá v glyoxysomech (Berg et al., 2002).

Podle Mezinárodní biochemické a molekulárně biologické unie se tento enzym řadí do 4. třídy – lyasy, konkrétně oxo-acid lyasy katalyzující štěpení vazby C-C a podle mezinárodních nomenklatur mu náleží katalogové číslo EC 4.1.3.1. Během katalýzy dochází k deprotonaci isocitrátu, odštěpení aldolu vzniku glyoxylátu a sukcinátu (Obr. 5) (Čegan a Korecká, 2010).

Genom MT obsahuje geny *icl1* a *icl2*, kódující enzymy ICL 1 a ICL 2, které jsou pro růst bakterií na acetátu jednotlivě postradatelné. Na základě pozorování u myší bylo zjištěno, že pro bakterie neobsahující enzym ICL 1, ale naopak disponující ICL 2, je charakteristická snížená persistence. Pokud u bakterie chybí oba enzymy, není potom schopna růstu na acetátu a bývá rychle eliminována z plic nakažených myší. Glyoxylátový cyklus se tedy jeví jako velmi důležitý pro růst bakterií a jejich přežití, zejména v souladu s myšlenkou, že MT během infekce přežívá díky růstu na esterech mastných kyselin (Muñoz-Elíaz et al., 2006).



Obrázek 5: Úkol isocitrátlyasy v glyoxylátovém cyklu.

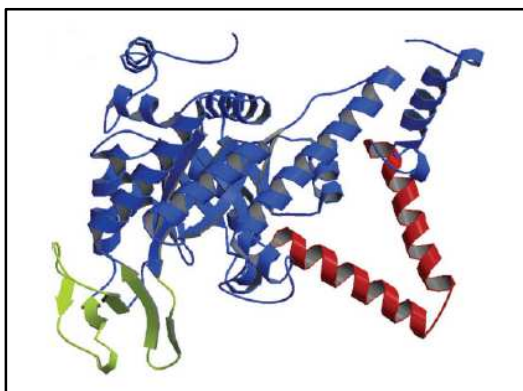
I přesto, že u ICL byla prokázána 20–25% identita v aminokyselinové sekvenci s druhou methylisocitrátlyasou (MCL), jedná se o dvě odlišné enzymové rodiny s minimální překrývající se funkcí. Toto tvrzení bylo dokázáno na základě faktu, že MCL nevykazuje ICL aktivitu, zatímco ICL je schopná alespoň minimální MCL aktivity. Dále byla zjištěna rozdílná substrátová specifita těchto enzymů, která se připisuje menším rozdílům v hydrofobní kapse aktivního místa enzymu. Aktivní místo ICL se na rozdíl od aktivního místa MCL dokáže přizpůsobit další methylové skupině 2-methylisocitrátu a tím dokáže katalyzovat reakci MCL. Další výzkum týkající se aktivity a specifity ICL a MCL byl prováděn i u jiných organismů než MT a přinesl tyto závěry: substrátem pro MCL může být pouze optický izomer (2*R*, 3*S*)-2-methylisocitrát, MCL izolovaná z *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Salmonella typhimurium* nevykazuje po přidání isocitrátu detekovatelnou aktivitu, naopak u ICL izolované z *Neurospora crassa*, *Pseudomonas indigofera*, *Chlorella vulgaris*, *A. nidulans* a *S. cerevisiae* byla zaznamenána slabá MCL aktivita, která ale není schopná zajistit jejich růst na propionátu. Takto byla u mykobakteriální ICL prokázána její jedinečná dvojí role v metabolismu mastných kyselin, které se účastní glyoxylátového i methylcitrátového cyklu. Popisována je tedy nejen její substrátová specifita pro isocitrát a methylisocitrát, ale také zejména schopnost růstu bakterií na acetátu (ICL aktivita) a propionátu (MCL aktivita) (Muños-Elías et al., 2006).

2.3.1 Struktura isocitrátlyasy a ovlivnění její funkce dvojmocnými kationty

Isocitrátlyása se skládá ze čtyř identických řetězců, jedná se tedy o homotetramerní strukturu. Hmotnost podjednotek ICL u bakterií a eukaryotických organismů se liší. Zatímco u bakterií dosahuje zhruba 47 kDa, u kvasinek, hub a rostlin se pohybuje v rozmezí 60 až 64 kDa. U *Mycobacterium tuberculosis* obsahuje každý řetězec 428 aminokyselin (AMK). Pro

všechny typy isocitrátlyasy je ovšem společná katalytická sekvence „KKCGH“ obsahující cystein vyskytující se ve flexibilní smyčce, ve které dochází k velkým konformačním změnám po navázání substrátu. Každý z monomerů se skládá z velké domény obsahující osm struktur α -helix a 8 β -skládaných listů, dále menší β -doménu, ve které se nachází aktivní místo enzymu. Spojení monomerů je možné díky další helixové struktuře (Obr. 6). Pro funkci rostlinné a bakteriální ICL je nutná přítomnost Mg^{2+} iontů jako kofaktoru. Vyšší koncentrace však může naopak způsobovat inhibici enzymu. Giachetti a Vanni (1991) jako první uvedli myšlenku, že komplex Mg^{2+} s isocitrátem je substrátem pro ICL, nikoliv samotný isocitrát. Tato teorie byla následně potvrzena dalšími studii, kdy v nepřítomnosti dvojmocných kationtů vykazoval enzym zanedbatelnou aktivitu (Kumar a Bhakuni, 2008).

Kumar a Bhakuni pozorovali vliv různých dvojmocných kationtů na strukturu, vlastnosti a funkci ICL. A to jak v jejich přítomnosti, tak i absenci těchto iontů. V nepřítomnosti dvojmocných iontů ICL nevykazovala žádnou aktivitu. Naopak 100% aktivita byla pozorována v přítomnosti Mg^{2+} , 45 % z této aktivity způsobily také Mn^{2+} kationty. Kationty Zn^{2+} a Cd^{2+} isocitrátlyasu neaktivovaly vůbec. Tento rozdílný efekt dvojmocných kationtů na stabilitu a funkci ICL je nejspíše způsoben tím, že se ionty vážou na jiná místa enzymu. Zatímco Zn^{2+} a Cd^{2+} reagují s malou β -doménou obsahující aktivní místo, ionty Mg^{2+} a Mn^{2+} se vážou do α/β jádra monomeru a způsobují tak destabilizaci domény (Kumar a Bhakuni, 2008).

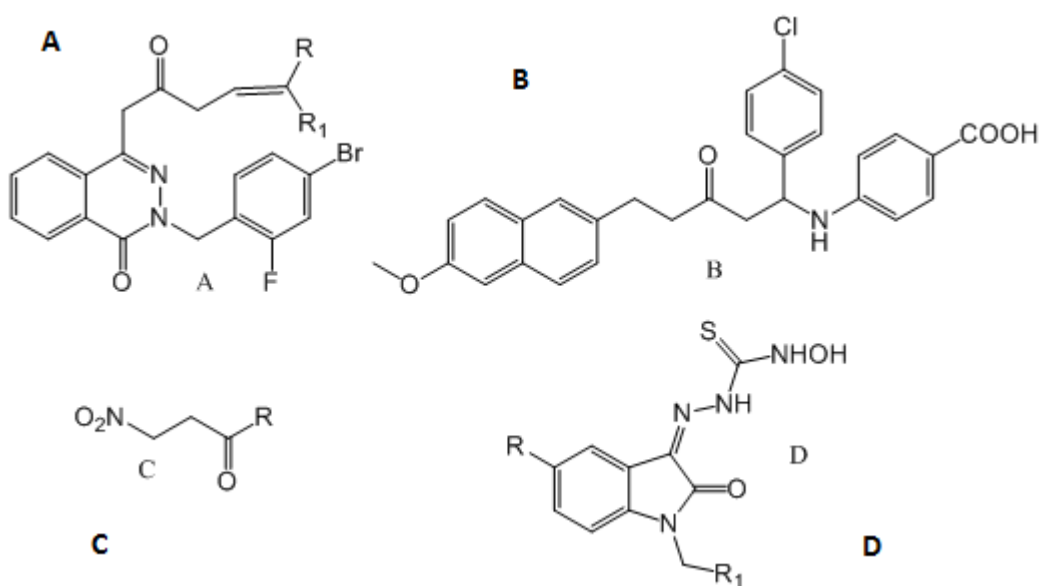


Obrázek 6: *Struktura monomeru mykobakteriální ICL. Modře jsou vyznačeny struktury α -helix a β -skládaný list, zeleně malá β -doména a červeně spojovací helix podjednotka. Převzato z Kumar a Bhakuni, 2008.*

2.3.2 Známé inhibitory ICL

Doposud jsou pokládány za inhibitory ICL tyto sloučeniny: 3-nitropropionát (nitro analog sukcinátu), 3-bromopyruvát, 3-fosfoglycerát, itakonát a mycenon (Kumar a Sanyal, 2013). Oxalát a malát také vykazují přibližně 50% inhibiční schopnost (Höner zu Bentrup et al., 1999). Po navázání inhibitoru do vazebného místa ICL dochází ke konformační změně, která zahrnuje přechod z tzv. otevřené konformace apo-enzymu na konformaci uzavřenou, při které se aktivní místo enzymu stává méně přístupné pro vazbu substrátu. O využití těchto sloučenin *in vivo* jako antituberkulotik však nelze uvažovat, neboť nejsou dostatečně specifické pro ICL a jsou považovány za toxické (Höner zu Bentrup et al., 1999, Sharma et al., 2000).

Mezi nově připravené inhibitory ICL s lepšími biologickými vlastnostmi patří například deriváty ftalazinu (Sriram et al., 2009), sloučenina Ydcm67 (Ji et al., 2011), 3-nitropropionamidy (Sriram et al., 2011), některé thiosemikarbazony odvozené od isatinu (Banerjee et al., 2011), ale také i extrakty izolované z rostlin (Bai et al., 2006) (Obr. 7).



Obrázek 7: Obecné struktury novějších inhibitorů isocitrátlyasy. **A.** Deriváty ftalazinu. **B.** Ydcm67. **C.** 3-Nitropropionamidy. **D.** Thiosemikarbazony odvozené od isatinu.

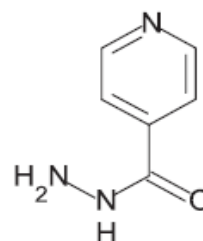
2.4 Antituberkulotika

Hlavním principem terapie TBC je podávání kombinace antituberkulotik (AT) po dobu 2-12 měsíců. Podle toho rozlišujeme režimy krátkodobé trvající celkem šest měsíců, zkrácené, kdy jsou AT podávána celkem osm měsíců a režimy dvanáctiměsíční. Výjimečně se může aplikovat léčba denní. Celková délka léčby závisí na velikosti postižení tuberkulózou a také jiných onemocnění u pacienta a na síle jeho imunitní odpovědi. Kombinace antituberkulotik je potřebná kvůli heterogenní populaci mykobakterií, zejména z hlediska primární rezistence mutant. AT se rozdělují dle účinnosti na látky 1. a 2. druhé linie (Netval et al. 2004, Horová 2007).

Antituberkulotika 1. linie můžeme dělit na dvě základní skupiny a to na hlavní baktericidní léky a na léky vedlejší. Skupina hlavních baktericidních léků zahrnuje isoniazid (INH) a rifampicin (RMP). Za vedlejší léky považujeme streptomycin (STM), pyrazinamid (PZA) a ethambutol (EMB), které se kombinují s hlavní skupinou za účelem prevence rezistencí (Shi et al., 2007).

Isoniazid (Obr. 8)

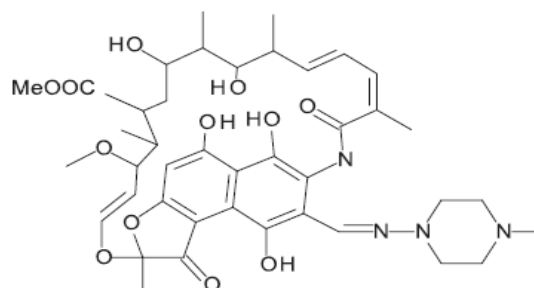
Isoniazid (INH) se používá nejčastěji v kombinaci s rifampicinem při léčbě atypických tuberkulóz. Jedná se o prolečivo, které se aktivuje mykobakteriální katalasou. INH způsobuje inhibici mykolových kyselin v buněčné stěně mykobakterií tak, že napadá enzym enoyl-ACP reduktasu. Mutací v genu *inhA* dochází ke vzniku rezistence na toto léčivo (Banerjee et al., 1994).



Obrázek 8:
Isoniazid.

Rifampicin (Obr. 9)

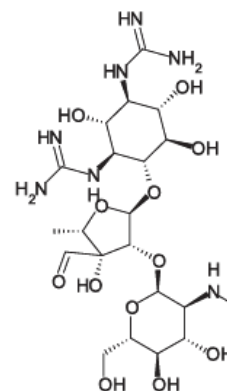
Antibiotikum rifampicin se vyznačuje širokým spektrem účinnosti. Jeho mechanismus účinku je založen na inhibici bakteriální RNA-polymerasy. Na rozdíl od isoniazidu působí i na klidová stádia nemoci, nikoliv pouze na množící se mykobakterie (Votava, 2003).



Obrázek 9:
Rifampicin.

Streptomycin (Obr. 10)

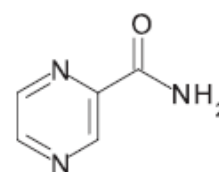
Streptomycin patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik, které se špatně vstřebává ze zažívacího traktu a je tak vhodné pouze k intramuskulárnímu podání. Cílovým místem je 30S podjednotka ribozomu (Shi et al., 2007).



Obrázek 10:
Streptomycin.

Pyrazinamid (Obr. 11)

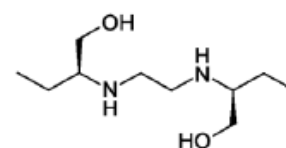
Pyrazinamid se naopak oproti streptomycinu resorbuje dobře z trávicího traktu a vykazuje vysokou účinnost vůči mykobakteriím v intracelulárním prostoru makrofágů. Vlastní antituberkulotickou aktivitu vykazuje až kyselina pyrazinkarboxylová, na kterou je pyrazinamid přeměněn pomocí enzymu amidasy. Jeho mechanismus účinku není ještě zcela objasněn, nicméně je zřejmé, že zasahuje do syntézy mastných kyselin tím, že inhibuje syntázu mastných kyselin (Da Silva a Palomino, 2011).



Obrázek 11:
Pyrazinamid.

Ethambutol (Obr. 12)

Ethambutol se resorbuje dobře perorálně a má bakteriostatický účinek pouze proti dělicím se intracelulárním i extracelulárním bakteriím. Předpokládaný mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin a nukleových kyselin (Votava, 2003).

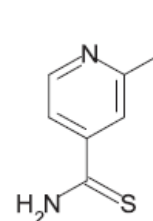


Obrázek 12: *Ethambutol.*

AT rezervní neboli látky 2. linie se používají tehdy, pokud výše uvedené léky 1. linie vykazují silné nežádoucí účinky nebo v případě rezistence na tato antituberkulotika. Do této skupiny se zařazují zejména ethionamid, cykloserin, kyselina *p*-aminosalicylová, amikacin, kapreomycin a fluorochinolony (Shi et al., 2007).

Ethionamid (Obr. 13)

Chemický název ethionamidu je thioamid 2-ethylisonikotinová kyselina, strukturou i účinkem se jedná o látku podobnou isoniazidu. Mechanismus účinku spočívá v baktericidním působení na biosyntézu mykolových kyselin, nezbytnou složku buněčné stěny bakterií. Ethionamid se vyskytuje jako proléčivo, na jehož aktivaci

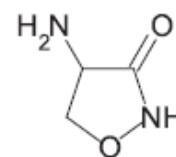


Obrázek 13:
Ethionamid.

se podílí monooxygenasa EthA. Při mutaci v genu *ethA* dochází k rezistenci na toto antituberkulotikum (Banerjee et al., 1994).

Cykloserin (Obr. 14)

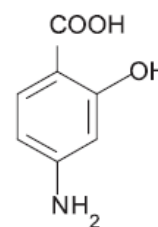
D-cykloserin se považuje za strukturální analog D-alaninu. Jedná se o kompetitivní inhibitor enzymů alanin racemasy a D-alaninligasy, které se podílejí na tvorbě příčných vazeb peptidoglykenů nutných pro stavbu buněčné stěny. Nevýhodou cykloserinu je jeho neurotoxicita, která je dána díky podobnosti s neuroexcitačními aminokyselinami (Chacon et al., 2002).



Obrázek 14:
D-cykloserin.

Kyselina para-aminosalicylová (Obr. 15)

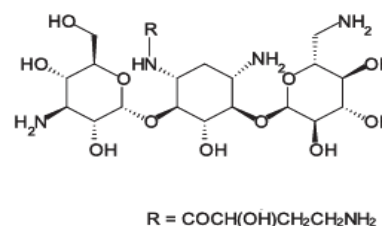
Tento izomer aminosalicilové kyseliny byl používán jako antituberkulotikum zejména v minulosti. Mechanismus účinku zůstává nejasný, předpokládají se dvě teorie. První z nich tvrdí, že tato kyselina inhibuje aktivitu thymidylát reductasy, čímž dochází k blokaci syntézy kyseliny listové (Hartl et al., 2009). Jiná hypotéza poukazuje na možnost ovlivnění syntézy mykobaktinu, růstového faktoru s chelátově vázaným železem, což následně vede k narušení příjmu železa do mykobakteriální buňky (Voss et al., 2000).



Obrázek 15: *Kyselina para-aminosalicylová.*

Amikacin (Obr. 16)

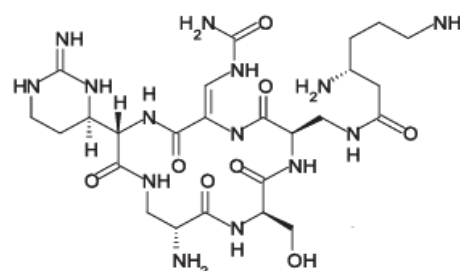
Amikacin se zařazuje mezi aminoglykosidová antibiotika, které způsobuje inhibici proteosyntézy tím, že se váže na malou podjednotku ribozomu. Stejný princip mechanismu účinku mají i antibiotika kanamycin a streptomycin (Janin, 2007).



Obrázek 16: *Amikacin.*

Kapreomycin (Obr. 17)

Kapreomycin je antibiotikum cyklické peptidové, které působí stejným způsobem jako amikacin – na 30S podjednotku ribozomu. Pokud je tato látka použita s léčivými, které ovlivňují stavbu



Obrázek 17: *Kapreomycin.*

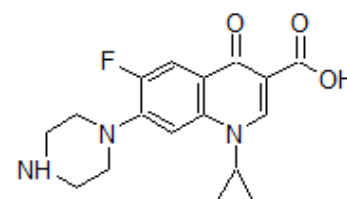
buněčné stěny, dochází ve většině případů k výraznému zvýšení její aktivity (Janin, 2007).

Fluorochinolony

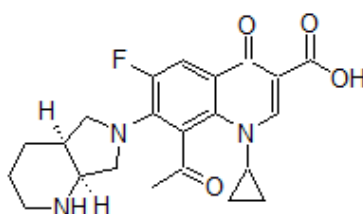
Fluorochinolony představují skupinu látek, které inhibují replikaci bakteriální DNA. Přesný mechanismus účinku spočívá v inhibici topoisomerasy II, která dokáže štěpit obě

vlákna molekuly DNA. U bakterií se jedná o tzv. DNA gyrázu. Tato skupina obsahuje větší množství látek, které jsou deriváty kyseliny nalidixové. Mezi významné zástupce patří

ciprofloxacin (Obr. 18), levofloxacin a ofloxacin, mezi novější látky pak moxifloxacin (Obr. 19), gatifloxacin a sitafloxacin. Pokud dojde k mutaci v genech *gyrA* či *gyrB* kodující DNA gyrázu, stává se bakterie rezistentní vůči této skupině léčiv (Hanulík et al., 2010).



Obrázek 18:
Ciprofloxacin.

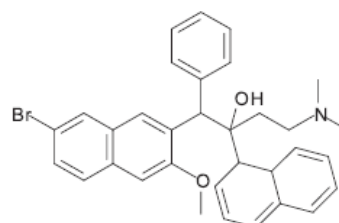


Obrázek 19: *Moxifloxacin.*

Mezi nové kandidáty na léčbu tuberkulózy jsou řazeny látky se skupiny diarylchinolinů, nitroimidazolů, oxazolidinonů a diaminů (Barry a Blanchard, 2010).

TMC207 (Obr. 20)

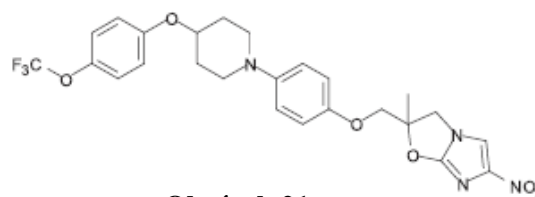
TMC207, v některých publikacích značená též jako R207910, je diarylchinolin, který představuje jednoho ze slibně vyhlížejících kandidátů na léčbu tuberkulózy. Tato látka působí jako inhibitor ATP synthasy, konkrétně její F_0F_1 podjednotky. Mutace vyskytující se v genu *atpE* jsou zodpovědné za rezistenci bakterií k této sloučenině (Barry a Blanchard, 2010).



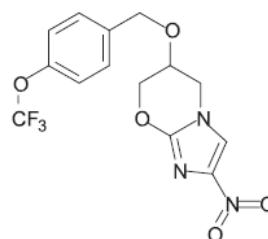
Obrázek 20:
TMC207.

PA-824 a OPC67683

PA-824 (Obr. 21) a OPC67683 (Obr. 22) jsou v současné době v klinické fázi studia jakožto látky s antimykobakteriální aktivitou. Spadají do skupiny nitroimidazolů, přesněji nitroimidazo-oxazin (PA-824) a nitroimidazo-oxazol (OPC67683). Cílovým místem těchto dvou nitroimidazolů je inhibice syntézy mykolových kyselin. Obě látky jsou ve formě proléčiva a stávají se aktivní až po redukci nitroskupiny za přítomnosti enzymu nitroreduktasy (Manjunatha et al., 2009, Barry a Blanchard, 2010).



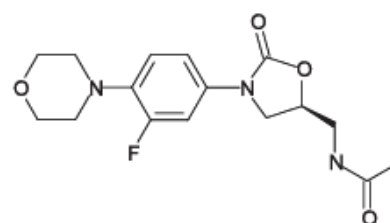
Obrázek 21:
OPC67683.



Obrázek 22:
PA-824.

Linezolid (Obr. 23)

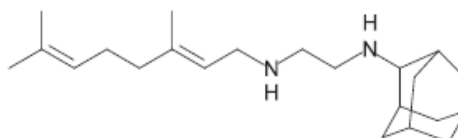
Linezolid náleží do skupiny oxazolidinonů. Linezolid byl v roce 2000 schválen pro užívání léčby infekcí zapříčiněných gram-pozitivními bakteriemi a nozokomiálních pneumonií. Váže se na podjednotku ribozomu 50S, zabraňuje vzniku formyl-Met-tRNA a dochází tak k inhibici syntézy proteinů (Barry a Blanchard, 2010, Da Silva a Palomino, 2011).



Obrázek 23:
Linezolid.

SQ109 (Obr. 24)

Další z nově připravovaných látek je SQ109-diamin, který je ve fázi klinického ověřování. Původně byl syntetizován jako efektivnější analog ethambutolu. Předpokládá se, že působí na úrovni buněčné stěny mykobakterií, nicméně přesný mechanismus účinku není dosud známý (Barry a Blanchard, 2010).



Obrázek 24: *SQ109.*

2.4.1 Přírodní látky jako nová antituberkulóza

Vzhledem k tomu, že rostliny představují velký potenciál chemických struktur a u řady těchto přírodních produktů byl prokázán účinek proti řadě nemocem, mohly by tyto přírodní látky představovat zdroj i pro nová antituberkulóza (Nguy et al., 2009).

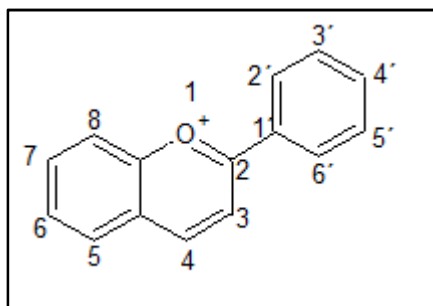
Mezi významné účinné látky obsažené v bylinách patří zejména silice, glykosidy, alkaloidy, saponiny a také flavonoidy, kterých bylo již identifikováno více než šest tisíc a jsou tak jednou z nejpočetnějších skupin přírodních látek (Kruzlicová et al., 2012). U flavonoidů byly již popsány účinky jak antimikrobiální (Cushnie a Lamb, 2006), antialergenní (Chen et al., 2010), protizánětlivé (Seo et al., 2000), tak i antitumorózní (Lee et al., 2008). Zhang a Rock (2004) prokázali inhibiční schopnost epigallokatechin gallátu na enzymy β -hydroxyacyl-ACP reduktasu a enoyl-ACP reduktasu přítomné v *E.coli*. Tři roky poté Vaquero et al. (2007) přišel s objevem, že zejména kvercetin patří k nejsilnějším inhibitorům bakterií. Dle Lechnera et al. (2008) nejvíce inhibovaly růst mykobakterií flavonoidy luteolin a opět kvercetin, slabší antimykobakteriální aktivitu vykazovaly rutin a (-) epikatechin. Příkladem rostlin obsahující kvercetin je například heřmánek lékařský, který dodává rostlině její antimikrobní a protizánětlivé účinky. Třezalka tečkovaná, jež je používána jako přírodní antidepresivum a jako antimikrobní látka, obsahuje vyšší množství rutinu a hyperonu, které jsou zodpovědné za tyto vlastnosti (Jahodář, 2006). Vysoký obsah flavonoidů (zejm. kvercetin) je obsažen také v přesličkové nati, která je využívána jako antisklerotikum, diuretikum a také při léčbě tuberkulózy (Jahodář, 2010, Radulović et al., 2006). Jako aktivní inhibitor *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium avium* byl popsán také 10-gingerol izolovaný z oddenku zázvoru (Hiserodt et al., 1998).

V literatuře je dále uvedeno větší množství extraktů z léčivých rostlin, které *in vitro* vykazují účinek i vůči rezistentním formám tuberkulózy (např. 7-methyljuglon izolovaný z kořene *Euclea natalensis*). Problémem ovšem zůstává zastoupení a množství účinných látek v extraktech, které se může výrazně lišit a je tedy nutná standardizace rostlinných extraktů (Mahapatra et al., 2007).

2.5 Flavonoidy

Flavonoidy byly objeveny v roce 1936 Albertem Szent-Györgyem, jedním z významných maďarských biochemiků, který byl oceněn Nobelovou cenou na fyziologii a medicínu. Jedná se o velmi rozšířenou skupinu přírodních látek, u nichž nejnovější výzkumy odkryly pozitivní účinky na různá onemocnění, zejména v souvislosti s jejich antioxidačními schopnostmi. Je známo fyziologické působení flavonoidů, zejména to, jak ovlivňují kardiovaskulární choroby, nádory nebo neurodegenerativní onemocnění. Kromě přímého antioxidačního účinku působí i nepřímo díky aktivaci či deaktivaci antioxidačních enzymů, které se podílejí na vzniku radikálů. Jedná se převážně o sekundární metabolity rostlin a i přesto, že se neúčastní primárních metabolických drah (např. fotosyntéza), hrají velmi důležitou roli v životě rostlin, např. při obraně před patogeny. Velmi účinným zdrojem flavonoidů je zejména červené víno, ovoce, zelenina, ale i čaje (Protivová, 2006).

Struktura těchto sloučenin odpovídá derivátům difenylpropanu, nebo látkám odvozeným od fenylochromanu. Typický je pro ně tzv. flavonový skelet (Obr. 25), skládající se z dvou substituovaných benzenových kruhů A a B, dále z pyranového kruhu, který je kondenzovaný s kruhem A. Flavonoidní sloučeniny dělíme na flavonoly, flavony, flavanony, anthokyanidiny, isoflavony, proanthokyanidiny, flavan-3-oly, dále se mohou často vyskytovat sloučeniny odvozené od kyseliny hydroxybenzoové nebo hydroxyskořicové. U různých autorů se ovšem klasifikace flavonoidů liší (Protivová, 2006, Volf a Andrs, 2012).



Obrázek 25: *Flavonový skelet.*

2.5.1 Flavonoly

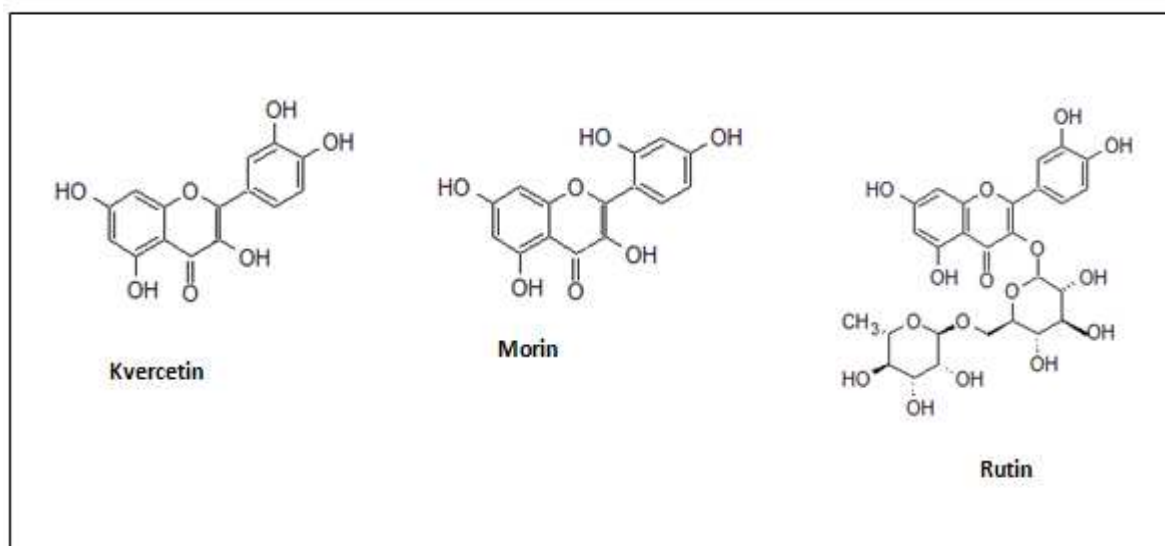
Tyto látky jsou v přírodě nejvíce rozšířené, často se vyskytují v cibuli, brokolici, kapustě, rajských jablíčkách, listech a slupkách. Nejvýznamnějším zástupcem flavonolů je kvercetin (Wang et al., 2009). Dalšími látkami z této skupiny, které jsme testovali jako inhibitory isocitrátlyasy, byly morin a rutin.

Kvercetin (Obr. 26) má protizánětlivé vlastnosti a působí ochranně před onemocněním srdce a rakovinou. Na základě dalších výzkumů se ukázalo, že kvercetin by mohl pomáhat v boji proti alergiím, zejména snižovat jejich příznaky, jako jsou slzení očí, rýma či kopřivka. V dalším pokusu spolu s resveratrolem a katechiny byl prokázán jejich projektivní účinek na srdce, zejména díky snižování lipoproteinu LDL a vysokého krevního tlaku. Příznivý účinek má též na mírnění příznaků při zánětu močového měchýře nebo prostaty. Menší studie ukázaly příznivý vliv u pacientů s revmatoidní artritidou. Co se týče rakoviny, zjistilo se, že kvercetin inhibuje růst nádorových buněk u rakoviny prsu, střeva, prostaty, ovarií a plic (University of Maryland Medical Center, 2013). Kvercetin se nachází v potravinách jak ve formě volné, tak i vázané na cukerné jednotky. V testech na Hokkaidské univerzitě byl identifikován jako inhibitor enzymu α -glukosidasy, který katalyzuje poslední krok přeměny sacharidů. Potlačení aktivity tohoto enzymu by se dalo využívat pro zamezení vstřebávání sacharidů ve střevě u obézních jedinců (Hrouda, 1998). Stejně jako rutin příznivě působí na metabolismus vitamínu C v organismu, kdy prodlužuje jeho působení díky zpomalování oxidace kyseliny askorbové (Stratil, 1993).

Glykosidem kvercetinu je další flavonol rutin (Obr. 26), pro který je charakteristická objemná molekula cukru vázaná k C3-hydroxylové skupině. Jedná se o rutinosu (β -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukosu). Díky molekule cukru ztrácí jádro B planární uspořádání a tím klesá i antioxidační schopnost rutinu. Rutin byl objeven v rostlině *Ruta graveolens*, ale opět se vyskytuje ve velkém množství rostlin, nejvíce je obsažen v pohance obecné, ovšem jeho obsah se liší podle části rostliny. Nejvíce rutinu se nachází v květech pohanky, nejméně naopak v kořenu. Kromě pohanky se vyskytuje rutin dále v rajčatech, v kůře citrusových plodů, jablkách, broskvích a výluzích zeleného a černého čaje. Stejně jako kvercetin se podílí na snižování LDL cholesterolu, léčbě diabetu a dále působí jako antikarcinogen (Stratil, 1993). Počítačová studie na univerzitách v Číně a v Koreji prokázaly schopnost rutinu inhibovat aktivitu enzymu tyrosinasy, všudypřítomného enzymu, jehož fyziologická funkce je spjata s produkcí pigmentu. Katalyzuje přeměnu tyrosinu na dopamin a je zodpovědný za pigmentaci kůže, hnědé zbarvení zeleniny, ale i hojení ran nebo tvorbu epidermis u hmyzu.

Při reakci dochází k interakci rutinu s histidinovými rezidui, které jsou obsaženy v aktivním místě enzymu. Jedná se o typickou kompetitivní inhibici, která vede k potlačení tvorby L-DOPA a mohla by tak najít využití v medicíně, kosmetice, jako bělící činidlo, nebo i v zemědělství jako bioinsekticid (Yue-Xiu et al., 2012).

Dalším bioflavonoidem obsaženým ve velkém množství rostlin, ovoci a zelenině je morin (Obr. 26). Jedná se o sloučeninu nažloutlé barvy a podobně jako kvercetin se podílí na procesech antioxidantace, antimutageneze, cytoprotekce a působí taktéž proti zánětu. Mezi buňky, které tento antioxidant chrání, patří zejména myelocyty, endotelové buňky, hepatocyty, erytrocyty. Studie na potkanech na King Saud University v Saúdské Arábii prokázala, že podání morinu po indukovaném infarktu myokardu kardiotoxickou látkou isoproterenolu působilo blahodárně a výrazně snižovalo rozsah poškození lysozomů (Al-Numair et al., 2012).



Obrázek 26: *Kvercetin, morin a rutin.*

2.5.2 Flavony

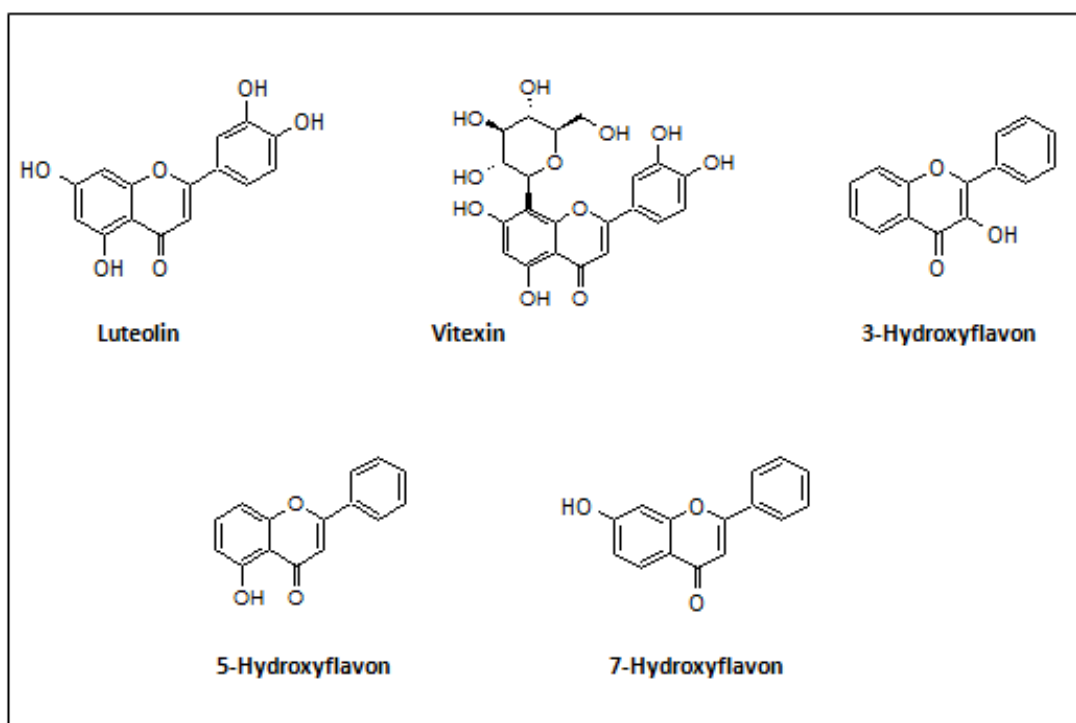
Na rozdíl od flavonolů není tato skupina látek oxidována na třetím uhlíku. Nachází se hojně v petrželi, pažitce, celeru, citrusových plodech. Významní zástupci jsou luteolin a vitexin, dále 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon a 7-hydroxyflavon (Vauzour et al., 2008).

Stejně jako kvercetin a rutin patří luteolin (Obr. 27) mezi nejvýznamnější inhibitory LDL oxidace zejména díky schopnosti chelatace iontů mědi (Volf a Andrs, 2012). Z 21 testovaných flavonoidů na univerzitě v Koreji, byl luteolin nejsilnějším inhibitorem enzymů

α -glukosidasy a α -amylasy, které se podílejí na štěpení glykosidických vazeb sacharidů. Inhibice těchto enzymů se využívá zejména při léčbě diabetu mellitu, kdy dochází ke zpomalení vstřebávání glukosy ze střeva a tedy ke snížení tzv. postprandiální glykémie, neboli zvýšení glukosy v krvi po jídle (Jong-Sang et al., 2000).

Flavonový glykosid vitexin (Obr. 27) se vyskytuje nejvíce v prosu a ve výzkumu na univerzitě v Mississippi se ukázalo, že účinně inhibuje enzym tyreoidální peroxidasu, která se účastní syntézy hormonů štítné žlázy tak, že mění jodid na jód, který se dále podílí na jodaci thyreoglobulinu, ze kterého proteolýzou vznikají hormony T3 a T4 (Gaitan et al., 1995). Dále byl také zjištěn neuroprotektivní účinek vitexinu. Díky jeho schopnosti vázat se jako ligand na GABA (kyselina gama-aminomáselná) receptor typu A a zesilovat tak působení GABA neurotransmiteru, dochází k antikonvulzivnímu účinku v mozku, tedy prevenci křečového záchvatu v mozku - epilepsii (Abbasi et al., 2012).

Hydroxyflavony jsou převážně syntetické sloučeniny, které se v rostlinách příliš nevyskytují. Jejich význam je spjat zejména s vazodilatačním účinkem, zejména u 7-hydroxyflavonů a 5-hydroxyflavonů (Obr. 27) (Calderone et al., 2004).



Obrázek 27: *Strukturní vzorce vybraných flavonů.*

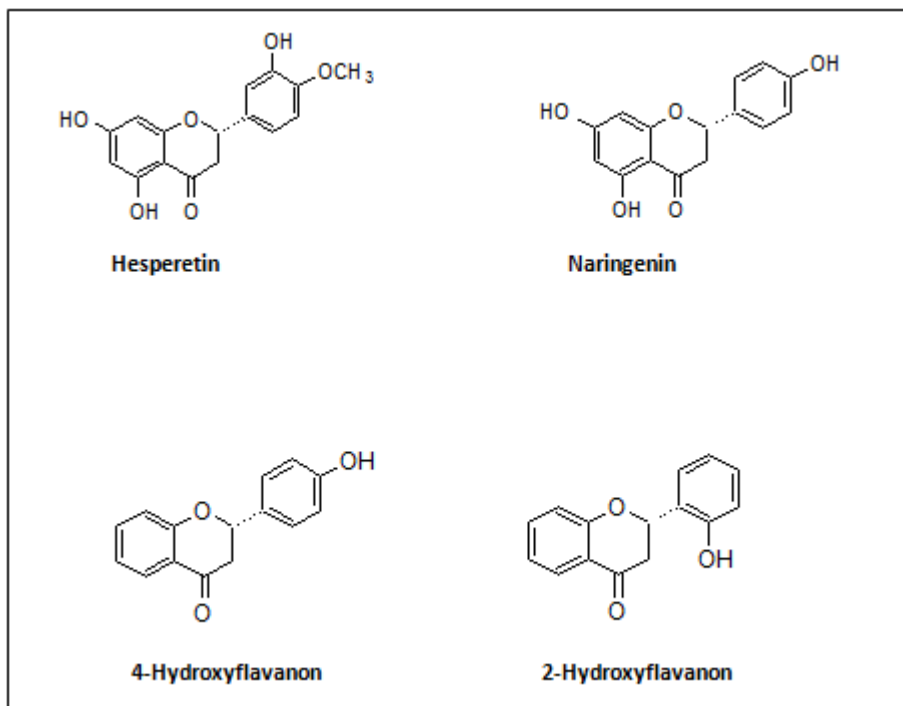
2.5.3 Flavanony

Od flavonů se liší svou neplanární strukturou s chirálním centrem na C2. Bývají přítomné v citrusových plodech, zejména v jejich kůře (Kroyer, 1986). Hlavními zástupci jsou hesperetin, naringenin, 4-hydroxyflavanon a 2-hydroxyflavanon.

Hesperetin (Obr. 28) je zajímavá bioktivní sloučenina, která vzniká odštěpením cukru ramnosy enzymem hesperidinasou z hesperidinu. Využití nachází zejména v tradiční čínské medicíně díky svým antioxidačním a protialergickým schopnostem. Experimentální studie v Číně se zaměřila na antialergenní vlastnosti hesperetinu u pacientů trpících na astma a výsledky poukázaly na to, že tato látka účinně inhibuje maturaci a funkci dendritických buněk, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi, což vede k tomu, že by hesperetin mohl být vhodným potenciálním kandidátem na léčbu alergií a zánětu (Gu et al., 2009). Hesperetin dále zlepšuje permeabilitu krevních kapilár, je dobře vstřebáván a uvažuje se, že by spolu s kvercetinem mohly vykazovat anti-sklerotickou aktivitu (Volf a Andrs, 2012).

U hesperetinu a naringeninu (Obr. 28) byl testován jejich vliv na expresi adiponektinu, proteinu produkovaného tukovou tkání, který hraje důležitou roli v metabolismu glukosy a lipidů. Exprese adiponektinu je řízena cirkadiálními rytmy a do jeho nejvýznamnějších funkcí spadá ochrana před aterogenními změnami. Oba flavanony ve studii indukovaly receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPAR). Aktivace těchto receptorů poté přispívá k urychlení katabolismu LDL částic a zabraňuje tak procesu aterosklerózy (Liu et al., 2008, Yahia et al., 2008). U naringeninu byl navíc prokázán inhibiční efekt na expresi Toll-like receptorů 2, což snižuje riziko obezity a s obezitou spjatých onemocnění (Yoshida et al., 2013).

2-Hydroxyflavanon a 4-hydroxyflavanon (Obr. 28) představují protirakovinné sloučeniny, které se vyskytují především v pomerančích a citronech. U 2-hydroxyflavanonu byla prokázána indukce apoptosy u nádorových buněk u rakoviny střeva a inhibice proliferace nádorových buněk renálního karcinomu (Nagaprashantha et al., 2011, Shin et al., 2012).

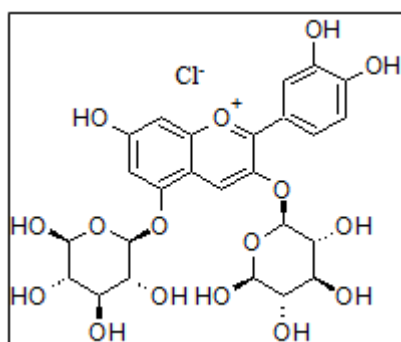


Obrázek 28: *Strukturní vzorce vybraných flavanonů.*

2.5.4 Anthokyanidiny

Anthokyanidiny jsou rostlinná barviva a nesou tak zodpovědnost za barvu květů a plodů rostlin. Nejčastěji se vyskytují v jahodách, malinách a ostružinách (Volf a Andrs, 2012).

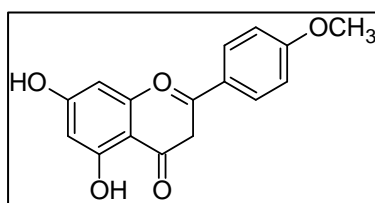
Tato skupina flavonoidů působí jako blokátor renin-angiotensinové signální dráhy, jejíž nadměrná aktivita je jedním z rizikových faktorů na rozvoji hypertenze. Na univerzitě Mahidol v Bankoku byla demonstrována tato studie a zjistilo se, že cyanin (Obr. 29) a delphinidin inhibují aktivitu angiotensin konvertujícího enzymu, což vede k poklesu tvorby angiotensinu II a hromadění bradykininu a následně k anti-hypertenznímu účinku. Přesný mechanismus tohoto účinku avšak není ještě zcela známý (Parichatikanond et al., 2012).



Obrázek 29: *Strukturní vzorec cyanin chloridu.*

2.5.5 Isoflavony

Skupina isoflavonů je jednou z nejvíce prostudované skupiny flavonoidů. Bylo nalezeno kolem 1000 různých isoflavonů, ovšem pouze čtyři z nich vykazují biologickou estrogenní aktivitu – biochanin A (Obr. 30), formononetin, genistein a daidzein. Vyskytují se v sóji, luštěninách a zejména v listech červeného jetele. Jejich účinek spočívá především v antiestrogenní aktivitě na základě kompetitivní inhibice, dále snižují riziko hormonálně dependentních nádorů. U biochaninu A byl navíc zjištěn ochranný účinek na cévy a kardiovaskulární systém, *in vitro* se také podílí na inhibici faktorů pro růst karcinomu prsu a prostaty. Tento jedinečný antikancerogenní účinek biochaninu A je připisován jeho schopnosti inhibovat enzymy aromatasu a 5- α -reduktasu, které se podílejí na procesu vzniku pohlavních hormonů (Burdová, 2013).

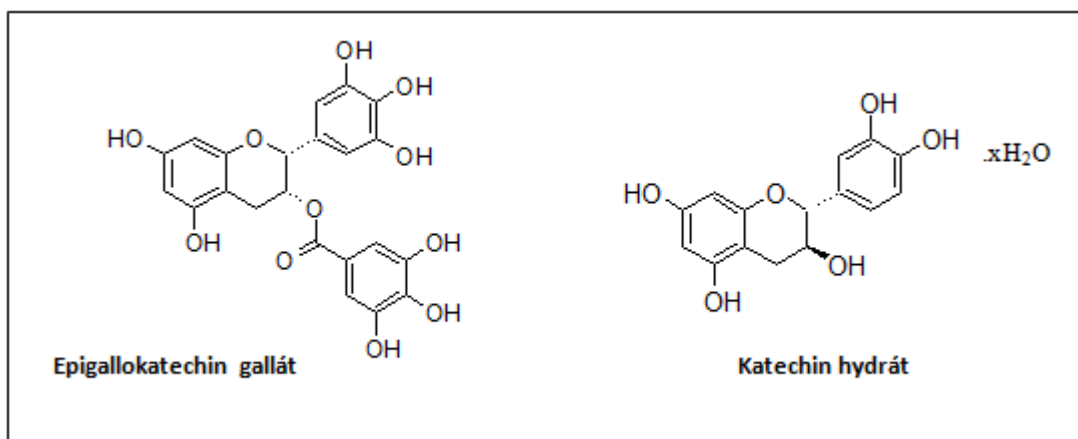


Obrázek 30: *Biochanin A.*

2.5.6 Flavan-3-oly (katechiny)

Vyskytují se v listech čaje, zejména v zeleném. Nejvýznamnějším katechinem je epigallokatechin gallát (EGCG) (Obr. 31), který tvoří až 50% všech katechinů v zeleném čaji. Jedná se o velmi významný antioxidant, jehož antioxidační schopnost převyšuje až 100 krát vitamin C. Z extraktu EGCG byla prokázána jeho inhibice růstu lidských lymfoidních buněk, jejichž typickou změnou byla elektroforézou zjištěná fragmentovaná DNA. Štěpení DNA je připisováno inhibici DNA polymerasy a aktivaci endonukleasy. EGCG se podílí také na zvyšování aktivity glutathionperoxidasy, který redukuje H_2O_2 , nebo na změně genové exprese nádorových buněk prsu (Volf a Andrs, 2012).

Podobné účinky jako EGCG vlastní také katechin hydrát (Obr. 31), velmi silný antioxidant vylučující volné radikály, který se vyskytuje v zeleném čaji a červeném víně. Inhibuje také růst nádorových buněk, zejména děložního čípku a prsu, na základě schopnosti indukovat apoptózu zprostředkovanou kaspasami (Al-Hazzani a Alshatwi, 2011).



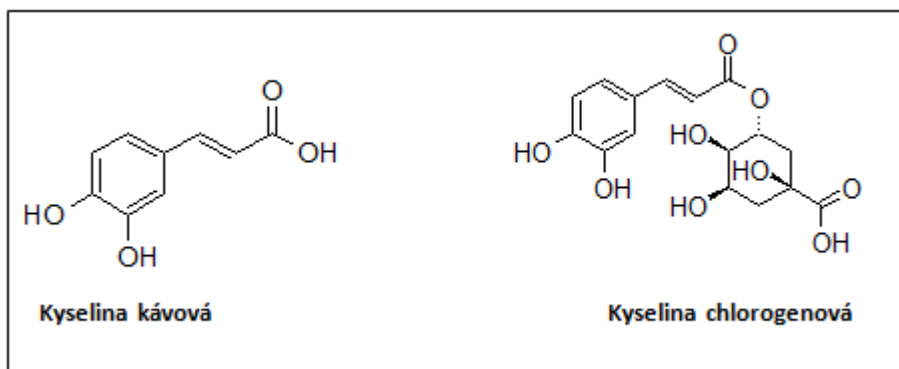
Obrázek 31: *Strukturní vzorce vybraných katechinů.*

2.5.7 Deriváty kyseliny hydroxyskořicové

Kyselina hydroxyskořicová se vyskytuje zejména v hroznech, víně a podobně jako u ostatních flavonoidů je u ní prokázán antioxidační účinek. Tato kyselina je v rostlinách zastoupena především ve formě kyseliny kávové a chlorogenové (Obr. 32) (Waterhouse, 2002).

Kyselina kávová (3,4-dihydroxyskořicová kyselina) se nachází především v kůře eukalyptu, v potravě jí můžeme ve velké míře najít v arganovém oleji a kávě (Yao et al., 2004). Působí jako selektivní inhibitor enzymu 5-lipoxygenasy, která je zodpovědná za tvorbu leukotrienů z kyseliny arachidonové. Hlavním úkolem leukotrienů je účast na imunoregulaci, jsou uvolňovány při zánětech nebo při alergických procesech, mají bronchokonstrikční účinek. Kyselina kávová jakožto inhibitor biosyntézy leukotrienů by tak mohla být významnou součástí při léčbě např. astma bronchiale (Koshihara et al., 1984).

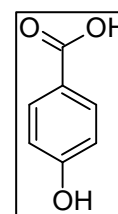
Konjugátem kyseliny kávové a chinové je kyselina chlorogenová, hlavní polyfenol přítomný v jablku, který se jako substrát účastní procesu hnědnutí jablek. Kromě jablek ji můžeme nalézt v broskvích, švestkách, nebo zrnech zelené kávy (Volf a Andrs, 2012). Kromě její antioxidační, antikancerogenní a antialergenní aktivity bylo zjištěno, že se s největší pravděpodobností jedná o inhibitor Bcr-Abl tyrosinkinasy, translačního produktu fúzního genu Bcr-Abl, jejíž přítomnost je typická pro pacienty s chronickou myeloidní leukémií (Bandyopadhyay et al., 2004).



Obrázek 32: *Strukturní vzorce kyseliny kávové a chlorogenové jakožto zástupců derivátů kyseliny hydroxyskořicové.*

2.5.8 Deriváty kyseliny benzoové

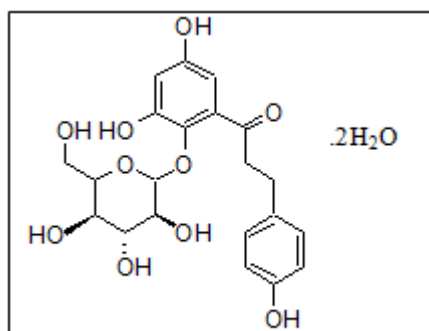
Kyselina benzoová je běžně obsažena v ovoci, zejména v brusinkách nebo čajovníku (Mason, 1905). Fenolovým derivátem této kyseliny je 4-hydroxybenzoová kyselina (Obr. 33), nebo-li *p*-hydroxybenzoová kyselina, která se nachází zejména v hroznech a víně. Estery této kyseliny jsou nazývány parabeny, které jsou často využívány jako konzervační látky v kosmetice a ve farmaceutickém průmyslu (Pugazhendhi et al., 2005). Dle Charnock a Finsruda dochází kombinací různých parabenů ke snížení mikrobiální aktivity (Charnock a Finsrud, 2007).



Obrázek 33: *Strukturní vzorec 4-hydroxybenzoové kyseliny.*

2.5.9 Dihydrochalkony

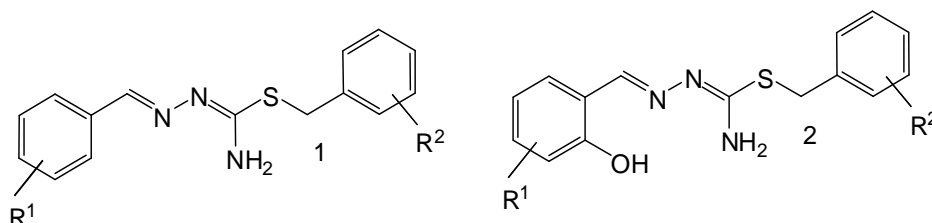
Jedná se o flavonoidy s otevřeným kruhem, které jsou obsažené v jablkách. Mezi nejvýznamnější dihydrochalkony je řazen floretin, jehož 3-glykosidem je floridzin (Obr. 34) (Volf a Andrs, 2012). U této sloučeniny je zamýšleno její využití při léčbě diabetu mellitu typu II, neboť ve studiích na potkanech vykazovala výrazné inhibiční schopnosti na specifické transportéry glukosy SGLT1 a SGLT2, které v proximálních tubulech ledvin glukózu zpětně resorbují do krve na základě symportu se sodnými ionty. Inhibicí těchto transportérů bylo dosaženo snížení koncentrace glukosy v krvi (Dršata et al., 2009, Najafian et al., 2012).



Obrázek 34: Floridzin dihydrát.

2.6 S- Benzyliothiosemikarbazony (Obr. 35)

Isothiosemikarbazony jsou sloučeniny známé pro svůj antimykobakteriální účinek *in vitro* (Petrlíková et al., 2011). Jejich syntéza spočívá v zahřívání aldehydu či salicylaldehydu s S-benzyliothiosemikarbazid-hydrohalogenidy, které byly připraveny zahříváním isothiosemikarbazidu s příslušným benzylohalogenidem. Sloučeniny byly testovány proti kmenům *M. tuberculosis* CNCTCMy 331/ 88, *M. kansasii* CNCTCMy 235/ 80, *M. avium* CNCTC My 330/ 88 a *M. kansasii* 6509/96 (Tabulka 1). Jako standard pro porovnání aktivit byl použit isoniazid (INH).



Obrázek 35: Struktura S-benzyliothiosemikarbazonů. Převzato z Petrlíková et al., 2011.

Tabulka 1: Antimykobakteriální aktivita *S*-benzylisothiosemikarbazonů.

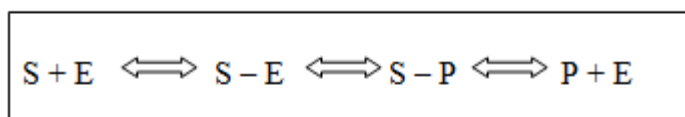
Compound			MIC ($\mu\text{mol/L}$); Incubation time 14d/21d			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96	
1a*	H	H	62.5/125	32/62.5	62.5/62.5	125/125
1b*	H	3-Cl	32/62.5	16/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
1c*	H	4-CH ₃	32/62.5	16/32	62.5/62.5	62.5/62.5
1d*	H	4-CF ₃	32/62.5	16/62.5	62.5/62.5	32/62.5
1e*	H	4-Br	16/32	16/16	62.5/62.5	32/62.5
2a	H	H	62.5n/62.5n	62.5n/125n	32n/32n	62.5n/125n
2b*	H	3-Cl	32/32	62.5/125	62.5/62.5	16/32
2c*	H	4-F	32/n	n/n	n/n	n/n
2d*	H	4-Cl	8/16	n/n	32/62.5	32/n
2e*	H	4-Br	16/32	n/n	32/32	32/32
2f*	5-Cl	3-Cl	32/32	n/n	32/32	32/n
2g*	5-Cl	3-OCH ₃	32/32	n/n	32/32	62.5/62.5
2h*	5-Cl	4-CH ₃	32/32	n/n	62.5/n	n/n
2i*	5-Cl	4-F	16/16	32/n	16/32	32/32
2j*	5-Cl	4-Cl	16/16	n/n	32/32	32/32
2k*	5-Br	3-Cl	32/32	n/n	32/n	n/n
2l	5-Br	4-CH ₃	62.5n/250n	250/250n	125n/250n	125n/250n
2m*	5-Br	4-CF ₃	32/32	32/n	62.5/62.5	32/32
2n*	5-Br	4-F	16/16	62.5/n	32/32	32/32
2o*	5-Br	4-Br	16/32	n/n	n/n	32/n
2p	3,5-Cl ₂	4-CH ₃	250n/250n	250n/250n	250n/250n	250n/250n
2q	3,5-Cl ₂	4-Cl	62.5n/62.5n	125/250n	62.5n/62.5n	62.5n/62.5n
2r*	3,5-Cl ₂	4-Br	16/32	n/n	32/32	n/n
2s	3,5-Br ₂	H	250n/250n	250/250n	125n/250n	250n/250n
2t	3,5-Br ₂	4-CH ₃	125n/250n	250/500n	62.5n/125n	125n/250n
INH			1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

* Aktivita byla publikována (Petrlíková et al., 2011)

2.7 Enzymová kinetika a inhibice enzymů

Enzymy (E) jsou globulární bílkovinné makromolekuly, které slouží v živých systémech jako biokatalyzátory, čímž urychlují průběh mnohých chemických dějů v těchto systémech tím, že snižují jejich aktivační energii. Enzym vytváří nekovalentní komplex se substrátem (S), který je enzymem aktivně přeměněn na produkt (P) (Obr. 36). Z této reakce enzym vystupuje v původní nezměněné podobě a je schopný katalyzovat přeměnu další molekuly substrátu (Pavlíček, 2012).

Na povrchu enzymu se vyskytuje aktivní místo, které se skládá z aminokyselinových zbytků vážící substrát. Tyto zbytky v primární struktuře bílkoviny nemusí být řazeny za sebou, ovšem v globulárním uspořádání se dostávají k sobě a vytváří prohlubeň nebo zářez převážně hydrofobního charakteru. Toto centrum obsahuje místo vazebné pro substrát a dále místo katalytické, kde probíhá přeměna substrátu na produkt. Enzym se dále skládá z nebílkovinné části, koenzymu, jehož struktura většinou odpovídá derivátům vitamínu skupiny B. Koenzymy se vážou v blízkosti aktivního centra a mohou velmi výrazně změnit aktivitu enzymu. Do tohoto místa se mohou vázat také inhibitory a aktivátory reakce, které ovlivňují její rychlost.



Obrázek 36: Úloha enzymu při přeměně substrátu na produkt.

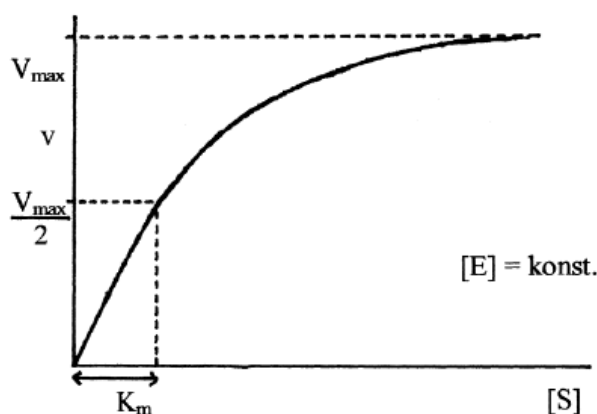
Vazba mezi enzymem a substrátem byla definována jako teorie zámku a klíče, kde substrát působí jen v takovém enzymu, do kterého strukturně zapadá. Tato teorie byla později poupravena, neboť jak se ukázalo, enzymová specifita vůči substrátu není nikdy absolutní a substrát je schopen do jisté míry měnit konformaci enzymu tak, aby se přizpůsobil tvaru substrátu. Tyto poznatky byly shrnuty v tzv. teorii indukovaného přizpůsobení (Racek et al., 2006, Ledvina et al., 2009, Pavlíček, 2012).

2.7.1 Enzymová kinetika

Pro sledování rychlosti enzymové reakce se stanovuje úbytek substrátu nebo nárůst produktu za určitý čas při standardních podmínkách jako jsou pH, teplota, daná koncentrace substrátu a enzymu (Racek et al., 2006).

Pro jednosubstrátové reakce platí poměrně jednoduchá kinetika, kdy jeden substrát vstupuje do reakce, která je katalyzovaná enzymy lyasou, hydrolyasou nebo isomerasou. Závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu v molech na litr odpovídá graf ve tvaru paraboly (Obr. 37) v případě konstantní koncentrace enzymu. Při nízkých koncentracích substrátu je tato závislost lineární a se zvyšující se koncentrací substrátu rychlost reakce roste pomaleji až dosáhne maximální rychlosti (V_{\max}). Z matematického pohledu je nejdůležitější charakteristikou enzymu Michaelisova konstanta, která vyjadřuje takovou koncentraci substrátu, při které reakce probíhá poloviční maximální rychlostí a popisuje tak míru afinity enzymu k substrátu (Ledvina et al., 2009).

Na dvousubstrátových reakcích se podílejí zejména transferasy, oxidoreduktasy a kinasy. Oba substráty se buď nejdříve navážou na enzym a teprve poté může probíhat reakce, nebo jeden substrát předá enzymu funkční skupinu, kterou přebere následně druhý substrát (Ledvina et al., 2009).



Obrázek 37: Jednosubstrátová reakce. Graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu $[S]$ při konstantní koncentraci enzymu. Převzato z Ledvina et al., 2009.

2.7.2. Inhibice enzymů

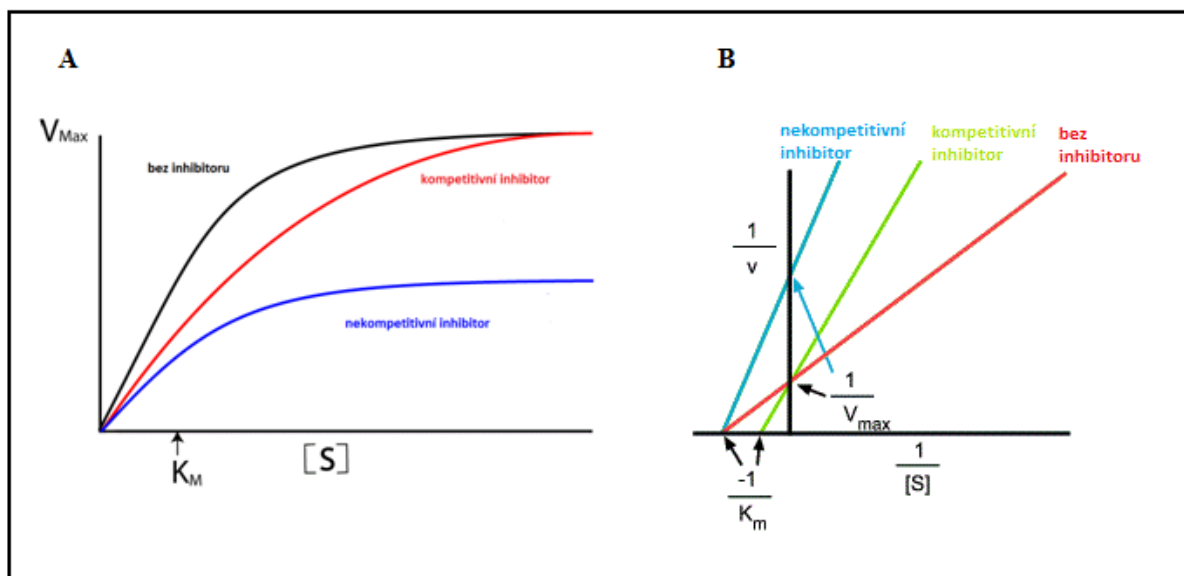
Látky, které mohou biologicky snižovat enzymovou aktivitu, aniž by došlo k jeho destrukci, se nazývají inhibitory (I). Význam inhibice enzymu spočívá zejména v regulaci metabolických dějů či jako cílené využití ve farmakologii. Na základě toho, jakou silou se inhibitor váže na enzym, se rozlišují inhibice reverzibilní a ireverzibilní. Dále se inhibice dělí na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní (Racek et al., 2006, Ledvina et al., 2009).

Inhibice kompetitivní představuje vazbu inhibitoru do aktivního místa enzymu, kam se váže také substrát. Z toho vyplývá, že inhibitor musí být látkou chemicky příbuznou k substrátu. Tento děj tedy spočívá v soutěži inhibitoru a substrátu o vazebné místo. Tento druh inhibice je reverzibilní a lze ji odstranit při vzrůstu koncentrace substrátu (Bartovská a Randová, 2008).

Situace, ve které se inhibitor váže mimo aktivní místo a změní tím konformaci enzymu, se nazývá nekompetitivní inhibice. Inhibice může být vratná i nevratná, na základě toho, zda dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi inhibitorem a enzymem. Substrát s inhibitorem zde většinou nevykazují podobnost, na rozdíl od inhibice kompetitivní. Substrát se sice váže do aktivního místa enzymu, ale tvorba produktů je značně zpomalena (Ledvina et al., 2009).

K akompetitivní inhibici dochází v případě, kdy se inhibitor váže pouze na komplex enzym – substrát a nikoliv pouze na volný enzym (Ledvina et al., 2009).

Pro diagnostiku inhibovaných reakcí se obvykle využívá grafické vynesení hodnot reakčních rychlostí při různých koncentracích substrátu a inhibitoru (Obr. 38) (Bartovská a Randová, 2008).



Obrázek 38: Závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu. **A.** Přímé vynesení. **B.** Dvojitě reciproké znázornění dle Lineweavera a Burka.

Převzato z <http://alevelnotes.com/Enzyme-Inhibitors/148;>

http://learning.covcollege.ac.uk/content/Jorum/MET_Enzyme-inhibition_LM-1.2/page52.htm.

2.7.3 Měření enzymové kinetiky

Enzymové analýzy jsou založeny na principu stanovení koncentrace substrátu nebo produktu v reakci za určitý čas. Metody sloužící k určení katalytické aktivity enzymů lze rozdělit na kontinuální (continuous assay), která může být použita i ve formátu HTS (High-Throughput Screening) a dále na tzv. end-point analýzu (End-point assay).

a) Continuous Assay

Tato analýza umožňuje sledovat úbytek substrátu nebo nárůst produktu v reálném čase. Díky této metodě je možné proměřit linární fázi, kterou je možné dále stanovit pomocí metody end-point. Nevýhodou této analýzy zůstává možnost měřit pouze jednu enzymovou reakci v čase, naopak výhodou je její poměrná jednoduchost stanovení. Pro dosažení co možná nejlepších výsledků je zde nutné optimalizovat pH reakce před vlastní analýzou. Koncentrace substrátu nebo produktu mohou být měřeny spektrofotometricky, fluorescenčně, kolorimetricky nebo chemiluminiscenčně (Enzyme Assays, 2013).

b) End-Point Assay

Diskontinuální analýza udává koncentraci substrátu (produktu) vzniklého ve stanoveném časovém úseku. Po přidání startovací substance je reakční směs inkubována ve zkumavkách nebo v jamkách mikrotitrační destičky po přesně stanovenou dobu, která byla určena metodou continuous assay. Reakce je ukončena přidáním substance, která zabrání reakci enzymu se substrátem. Výhodou této metody je možnost měření více enzymových reakcí najednou. Pro tuto analýzu jsou často využívány metody chromatografické a radiometrické (Enzyme Assays, 2013).

c) Continuous-HTS Screening (High Throughput Screening)

HTS screening představuje proces, který je založen na automatizaci, která umožňuje rychlou analýzu biochemické a biologické aktivity velkého množství stanovovaných sloučenin. Nejčastěji se provádí na 96 až 384 jamkových mikrotitračních destičkách a aktivita je detekována pomocí sensitivních čteček mikrotitračních destiček a hodnocena na základě softwaru. Kromě enzymové analýzy je metoda využívána často pro stanovení ligandů receptorů, protilátek či biologických terčů farmakologicky aktivních látek (High Throughput Screening, 2013).

2.7.4 Možnosti měření aktivity ICL

Hojně využívanou metodou pro detekci enzymové aktivity je spektrofotometrie, která je založena na pohlcování UV a viditelného záření měřené substance. Měření se provádí při takové vlnové délce, při které některý z reaktantů či produktů vykazuje absorpční maximum a jiná složka směsi při této vlnové délce neabsorbuje. Absorpce je měřena spektrofotometrem, který se skládá ze zdroje záření, monochromátoru, kyvety se vzorkem a detektoru (Klouda, 2003).

Stanovení aktivity ICL dle Dixona a Kornberga (1959) spočívá v nepřímé detekci vzniku glyoxylátu z isocitrátu za katalýzy isocitrátlyásou. V přítomnosti fenylyhydrazinu dochází k tvorbě komplexu fenylyhydrazonglyoxylátu. Spektrofotometricky je poté při 324 nm hodnocen nárůst absorbance, ke kterému dochází vlivem vzniku fenylyhydrazonglyoxylátu (Dixon a Kornberg, 1959).

Dle Höner zu Bentrup (1970) se aktivita ICL měří na základě přeměny vzniklého glyoxylátu na glykolát laktátdehydrogenásou (LDH) za oxidace NADH. Reakce je zastavena přidáním ury a úbytek NADH se spektrofotometricky stanoví při 490 nm po přidání formazánového barviva (Höner zu Bentrup et al., 1970).

K měření aktivity enzymu ICL by bylo možné také zavedení metody HPLC. Tento způsob stanovení ovšem dosud nebyl publikován, nejspíše díky dostatečné citlivosti spektrofotometrické metody a nutnosti přípravy fenylyhydrazonglyoxylátu, který by byl nutný k vytvoření kalibrační řady, podle které by byla určena výsledná koncentrace produktu v námi testované reakci.

3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu isocitrátlyasy v přítomnosti *S*-benzylisothiosemikarbazonů a flavonoidů, jakožto potenciálních inhibitorů tohoto enzymu. Součástí práce je zhodnocení jejich vlivů na tuto aktivitu a vypracování rešerše, která pojednává o charakteristikách isocitrátlyasy a možnostech stanovení její aktivity.

4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiály a pomůcky

4.1.1 Chemikálie

Název	Výrobce
2-merkптоethanol	Sigma - Aldrich
3-nitropropionová kyselina	Sigma - Aldrich
Akrylamid, f.e. $\geq 99\%$	Sigma – Aldrich
Bradfordovo činidlo	Sigma - Aldrich
Bug Buster protein Extraction Reagent	Novagen
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma - Aldrich
Deriváty S-benzylisothiosemikarbazonů	připraveny na UK,
• 5-bromsalicylaldehyd-S-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	FaF v Hradci
• 5-bromsalicylaldehyd-S-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	Králové, Katedra
• 5-bromsalicylaldehyd-S-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon	AOCH
• 5-bromsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-bromsalicylaldehyd-S-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-dibromsalicylaldehyd-S-benzylisothiosemikarbazon	
• 5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-dichlorsalicylaldehyd-S-(methylbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-dichlorsalicylaldehyd-S-benzylisothiosemikarbazon	
• 5-chlorsalicylaldehyd-S-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-chlorsalicylaldehyd-S-(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	
• 5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	
• aceton-S-benzylisothiosemikarbazon	
• benzaldehyd-S-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	
• benzaldehyd-S-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	
• benzaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	

- benzaldehyd-*S*-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
- benzaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazon
- salicylaldehyd-*S*-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
- salicylaldehyd-*S*-(4brombenzyl)isothiosemikarbazon
- salicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
- salicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
- salicylaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazon

Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma - Aldrich
Dimethylsulfoxid $\geq 99,9\%$	Sigma - Aldrich
Glycerol 85% (v/v)	Dr. Kulich
Chlorid hořečnatý $\geq 99\%$	Sigma - Aldrich
Chlorid sodný	Penta
Hovězí sérový albumin (100x)	NEB
Hovězí sérový albumin (BSA) $\geq 99,9\%$	Sigma - Aldrich
Hydrochlorid fenyhydrazinu	Sigma - Aldrich
Hydroxid draselný	Sigma - Aldrich
Imidazol	Sigma - Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosidu (IPTG)	Sigma - Aldrich
Kanamycin	Sigma - Aldrich
Kyselina chlorovodíková 36% (v/v)	Penta
L -(+)-cystein	Sigma - Aldrich
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamin $\geq 99\%$	Sigma - Aldrich
(+)-Potassium Ds-threo-isocitrát	Sigma - Aldrich

4.1.2 Přístroje

Název	Výrobce
ÄKTA purifier	Amershan Biosciences
Analytické váhy Scaltec SBC22	Sartorius
Centrifuga BiofugeStratos	Heraeus
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf
Čtečka mikrotitračních destiček Infinite M 200 PRO	Tecan Group Ltd.

Inkubátor Termomixer Compact	Eppendorf
Míchačka	IKA
Předvážky PT310	Sartorius
Skla a aparatura pro elektroforézu	Bio-Rad
Spektrofotometr Helios β	Spectronic Unicam
Vortex MS3	IKA
Zdroj pro elektroforézu Power Pac	Universal

4.1.3 Laboratorní pomůcky

Název	Výrobce
8-kanálová elektronická pipeta e-PET	BioHit
96-jamkové mikrotitrační destičky	Schoeller
Amicon Ultra-15	Millipore
Automatické pipety, špičky (0,5-5 ml)	Eppendorf
Mikrozkumavy (1,5 ml; 0,5 ml)	Eppendorf
Sterilní laboratorní sklo	Thermo Fisher Scientific

4.1.4 Pufry, roztoky a jiný materiál

Reakční pufr

- 50 mM dihydrogenfosforečnan draselný
- 4 mM chlorid hořečnatý
- 4 mM hydrochlorid fenyhydrazinu
- 12 mM L -(+)-cystein

Pufr 1 pro purifikaci enzymu

- 20 mM Tris
- 500 mM NaCl
- 30 mM imidazol
- pH 7,4

Pufr 2 pro purifikaci enzymu

- 20 mM Tris
- 500 mM NaCl
- 500 mM imidazol

- pH 7,4

Isobutanol nasycený vodou (nachází se ve vrchní vrstvě)

- isobutanol
- destilovaná voda

Naředěný elektrodový pufr

- 70 ml 5x koncentrovaný elektrodový pufr
- 280 ml destilované vody

Vzorkový pufr

- 1,3 ml vody
- 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
- 2,0 ml glycerolu
- 3,0 ml 10% SDS
- 0,6 ml 0,5% Bromfenolové modři

10% kyselina octová

- 50,5 ml 99,9% kyseliny octové
- 449,5 ml vody

0,25% Coomassie Blue Brilliant v 10% kyselině octové

- 0,25 g Coomassie Blue Brilliant
- 100 ml 10% kyseliny octové

Roztok pro separační gel

- 3,2 ml vody
- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl
- pH 8,8
- 0,1 ml 10% SDS
- 4,2 ml 30% akrylamidu
- 0,8% bis-akrylamid
- 58 µl 10% persíranu amonného
- 4 µl *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediaminu

Roztok pro zaostřovací gel

- 3,125 ml H₂O
- 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl
- pH 6,8

- 0,05 ml 10% SDS
- 0,5 ml 30% akrylamidu
- + 0,8% bis-akrylamid
- 30 µl 10% persíranu amonného
- 2,5 µl *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediaminu

LB medium

- Trypton 1,0 g
- kvasničný extrakt 0,5 g
- 1 g NaCl
- 100 ml vody
- pH 7

Kity

- ThrombinCleavageCaptureKit Novagen
- Bug Buster Protein Extraction kit Novagen

Marker

- Precision Plus Protein Standard All Blue Bio-Rad

Biologický materiál

- *E. coli* BL21 Promega

Flavonoidy

- (-)-epigallokatechingalát Sigma - Aldrich
- naringenin Sigma - Aldrich
- katechin hydrát Sigma - Aldrich
- 2-hydroxyflavanon Sigma - Aldrich
- 3-hydroxyflavon Sigma - Aldrich
- 4-hydroxybenzoová kyselina Sigma - Aldrich
- 4-hydroxyflavonon Sigma - Aldrich
- 5-hydroxyflavon Sigma - Aldrich
- 7-hydroxyflavon Sigma - Aldrich
- biochanin A Sigma - Aldrich
- cyanin chlorid Fluka
- dansylhydrazin Sigma - Aldrich
- flordin dihydrát Sigma - Aldrich

• hesperetin	Sigma - Aldrich
• kvercetin dihydrát	Sigma - Aldrich
• kyselina chlorogenová	Sigma - Aldrich
• kyselina kávová	Sigma - Aldrich
• luteolin	Sigma - Aldrich
• morin hydrát	Sigma - Aldrich
• rutin hydrát	Sigma - Aldrich
• vitexin	Fluka

4.2 Metodika práce

4.2.1 Expresce isocitrátlyasy

Plazmid, u kterého byl pomocí sekvenace potvrzen daný fragment DNA, byl za použití metody tepelného šoku přenesen do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3) a tím došlo k namnožení této transformované kultury. Do Erlenmayerovy baňky obsahující 50 ml LB media s kanamycinem bylo přidáno 200 μ l této kultury, která se skládala ze zaligované sekvence proteinu. Inkubace probíhala 4 hodiny při 37 °C a 180 rpm až byla dosažena optická hustota 0,6. Poté byla indukována exprese za použití 25 μ l 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranosidu (IPTG). Po osmi hodinách inkubace při 22 °C a 150 rpm byla směs zchlazena 10 minut na ledě a poté centrifugována při 4 °C a 6000xg. Supernatant byl skladován při teplotě 4 °C a peleta při -20 °C.

Pro extrakci proteinu bylo použito BugBuster činidlo, pomocí kterého byla peleta resuspendována. Bug Buster byl přidán v množství 5 ml na gram pelety a suspenze byla následně inkubována přibližně 20 minut za pokojové teploty a mírných otáček. Poté byly 20 minutovou centrifugací při 4 °C a 16 000xg odděleny nepotřebné zbytky buněk a námi požadovaný protein se vyskytoval v supernatantu.

Pomocí afinitní chromatografie byla námi požadována isocitrátlyasa purifikována. Chromatografická kolona obsahovala Ni²⁺ ionty, které se vážou na histidinovou kotvu proteinu. Proteiny, které se nenačly na kolonu, byly vymyty a pomocí imidazolu byl eluován purifikovaný protein.

4.2.2 Odštěpení His-Tagu

Na odštěpení polyhistidinového konce byl použit komerční kit obsahující trombin, endoproteasu, která dokáže štěpit místo v sekvenci LeuValProArg↓GlySer rekombinantních proteinů. V organismu se trombin podílí na procesu krevního srážení tím, že štěpí fibrinogen na fibrin, který vytvoří síť, do které se zachytávají červené krvinky a destičky a dojde tak k zamezení krvácení. Trombin byl nejprve naředěn uchovávacím pufrem v poměru 1:12,5. K 10 µg proteinu bylo přidáno 5 µl 10x uchovávacího pufru, 1 µl ředěného trombinu a takové množství destilované vody, které doplnilo objem na 50 µl. Směs ve zkumavce byla inkubována při pokojové teplotě. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy bylo potvrzeno štěpení isocitrátlyasy.

4.2.3 Gelová vertikální SDS elektroforéza

Gelová elektroforéza je řazena mezi separační metody, jejímž principem je pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE) s dodecylsulfátem sodným (SDS) je takový způsob separace, při kterém dochází k oddělování molekul podle velikosti a využívá se zejména pro proteiny. Po navázání SDS na bílkoviny dochází k vyrovnání rozdílů mezi náboji proteinů a ty se pak mohou pohybovat v gelu pouze podle velikosti (Schägger a Jagow, 1987).

Elektroforetická skla a hřeben byly důkladně umyty a opláchnuty destilovanou vodou a lihomethanolem. Poté bylo sklo uchyceno do stojánků a byl připraven separační gel. Jakmile se do směsi přidaly iniciátory polymerace, byl gel pipetován mezi skla přibližně do $\frac{3}{4}$ jejich výšky. Následně byl gel převrstven isobutanolem a nechal se cca 45 minut tuhnout. Po proběhlé polymeraci byl isobutanol slit a gel promyt destilovanou vodou. Dále byl připraven roztok na zaostřovací gel a po přidání iniciátorů polymerace se opět naplnil prostor mezi skly až po horní okraj. Mezi skla byl vložen hřebínek a gel se nechal tuhnout alespoň 90 minut.

Ke vzorkům proteinu byl přidán pufr obsahující merkaptoethanol a 3 minuty se směs nechala povařit v termobloku při 95 °C. Z gelu byl vyndán hřebínek a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Dále byla sestavena elektroforetická cela, která byla vložena do nádoby s ledem. Skla s gelem byla vložena do stojánku, přitažena sponami a celá aparatura vložena do cely, která se poté naplnila do $\frac{3}{4}$ elektrodovým pufrem. Do jamek byly napipetovány vzorky a do jedné z krajních jamek bylo nanášeno 5 µl standardu (žebříčku). Do zbylého prostoru cely byl doplněn elektrodový pufr, vanička byla přiklopena víkem a připojena ke zdroji. Prvních 15 minut procházelo gelem napětí o velikosti 100 V, poté bylo

změněno na 200 V. Zdroj napětí byl vypnut, když čelo došlo na druhý konec gelu. Následně byl z cely vyliť pufr a z gelu byly odříznuty okraje. Gel se poté vložil do krabičky, která obsahovala 0,25% Coomassie Blue Brilliant v 10% kyselině octové a nechal se barvit přibližně 15 minut při teplotě 60 °C. Nakonec byl gel odbarven pomocí 10% roztoku kyseliny octové.

4.2.4 Převedení do fosfátového pufru

Protože se isocitrátlyasa po purifikaci vyskytovala v pufru obsahujícím imidazol, který by mohl ovlivňovat aktivitu tohoto enzymu, bylo třeba ho převést do 0,2 M draselno-fosfátového pufru o pH 7,4. K tomu byla využita centrifugací kolonka Amicon Ultra-4 s filtrem Ultracel-10. Opakovanou centrifugací při 4000xg při 4 °C po dobu 15 minut byl veškerý protein zachycen na celulózové membráně a převeden do fosfátového pufru. Po stanovení koncentrace enzymu a přidání glycerolu do konečné koncentrace 25% byl enzym uložen v mrazáku při – 20 °C.

4.2.5 Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu byla stanovena metodou dle Bradfordové (Bradford, 1976). Principem této metody je zjištění koncentrace enzymu na základě výpočtu z rovnice z kalibrační křivky. Jako standardy se používají různá naředění bovinního sérového albuminu (BSA). Tyto standardy a vzorky o neznámé koncentraci proteinu jsou následně inkubovány na mikrotitrační destičce nebo ve zkumavkách s činidlem Bradfordové, které obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue vážící bazické aminokyseliny v proteinech. Po navázání tohoto barviva dojde ke změně barvy a výsledná absorbance je měřena při 595 nm. Ze získaných hodnot se sestaví kalibrační křivka a výsledná koncentrace proteinu se vypočítá z kalibrační rovnice.

Ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny standardy o koncentracích 0,1–1 mg/ml a do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 10 µl těchto standardů a vzorku. Jako blank byl použit draselno-fosfátový pufr. Poté bylo přidáno 240 µl Bradfordova činidla a po 10 minutách změřena absorbance. Vzorky byly měřeny třikrát a výsledná hodnota absorbance představuje průměr z těchto měření.

4.2.6 Příprava reakčního pufru

Reakční pufr se skládá z 50 mM dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), 4 mM chloridu hořečnatého (MgCl_2), 4 mM hydrochloridu fenylylhydrazinu ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{HCl}$) a 12 mM L-(+)-cysteinu ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$). Navážky 340,2 mg KH_2PO_4 , 40,66 mg MgCl_2 , 29,9 mg $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{HCl}$ a 72,7 mg $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ byly pomocí míchačky rozpuštěny ve 40 ml ultradestilované vody a za stálého míchání bylo pomocí hydroxidu draselného (KOH) upraveno pH na 7,0. Pufr byl následně doplněn ultradestilovanou vodou na 50 ml.

4.2.7 Příprava inhibitorů a substrátu

Jako substrát byl použit (+)-potassium Ds-threo-isocitrát, jehož finální koncentrace přímo v reakci byla 2 mM.

Nejprve byly připraveny 10 mM roztoky potenciálních inhibitorů, které byly následně naředěny na roztoky 1 mM. Tyto 1 mM roztoky byly použity do reakce tak, aby finální koncentrace testovaných sloučenin v reakci byla 10 μM .

Substrát a kyselina 3-nitropropionová byly rozpuštěny v ultradestilované vodě. K rozpuštění ostatních inhibitorů byl použit dimethylsulfoxid (DMSO).

4.2.8 Enzymová reakce

Aktivita isocitrátlyasy byla stanovena metodou dle Dixona a Kornberga třemi různými způsoby. Jednalo se o měření v kyvetách, v mikrozkuvkách a na 96-jamkové mikrotitrační destičce.

a) měření v kyvetách (Continuous Assay)

Enzymová aktivita byla spektrofotometricky měřena třikrát při vlnové délce 325 nm a teplotě 37 °C. Enzym (1 μl) o koncentraci 2,38 mg/ml byl inkubován s 949 μl reakčního pufru po dobu 10 minut. Po přidání 50 μl 40 mM substrátu byla měřena aktivita ICL na klasickém spektrofotometru po dobu deseti minut. Od změřené absorbance byla odečtena absorbance slepého vzorku.

b) inkubace v mikrozkuvkách (End-Point Assay)

Enzymová aktivita reakční směsi o celkovém objemu 100 μl byla hodnocena čtečkou mikrotitračních destiček po předchozí inkubaci enzymu s pufrům v mikrozkuvkách (37 °C). Enzym (1 μl) o koncentraci 0,238 mg/ml byl nejprve preinkubován s 94,9 μl reakčního pufru po dobu sedmi minut. Přidáním 5 μL 40 mM substrátu byla nastartována reakce, která byla následně po sedmi minutách ukončena přidáním 4 M roztokem močoviny. Po následné centrifugaci byl supernatant přenesen na mikrotitrační destičku, kde byla změřena jeho absorbance (Tecan). Za stejných podmínek byl opět měřen i slepý vzorek, jehož absorbance byla následně odečtena. Měření probíhalo vždy v triplikátech.

c) měření na destičce (Continuous Assay – HTS formát)

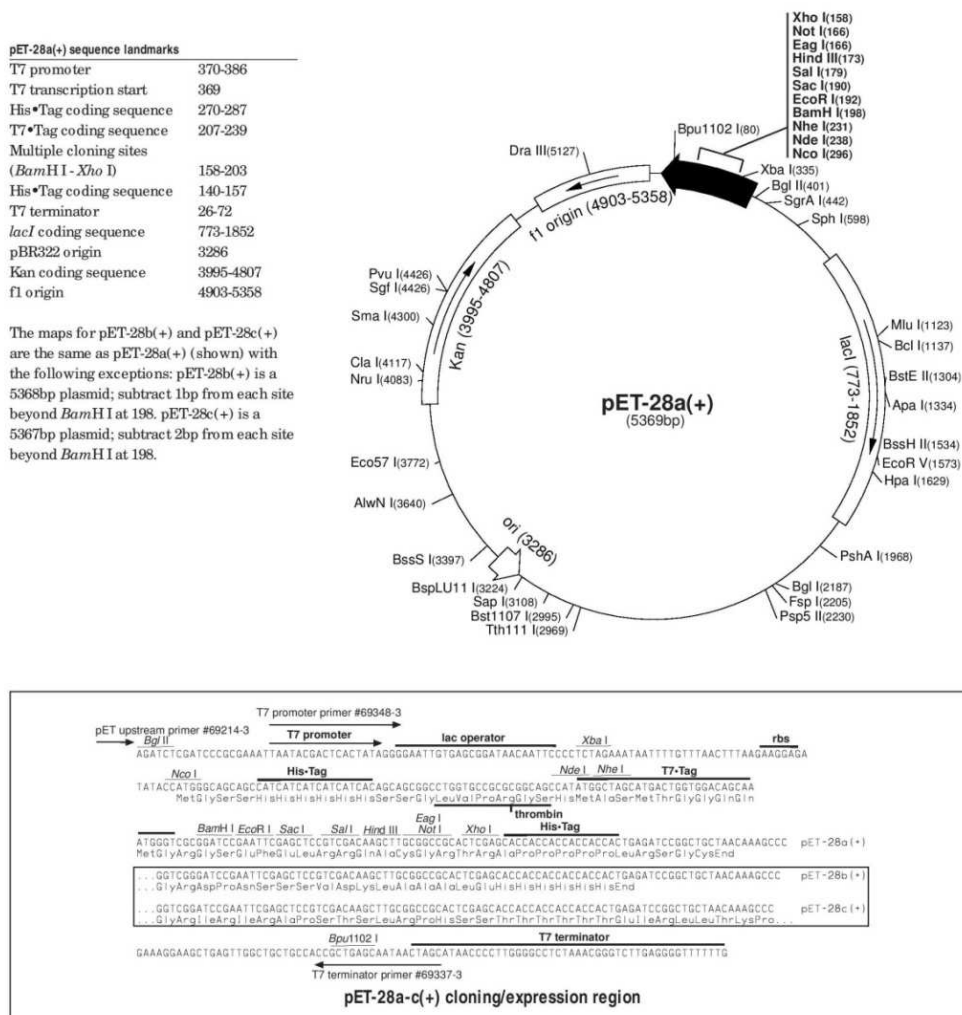
Enzymová reakce byla upravena pro 96-jamkovou mikrotitrační destičku. Do každé jamky bylo pipetováno 10 μl substrátu (finální koncentrace v reakci 2 mM) a 90 μl pufru s enzymem isocitrátlyasou. V každé řadě destičky byly zároveň testovány i slepé vzorky.

Reakce byla startována za použití multikanálové automatické pipety. Nárůst absorbance byl stanovován na čtečce mikrotitračních destiček při vlnové délce 324 nm. Reakce probíhala při 37 °C a absorbance byla proměřována každou minutu celkem 45 minut.

5. VÝSLEDKY

5.1 Expresa a izolace enzymu

Plazmid (pET28b(+)) (Obr. 39) se sekvencí *icl* (Rv0467) byl transformován do kompetentních buněk BL21(DE3). Při optické hustotě $OD_{595} = 0,6$ byla provedena indukce pomocí 25 μl 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranosidu (IPTG) (0,05 mM finální koncentrace). Z důvodu tvorby inkluzních tělísek byla zvolena inkubace za snížené teploty (22 °C, 150 rpm). Po ukončení exprese byly buňky rozbity pomocí Bug Busteru.



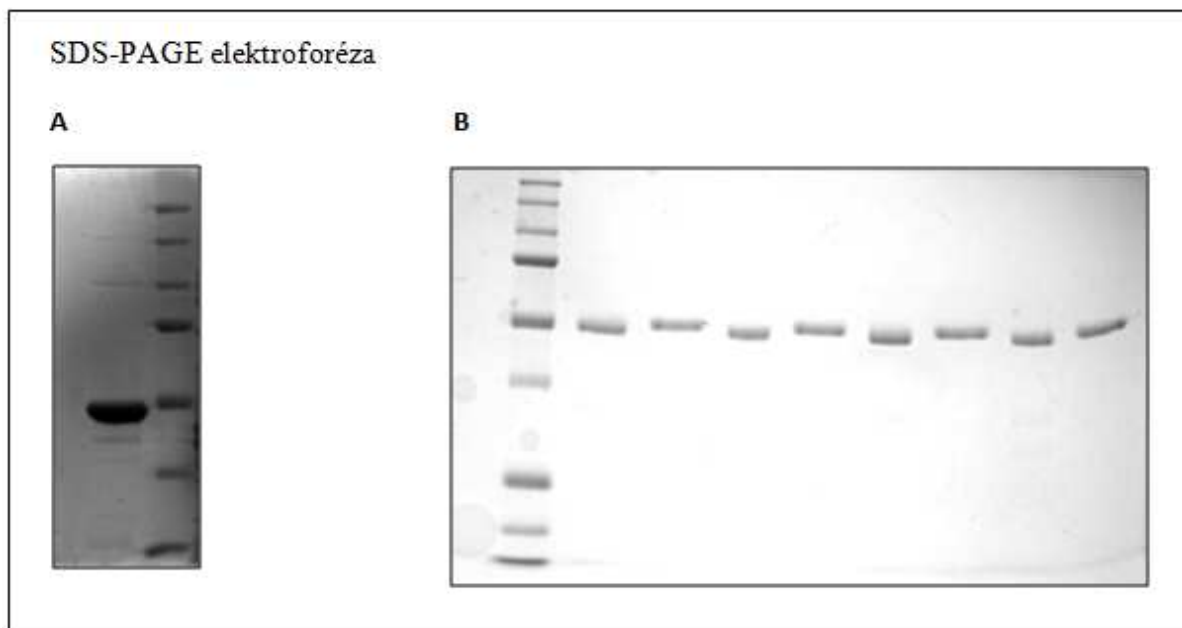
Obrázek 39: pET-28a-c(+), (Novagen). Sekvence kódující isocitrátlyasu je vložena mezi restrikční endonukleasy *NdeI* a *HindIII*. Vektor obsahuje sekvenci kódující histidinovou kotvu, která umožňuje purifikaci rekombinantního proteinu a rozpoznávací sekvenci pro thrombin umožňující následné odštěpení histidinové kotvy. Plazmid také nese rezistenci vůči kanamycinu. Převzato z: <http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET.pdf>.

Supernatant obsahující protein byl purifikován pomocí přístroje Äkta (Äkta purifier, Amersham). K získání čistého proteinu byla využita afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, konkrétně interakce mezi His-Tagem proteinu a Ni²⁺-ionty ukotvenými na koloně. Po navázání proteinu na kolonku byly nejprve odstraněny nežádoucí proteiny. Elučním pufr s vyšší koncentrací imidazolu byl následně z kolonky uvolněn námi požadovaný enzym. Čistota enzymu byla ověřena pomocí SDS-PAGE (Obr. 23).

His-Tag byl z isocitrátlyasy odštěpen pomocí kitu (ThrombinCleavageCaptureKit, Novagen). K odštěpení His-Tagu z 1 mg proteinu byl použit biotinylovaný thrombin naředěný 1:12,5 v ředícím/uchovávacím pufru (ThrombinDilution/StorageBuffer). Použitý trombin štěpí sekvenci LeuValProArg↓GlySer. Před vlastním štěpením muselo být tedy ověřeno, že samotná isocitrátlyasa tuto sekvenci aminokyselin neobsahuje. Podmínky štěpení jsou shrnuty v Tabulce 2. Po 16 hodinách byl trombin odstraněn pomocí 50% suspenze streptavidin agarosy (32 µL streptavidin agarosy na 1 U trombinu). Reakční směs se nechala inkubovat 30 minut za mírného promíchávání při 12 °C. Následně byla streptavidin agarosa s navázaným trombinem oddělena od isocitrátlyasy filtrací přes kolonku. Filtrát získaný centrifugací kolonky při 500xg (5 minut) obsahoval čistou isocitrátlyasu bez His-Tagu. Odštěpení His-Tagu bylo ověřeno pomocí SDS-PAGE (Obr. 40).

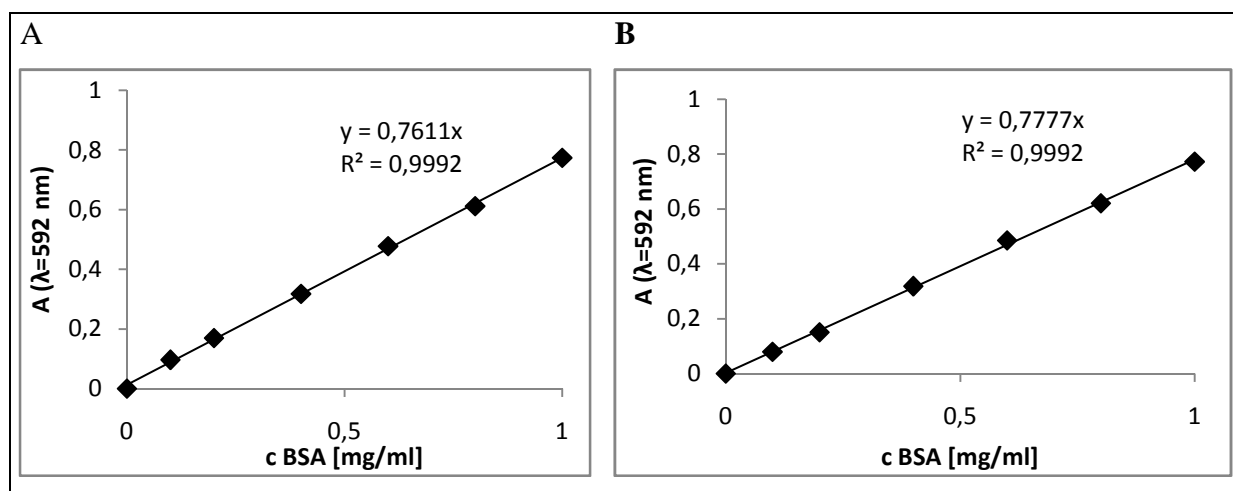
Tabulka 2: Podmínky štěpení His-Tagu z isocitrátlyasy.

Reakční pufr (10x Trombin Cleavage/Capture Buffer)	500 µL
Isocitrátlyasa s His-Tagem (c = 2,38 mg/ml)	420 µL (1 mg)
Trombin naředěný v ředícím/uchovávacím pufru 1:12,5	100 µL
Deionizovaná voda	3980 µL
Podmínky reakce	4 °C, 16 hodin



Obrázek 40: SDS-PAGE elektroforéza isocitrátlyasy. **A.** Elektroforéza přečištěné isocitrátlyasy (velikost 50 kDa) (jamka č. 1). V jamce č. 2 je nanesen marker Precision Plus Protein standard All Blue. **B.** Odštěpení His-Tagu z isocitrátlyasy. K odštěpení byl použit biotinylovaný thrombin (1:12,5 v ředícím/uchovávacím pufru). V první jamce je porovnávací žebříček, v jamkách 2, 4, 6 a 8 je nanesena isocitrátlyasa s odštěpeným His-Tagem, jamky 3, 5, 7 a 9 obsahují isocitrátlyasu s neodštěpeným His-Tagem.

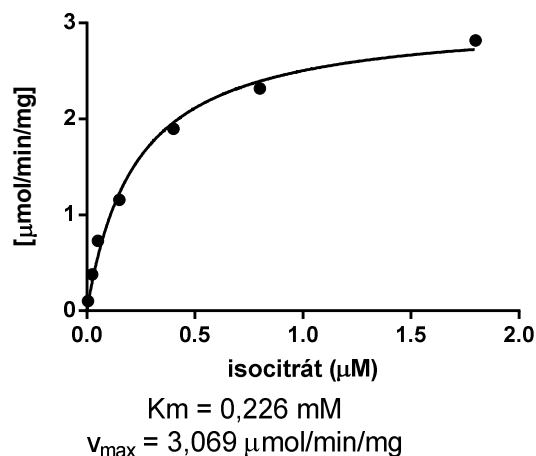
Isocitrátlyasa byla po přečištění na přístroji Äkta (Äkta purifier, Amersham) a po odštěpení His-Tagu převedena do draselno-fosfátového pufru. Koncentrace připravené isocitrátlyasy byla před a po odštěpení His-Tagu stanovena metodou dle Bradfordové. Pro vytvoření kalibrační křivky byl jako standard použit BSA (Obr. 41). Enzym byl naředěn 5x a 10x. Z naměřených absorbancí byla stanovena koncentrace enzymu 2,38 mg/ml po purifikaci a 0,98 mg/ml po odštěpení His-Tagu. Ke vzorku byl následně přidán glycerol v poměru 1:3 (výsledná množství glycerolu 25 %) a enzym byl uložen k dlouhodobému skladování při -20 °C.



Obrázek 41: Stanovení koncentrace bílkoviny dle Bradfordové. **A.** Kalibrační křivka použitá pro určení koncentrace ICL po purifikaci. **B.** Kalibrační křivka použitá pro určení koncentrace ICL po odštěpení histidinové kotvy. Závislost absorbance na koncentraci standardu BSA.

5.2 Stanovení aktivity enzymu

Aktivita isocitrátlyasy byla stanovena metodou dle Dixona a Kornberga třemi různými způsoby. Jednalo se o měření v kyvetách, v mikrokumavkách a na 96-jamkové mikrotitrační destičce. Cílem bylo ověřit funkčnost rekombinantně připraveného enzymu, porovnat aktivitu isocitrátlyasy s His-Tagem s aktivitou po jeho odštěpení a optimalizovat metodu pro měření potenciálních inhibitorů tohoto enzymu. K aktivitě isocitrátlyasy lze použít všechny tři způsoby měření. V případě měření v kyvetách a v mikrokumavkách byla použita 45 μM finální koncentrace enzymu a absorbance byla odečtena po 7 minutách. Po této době již průběh reakce nebyl lineární. Pro měření na mikrotitračních destičkách byla z tohoto důvodu následně snížena koncentrace isocitrátlyasy na 10 μM a absorbance byla odečítána vždy v 15. - 18. minutě. Měření na 96-jamkové destičce bylo použito pro porovnání aktivity isocitrátlyasy s His-Tagem a po jeho odštěpení. Z naměřených hodnot absorbance byla spočítána aktivita isocitrátlyasy s His-Tagem 1,46 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Po odštěpení histidinové kotvy se aktivita enzymu nepatrně zvýšila na 2,82 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Graf dle Michaelis-Mentenové ukazuje závislost aktivity isocitrátlyasy na substrátu ((+)-potassium-Ds-threo-isocitrát) (Obr. 42).



Obrázek 42: *Graf dle Michaelis-Mentenové.*

5.2.1 Kyselina 3- nitropropionová jako inhibitor ICL

3-Nitropropionát (3-NP) patří mezi prokázané inhibitory ICL. Jeho inhibiční vlastnosti byly stanoveny opět všemi třemi způsoby - měřením absorbance na klasickém spektrofotometru, měřením absorbance čtečkou mikrotitračních destiček (Tecan) a to buď po ukončení enzymové reakce v mikrozkuvkách, nebo kontinuálním měřením na mikrotitrační destičce.

a) měření v kyvetách (Continuous Assay)

Enzymová aktivita byla spektrofotometricky měřena třikrát při 325 nm v přítomnosti 3-nitropropionové kyseliny a bez ní. Enzym (1 μ l) o koncentraci 2,38 mg/ml byl preinkubován s 939 μ l reakčního pufru a 10 μ l 10 mM 3-NP (100 μ M finální koncentrace) po dobu 10 minut. Po přidání 50 μ l 40 mM substrátu byl zaznamenáván nárůst absorbance pomocí spektrofotometru. Aktivita ICL byla porovnána s aktivitou bez přidání inhibitoru.

Vzorky byly vždy proměřovány vůči slepému vzorku. Hodnoty absorbance byly zprůměrovány a výsledná inhibice byla na základě rovnice 1 stanovena na 70 %.

Rovnice 1: Výpočet procent inhibice.

$$\text{inhibice} = 100 - \frac{A(I)}{A(E)} \cdot 100$$

$A(I)$ popisuje aktivitu po přidání inhibitoru, $A(E)$ udává aktivitu bez přítomnosti inhibitoru

b) inkubace v mikrozkušavkách (End-Point Assay)

Enzymová aktivita reakční směsi o celkovém objemu 100 μl byla hodnocena čtečkou mikrotitračních destiček po předchozí inkubaci enzymu s puftrem v mikrozkušavkách. Měření bylo podrobena celkem deset zkumavek, z čehož vždy prvních pět neobsahovalo inhibitor, naopak ve zbylých pěti byl přítomen 3-nitropropionát o koncentraci 100 μM . Za stejných podmínek byl opět měřen současně i slepý vzorek. Měření bylo provedeno třikrát, z průměru hodnot byla spočítána inhibice 74 %.

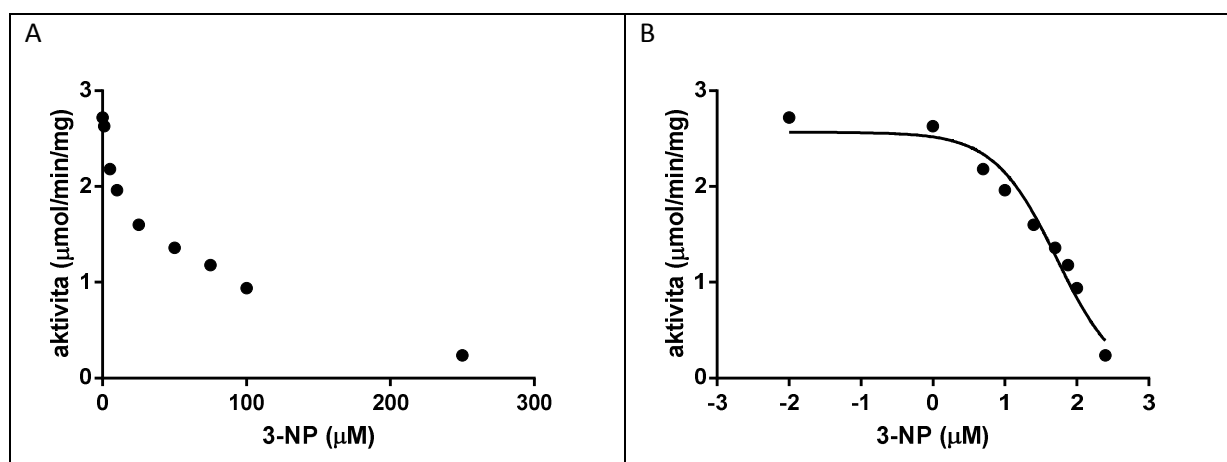
c) na destičce (Continuous Assay – HTS formát)

Měření inhibice enzymu za přítomnosti různých koncentrací 3-NP na mikrotitrační destičce byly získány následující hodnoty (Tabulka 3):

Tabulka 3: Procentuální inhibice koncentrační řady kyseliny 3- nitropropionové. Rozpuštěním 3-NP v ultradestilované vodě byly získány zásobní roztoky 10 mM, 7,5 mM, 5 mM, 25 mM a 1 mM. Ke stanovení % inhibice byl do reakce o celkovém objemu přidán vždy 1 μl takto připravených zásobních roztoků.

Koncentrace 3-NP	Inhibice (%)
100 μM	72 \pm 1,82
75 μM	69 \pm 3,23
50 μM	58 \pm 2,47
25 μM	42 \pm 2,95
10 μM	25 \pm 1,80

Z různých koncentrací 3-NP byla dále stanovena IC_{50} ($\text{IC}_{50} = 53 \mu\text{M}$) (Obr. 43)



Obrázek 43: A. Závislost aktivity na koncentraci 3-NP. B. Závislost aktivity na koncentraci 3-NP (3-NP je vyjádřena v logaritmické koncentrační řadě)

5.2.2 Stanovení inhibice flavonoidů a S-benzylisothiosemikarbazonů

U vybraných látek ze skupiny flavonoidů a S-benzylisothiosemikarbazonů byl hodnocen inhibiční vliv na enzym isocitrátlyasu, která hraje podstatnou roli v přežívání mykobakterií během latentní fáze infekce. Protože všechny dosud známé inhibitory tohoto enzymu nelze aplikovat vzhledem k jejich biotoxicitě *in vivo* (Höner zu Bentrup et al., 1999), výrazný inhibiční účinek těchto testovaných látek by mohl být podnětem pro další výzkum potenciálních antituberkulotik.

Zásobní roztoky testovaných sloučenin byly získány rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO). Reakce o celkovém objemu 100 μ l obsahovala vždy 1 μ l testované sloučeniny ve finální koncentraci 10 μ M. Všechny potenciální inhibitory byly proměřeny na mikrotitrační destičce v tetraplikátu a stanovené hodnoty byly zprůměrovány. Za stejných podmínek byla vždy při každém měření testována současně na každé destičce kyselina 3-nitropropionová (3-NP) jako endogenní kontrola v koncentraci 10 a 100 μ M. Tato kyselina sloužila zároveň jako standard, se kterým byly následně inhibitory srovnávány. Naším cílem bylo zjistit, zda je daný inhibitor silnější či slabší než 3-NP. Vzhledem k tomu, že potenciální inhibitory byly rozpuštěny v DMSO, který může ovlivňovat reakci, byla % inhibice DMSO odečítána od % inhibice zkoumaných sloučenin. U samotného DMSO v množství 1 % (1 μ l DMSO/100 μ l reakce) byla pozorována inhibice 1–3 %. U každé látky byl za stejných podmínek měřen v duplikátu i slepý vzorek (blank). Po změření destičky bylo uspořádání inhibitorů na destičce dvakrát změněno a měření bylo opakováno. Každá sloučenina tak byla změřena celkem dvanáctkrát – k měření byly použity tři destičky vždy s jiným uspořádáním inhibitorů, v rámci destičky bylo měření provedeno v tetraplikátu. Inhibiční vlastnosti sloučenin ze skupiny S-benzylisothiosemikarbazonů byly zjišťovány jak u enzymu s polyhistidinovým koncem, tak i bez něj (Tabulka 4).

Tabulka 4: Inhibiční vliv derivátů *S*-isothiosemikarbazonů na aktivitu ICL. Reakční směs (celkový objem 100 μ l) obsahovala 50 mM hydrogenufosforečnan draselný, 4 mM chlorid hořečnatý, 4 mM fenylhydrazin, 12 mM cystein 2 mM isocitrát, 10 μ M inhibitor (1 μ l, rozpuštěn v DMSO) a enzym (10 nM). Absorbance měřená čtečkou mikrotitračních destiček (Tecan) byla odečtena po 18 minutách a výsledná inhibice vyjadřuje průměr z těchto měření.

	Název sloučeniny	R ₁	R ₂	Inhibice ICL s His-Tagu v % (\pm standardní odchylka)	Inhibice ICL bez His-Tagu v % (\pm standardní odchylka)
1	Benzaldehyd - <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon	H	H	17,5 \pm 0,95	13 \pm 3,07
2	Benzaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	H	3-Cl	16,25 \pm 2,86	18,3 \pm 4,97
3	Benzaldehyd - <i>S</i> - (4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	H	4-CH ₃	24 \pm 1,85	11 \pm 3,68
4	Benzaldehyd- <i>S</i> -(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon	H	4-CF ₃	21 \pm 4,50	15 \pm 3,44
5	Benzaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	H	4-Br	26,5 \pm 2,14	20,2 \pm 3,38
6	Salicylaldehyd- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon	H	H	18 \pm 3,69	14,3 \pm 2,26
7	Salicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	H	3-Cl	20,5 \pm 4,17	20,5 \pm 4,55
8	Salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon	H	4-F	10 \pm 3,95	13,5 \pm 3,66
9	Salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	H	4-Cl	21,5 \pm 6,12	23 \pm 2,65
10	Salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	H	4-Br	23,5 \pm 2,32	27,7 \pm 3,80
11	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Cl	3-Cl	7,5 \pm 2,34	7 \pm 3,75
12	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon	5-Cl	3-OCH ₃	10 \pm 3,13	14,3 \pm 3,24
13	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Cl	4-CH ₃	16,5 \pm 2,35	15,5 \pm 5,90
14	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Cl	4-F	13 \pm 2,08	13 \pm 3,77
15	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Cl	4-Cl	7,5 \pm 5,19	9,3 \pm 2,33

16	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Br	3-Cl	10,5 ± 3,73	12 ± 4,30
17	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Br	4-CH ₃	7,5 ± 2,50	8,5 ± 3,30
18	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Br	4-CF ₃	21 ± 1,77	21,5 ± 3,38
19	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon	5-Br	4-F	21 ± 3,39	29,7 ± 2,63
20	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	5-Br	4-Br	11,7 ± 5,00	10 ± 2,85
21	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	3,5-Cl ₂	4-CH ₃	21 ± 2,88	18,7 ± 2,85
22	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon	3,5-Cl ₂	4-Cl	20,5 ± 2,31	15,5 ± 3,72
23	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon	3,5-Cl ₂	4-Br	20±1,43	11 ± 2,68
24	3,5-dibromsalicylaldehyd- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon	3,5-Br ₂	H	8 ± 3,53	8,5 ± 3,10
25	3,5-dibromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon	3,5-Br ₂	4-CH ₃	19 ± 3,31	15 ± 3,25
26	Aceton- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon		H	11 ± 1,84	12,5 ± 3,46
27	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon	3,5-Cl ₂	H	12 ± 4,36	10,5 ± 4,29

Vybrané deriváty *S*-benzylisothiosemikarbazonů ukázaly inhibiční schopnost enzymu isocitrátlyásy v rozsahu 7-29,7 %. Šest sloučenin (**5**, **7**, **9**, **10**, **18**, **19**) inhibovalo aktivitu ICL bez His-Tagu více než 20%, zatímco pouze čtyři deriváty (**11**, **15**, **17**, **24**) vykazovaly menší inhibiční schopnost než 10 %. Většina látek se tedy pohybovala v rozmezí 11-20 %. Nejvíce snižoval aktivitu ICL 5-bromsalicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon (**19**), jehož hodnota inhibice se pohybovala v podobném rozmezí jako stejně koncentrovaná kyselina 3-NP, která byla použita jako standard.

Isocitrátlyásu, u které nebyl polyhistidinový konec odstraněn, nejvíce inhiboval salicylaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon (**10**), naopak nejmenší inhibicí disponovaly 5-chlorsalicylaldehyd-*S*-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (**11**) a 5-chlorsalicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (**15**).

Rozdíly mezi mírou inhibice u enzymu s His-Tagem a bez něj byly poměrně minimální. Výraznější nerovnost se vyskytovala pouze v případě benzaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazonu (**5**) a benzaldehyd-*S*-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazonu (**4**).

Z přírodních látek, které byly testovány jako potenciální inhibitory enzymu isocitrátlyásy, nejvíce snižoval aktivitu enzymu kvercetin dihydrát (**45**), nejméně pak potlačoval aktivitu ICL 3-hydroxyflavon (**46**). Jako výraznější inhibitor se jeví také luteolin (**28**) a epigallokatechin gallát (**33**), inhibice ostatními flavonoidy se pohybovala v rozmezí 6-10 % (Tabulka 5).

Tabulka 5: Míra inhibice ICL flavonoidy. Množství vzniklého glyoxylátu bylo spektrofotometricky měřeno na čtečce mikrotitračních destiček (Tecan). Reakční směs (celkový objem 100 μ l) obsahovala 50 mM hydrogenfosforečnan draselný, 4 mM chlorid hořečnatý, 4 mM fenyldiazin, 12 mM cystein 2 mM isocitrát, 10 μ M inhibitor (1 μ l, rozpuštěn v DMSO) a enzym (10 nM). Absorbance měřená čtečkou mikrotitračních destiček (Tecan) byla odečtena po 17. minutách a výsledná inhibice vyjadřuje průměr z těchto měření.

	Sloučenina	Inhibice ICL bez His-Tagu v % (\pm standardní odchylka)
28	luteolin	16 \pm 2,22
29	katechin hydrát	7,5 \pm 1,95
30	cyanin chlorid	8,5 \pm 2,67
31	dansylhydrazine	6 \pm 3,00
32	hesperetin	10,5 \pm 3,23
33	epigallokatechin gallát	14,5 \pm 3,74
34	morin hydrát	8,5 \pm 3,38
35	floridzin dihydrát	8 \pm 1,89
36	biochanin A	13 \pm 2,80
37	2-hydroxyflavanon	9 \pm 2,61
38	chlorogenová kyselina	10,5 \pm 1,21
39	vitexin	8,5 \pm 3,89
40	4-hydroxyflavonon	8,5 \pm 2,63
41	7-hydroxyflavon	9 \pm 2,93
42	5-hydroxyflavon	8,5 \pm 2,15
43	kávová kyselina	9,5 \pm 1,91
44	naringenin	8 \pm 3,03
45	kvercetin dihydrát	19 \pm 4,16
46	3-hydroxyflavon	3,5 \pm 1,70
47	4-hydroxybenzoová kyselina	7 \pm 3,13
48	rutin hydrát	8,5 \pm 2,35

6. DISKUZE

Onemocnění tuberkulózy se vyskytuje na světě již stovky let a první úspěšné metody léčby byly objeveny až v první polovině 20. století. Vzhledem k tomu, že v poslední době byl zaznamenán výskyt multirezistentních a extensivně rezistentních kmenů na dnes používaná antituberkulotika, stává se výzvou výzkum nových antituberkulotik působících i na rezistentní druhy *Mycobacterium tuberculosis*. Současné studie se zaměřují především na hledání potenciálních cílových struktur, zejména enzymů, a průzkum přírodních látek.

Cílem této diplomové práce bylo spektrofotometricky stanovit míru inhibice rekombinantního enzymu isocitrátlyásy, který hraje nepostradatelnou roli v glyoxylátovém cyklu mykobakterií a v jejich přežívání v makrofázích během latentní fáze infekce. Jako potenciální inhibitory enzymu byly proměřovány jak syntetické látky (S-benzylisothiosemikarbazony), tak látky přírodní (flavonoidy). Jako endogenní kontrola byla použita 3-nitropropionová kyselina ve dvou různých koncentracích.

Vliv potenciálních inhibitorů na aktivitu ICL byl měřen pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Tecan) kontinuální analýzou (continuous assay). Výhodou této metody je možnost měření většího počtu inhibitorů na jedné destičce spolu s kontrolami, což zaručuje poměrně vysokou přesnost. Malá spotřeba materiálu a vyšší rychlost stanovení jsou dalšími přednostmi této analýzy. Měření na 96-jamkové destičce bylo použito pro vytvoření grafu dle Michaelis-Mentenové a určení základních kinetických parametrů. Námi stanovená Michaelisova konstanta ($K_m = 0,226 \text{ mM}$) byla o něco vyšší než K_m publikovaná v literatuře ($K_m = 0,159 \text{ mM}$; $K_m = 0,219 \text{ mM}$) (Bai et al., 2006; Ji et al., 2011). Stanovená v_{\max} ($v_{\max} = 3,069 \text{ } 3,127 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) se příliš nelišila od v_{\max} uváděné v publikacích ($v_{\max} = 2,652 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; $v_{\max} = 3,127 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Bai et al., 2006; Ji et al., 2011). Měření na 96-jamkové destičce bylo použito také pro porovnání aktivity isocitrátlyásy s His-Tagem a po jeho odštěpení. Z naměřených hodnot absorbance byla spočítána aktivita isocitrátlyásy s His-Tagem $1,46 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ při 2 mM koncentraci substrátu. Po odštěpení histidinové kotvy se aktivita enzymu zvýšila na $2,82 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Specifická aktivita ICL s His-Tagem uváděná v literatuře pro stejnou koncentraci substrátu je $1,3 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Höner zu Bentrop et al., 1999) a $2,625 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Bai et al., 2006).

3-Nitropropionová kyselina byla testována jako inhibitor ICL jak kontinuální analýzou za použití klasického spektrofotometru a čtečky Tecan, tak tzv. end-point analýzou. Kontinuální analýza prováděná na spektrofotometru je metoda poměrně časově náročná,

nevýhodou zůstává také velká spotřeba reagensů, neboť se reakční směs pipetuje do 1 ml kyvet. U end-point analýzy přetrvává problém s odhadem ukončení reakce a snadno tak dochází k měření v nelineární fázi reakce. Hodila by se proto lépe pro měření koncentrace produktu pomocí metody HPLC, která ovšem nebyla dosud publikována vzhledem k nutnosti přípravy fenylylhydrazonglyoxylátu jako standartu pro vytvoření kalibrační křivky. Dalším možným důvodem, proč HPLC metoda nebyla doposud zavedena je dostačující citlivost stanovení aktivity ICL spektrofotometrickými metodami. Kyselina 3-nitropropionová byla jako endogenní kontrola používána vždy v koncentracích 10 a 100 μM , kdy inhibovala reakci z 25 % a 72 %. V literatuře byla popsána pouze inhibice kyseliny 3-nitropropionové v koncentraci 100 μM , která činila 63,2 % (Sriram et al., 2009). IC_{50} námi vypočítaná z hodnot naměřených pro různé koncentrace kyseliny 3-nitropropionové byla 53 μM , což se neshoduje s literaturou (Sriram et al., 2011) ($\text{IC}_{50} = 116 \mu\text{M}$). Námi stanovená IC_{50} se pravděpodobně více blíží dřívější práci stejného kolektivu autorů, kde udávají, že 100 μM 3-NP inhibuje ze 63,2 %.

ICL byla připravena v expresních buňkách *E. coli* BL21(DE3) a následně purifikována za využití ionto-výměnné chromatografie, kdy polyhistidinový konec (His-Tag) proteinu reagoval s ionty Ni^{2+} navázanými na koloně. V dalším kroku byl His-Tag odštěpen pomocí proteázy trombinu. U *S*-benzylisothiosemikarbazonů byl zkoumán jejich vliv jak na ICL obsahující His-Tag, tak na enzym bez tohoto zakončení. Výraznější rozdíly v inhibici těchto dvou forem enzymů se zde nevyskytovaly, pouze benzaldehyd-*S*-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon (**3**), benzaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon (**5**) a 3,5-dichlorsalicylaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon (**25**) vykazovaly vyšší inhibiční schopnost isocitrátlyázy s His-Tagem.

Ze syntetických látek vykazovala nejvyšší procento inhibice sloučenina 5-bromsalicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon (**19**), jejíž inhibiční vlastnosti byly srovnatelné s endogenní kontrolou 3-nitropropionovou kyselinou. Námi zkoumané přírodní látky příliš vysoké procento inhibice vůči ICL bez polyhistidinového řetězce nevykazovaly, nejvyšší inhibici poukázal kvercetin dihydrát.

V rámci této práce byla na Katedře biochemických věd Faf UK v Hradci Králové zavedena metoda pro měření aktivity enzymu isocitrátlyázy a byly optimalizovány podmínky tohoto stanovení, jejichž výsledkem je jak urychlení experimentu, tak snížení spotřeby materiálu.

7. POUŽITÉ ZDROJE

ABBASI, E., NASSIRI-ASL, M., SHAFEEI, M., SHEIKHI, M. *Neuroprotective Effects of Vitexin, a Flavonoid, on Pentylentetrazole-Induced Seizure in Rats*. Chemical Biology & Drug Design, 2012, 80, s. 274-278.

AL- NUMAIR, K., CHANDRAMOHAN, G., VEERAMANI, C., ALSAIF, M. *Morin, a flavonoid, prevents lysosomal damage in experimental myocardial ischemic rats*. Journal of Medicinal Plants Research, 2012, 6 (18), s. 3445-3449.

AL-HAZZANI, A. A., ALSHATWI, A. A. *Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells*. Food and chemical toxicology, 2011, 49, s. 3281-3286.

BAI, B., XIE, J. P., YAN, J. F., WANG, H. H., HU, C. H. *A high throughput screening approach to identify isocitrate lyase inhibitors from traditional Chinese medicine sources*. Drug Development Research, 2006, 67 (10), s. 818-823.

BANDYOPADHYAY, G., BISWAS, T., ROY, K. C., MANDAL, S., PAL, B. C., BHATTACHARYA, S., RAKSHIT, S., BHATTACHARYA, D. K., CHAUDHURI, U., KONAR, A., BANDYOPADHYAY, S. *Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in chronic myelogenous leukemic cells*. Blood, 2004, 104, s. 2514- 2522.

BANERJEE, A., DUBNAU, E., QUEMARD, A., BALASUBRAMANIAN, V., UM, K. S., WILSON, T., COLLINS, D., LISLE, G., JACOBS, W. R. JR. *InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis*. Science, 1994, 263 (5144), s. 227-230.

BANERJEE, D., YOGESHWARI, P., BHAT, P., THOMAS, A., SRIVIDYA, M., SRIRAM, D. *Novel isatinyl thiosemicarbazones derivatives as potential molecule to combat HIV-TB co-infection*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46 (1), s. 106-121.

BARRY, C. E., BLANCHARD J. S. *The chemical biology of new drugs in the development for tuberculosis*. Current Opinion in Chemical Biology, 2010, 14 (4), s. 456-466.

BARTOVSKÁ, L., RANDOVÁ, A. *Kinetika enzymatických reakcí* [online], [cit. 2013-08-20]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2008. Dostupné z <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/Kin-teorie/9-EnzymovaKatalyza.pdf>

BÁRTŮ, V. *Tuberkulóza a její rezistentní formy*. Interní Medicína, 2007, 9, s. 372-373.

BÁRTŮ, V. *Tuberkulóza- infekční choroba v 21. století*. Interní Medicína, 2008, 5, s. 245-248.

BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. 1. vydání. ISBN 80-238-0297-6.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman, 2002. 5. vydání. ISBN 10: 0-7167-3051-0.

BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1-2), s. 248-254.

BURDOVÁ, M. *Isoflavony – perspektivy léčby a prevence* [online], [cit. 2013-02-05]. Dostupné z: <http://www.menoflavon.cz/lekari/04.pdf>

CALDERONE, V., CHERICONI, S., MARTINELLI, C., TESTAI, L., NARDI, A., MORELLI, I., BRESCHI, M. C., MARTINOTTI, E. *Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels*. Naunyn- Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2004, 370 (4), s. 290-298.

CUSHNIE, T., LAMB, A. J. *Antimicrobial activity of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2006, 26 (5), s. 343-356.

ČEGAN, A., KORECKÁ, L. *Obecná a potravinářská biochemie pro bakalářské studium*. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2010.

ČERMÁK, P. *Mykobakteriální infekce*, [online], [cit. 2013-08-19]. Dostupné z: http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/cermak/klinicka_mikrobiologie-TBC.pdf

DA SILVA, P. E. A., PALOMINO, J. C. *Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66 (7), s. 1417–1430.

DIXON, G. H., KORNBERG, H. L. *Assay Methods for Key Enzymes of the Glyoxylate Cycle*. Biochemical Journal, 1959, 72, s. P3.

DRŠATA, J., NETOPILOVÁ, M., MARKLOVÁ, E., BOUŠOVÁ, I. *Vybrané kapitoly z patobiochemie, II. díl*. Praha: Karolinum, 2009. 1. vydání. ISBN 978-80-246-1715-2. Enzyme Assays [online]. [cit. 2013-08-19]. Dostupné z: http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Complex_Reactions/Enzymes/Enzyme_Assays?highlight=hts+assay

Enzyme Inhibitors, [online]. [cit. 2013-08-11]. Dostupné z: <http://alevelnotes.com/Enzyme-Inhibitors/148>

FRANĚK, J. *Objeveno slabé místo mykobakterií* [online], [cit. 2012-12-01]. Dostupné z http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0900/med0900_37.html

GAITAN, E., COOKSEY, C. R., LEGAN, J., LINDSAY, H. R. *Antithyroid effects in vivo and in vitro of vitexin: a C-glucosylflavone in millet*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995, 80, s. 1144-1147.

GIACHETTI, E., VANNI, P. *Effect of Mg²⁺ and Mn²⁺ on isocitrate lyase, a non-essentially metal-ion-activated enzyme. A graphical approach for the discrimination of the model for activation*. The Biochemical Journal, 1991, 276, s. 223-230.

GOULD, A., LANGEMHEEN, H., MUÑOS-ELÍAS, E., MCKINNEY, J., SACCHETTINI, J. *Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology, 2006, 61, s. 940-947.

GREENWOOD, D., SLACK, R., PEUTHERER, J. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogenese, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. 1. vydání. ISBN 80-7169-365-0.

GU, X., ZHOU, L., DU, Q., JIANG, D., YANG, X., JI, X., YIN, K. *Hesperetin inhibits the maturation and function of monocytederived dendritic cells from patients with asthma*. Molecular Medicine Reports, 2009, 2, s. 509-513.

HANULÍK, V., SEDLÁKOVÁ, M. H., PETRŽELOVÁ, J., KOLÁŘ, M. *Možnosti fluorochinolonů v současné klinické praxi*. Klinická farmakologie a farmacie, 2010, 24 (4), s. 184-186.

HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1169-3.

High Troughput Screening [online]. [cit. 2013-08-19]. Dostupné z: <http://www.scripps.edu/florida/technologies/hts/>

HISERODT, R. D., FRANZBLAU, S. G., ROSEN, R. T. *Isolation of 6-, 8-, and 10-Gingerol from Ginger Rhizome by HPLC and Preliminary Evaluation of Inhibition of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46 (7), s. 2504-2508.

HOMOLKA, J., VOTAVA, V. *Tuberkulóza*. Praha: Karolinum, 2012. 4. vydání. ISBN 978-80-246-2070-1.

HÖNER ZU BENTRUP, K., MICZAK, A., SWENSON, D. L., RUSSELL, D. G. *Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 1999, 181 (23), s. 7161-7167.

HOROVÁ, J. *Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykobakteriálních látek*. Hradec Králové, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí diplomové práce prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

HROUDA, M. *Kvercetin na zhubnutí?* Vesmír, 1998, 77, s. 177.

CHACON, O., FENG, Z., HARRIS, N. B., CACERES, N. E., ADAMS, L. G., BARLETTA, R. G. *Mycobacterium smegmatis D-Alanine Racemase Mutants Are Not Dependent on D-Alanine for Growth*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46 (1), s. 47-54.

CHARNOCK, C., FINSRUD, T. *Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2007, 32 (6), s. 567-672.

CHEN, H. J., SHIH, C. K., HSU, H. Y., CHIANG, W. *Mast cell-dependent allergic responses are inhibited by ethanolic extract of adlay (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) testa*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (4), s. 2596–2601.

Fundacion ió [online]. [cit. 2013-08-25]. Dostupné z:
http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Mycobacterium_tuberculosis.html

JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika. Semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9.

JAHODÁŘ, L. *Léčivé rostliny v současné medicíně*. Praha: Havlíček Brain Team, 2010. 1. vydání. ISBN 978-80-87109-22-9.

JANIN, Y. L. *Antituberculosis drugs: Ten years of research*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2007, 15 (7), s. 2479–2513.

JI, L., LONG, Q., YANG, D., XIE, J. *Identification of Mannich Base as a Novel Inhibitor of Mycobacterium Tuberculosis Isocitrate by High-Throughput Screening*. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7 (3), s. 376-382.

JONG-SANG, K., CHONG-SUK, K., KUN H. S. *Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64, s. 2458-2461.

KAMERBEEK, J., SCHOOLS, L., KOLK, A., AGTERVELD, V. M., SOOLINGEN, V. D., KUIJPER, S., BUNSCHOTEN, A., MOLHUIZEN, H., SHAW, R., GOYAL, M., EMBDEN, V. J. *Simultaneous Detection and Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis for Diagnosis and Epidemiology*. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35 (4), s. 907-914.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda: Ostrava, 2003. ISBN: 978-80-86369-07-5.

KOSHIHARA, Y., NEICHI, T., MUROTA, S. I., LAO, A. N., FUJIMOTO, Y., TATSUNO, T. *Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1984, 792, s. 92-97.

KRAWIECOVÁ, L. *Výběr a optimalizace metody pro laboratorní průkaz Mycobacterium tuberculosis H37 Rv ve vzorcích sputa*. Brno, 2007. Diplomová práce. Masarykova Univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí diplomové práce RNDr. Václav Mareš.

KROYER, G. *The antioxidant activity of citrus fruit peels*. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 1986, 25 (1), s. 63-9.

KRUZLICOVÁ, D., DANIHELOVÁ, M., VEVERKA, M. *Quantitative structure-antioxidant activity relationship of quercetin and its new synthesized derivatives*. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 2012, 11 (1), s. 37-44.

KUMAR, R., BHAKUNI, V. *Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyase (MtbIcl): Role of divalent cations in modulation of functional and structural properties*. *Proteins*, 2008, 72, s. 892-900.

KUMAR, R., SANYAL S. *Mycobacterium tuberculosis: Dormancy, Persistence and Survival in the Light of Protein Synthesis*. *Understanding Tuberculosis-Deciphering the Secret Life of the Bacilli* [online], [cit. 2013-07-20]. Dostupné z: Mycobacterium tuberculosis: Dormancy, Persistence and Survival in the Light of Protein Synthesis

LACHNER, D., GIBBONS, S., BUCAR, F. *Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in Mycobacterium*, *Phytochemistry Letters*, 2008, 1, s. 71-78.

LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny. 1. díl*. Praha: Karolinum, 2009. 2. vydání. ISBN 978-80-246-1414-4.

LEE, M. Y., LIN, H. Y., CHENG, F., CHIANG, W., KUO, Y. H. *Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (Coixlachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) bran*. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46 (6), s. 1933-1939.

Lineweaver Burk plots comparing competitive and non-competitive inhibition to that with no inhibition, [online]. [cit. 2013-08-11]. Dostupné z: http://learning.covcollege.ac.uk/content/Jorum/MET_Enzyme-inhibition_LM-1.2/page52.htm

LIU, L., SHAN, S., ZHANG, K., NING, Q. Z., LU, P. X., CHENG, Y. Y. *Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from Citrus aurantium up-regulate transcription of adiponectin*. *Phytotherapy Research*, 2008, 22, s. 1400-1403.

- MAHAPATRA, A., MATIVANDLELA, S. P., BINNEMAN, B., FOURIE, P. B., HAMILTON, C. J., MEYER, J. J., VAN DER KOOY, F., HOUGHTON, P., LALL, N. *Activity of 7-methyljuglone derivatives against Mycobacterium tuberculosis and as subversive substrates for mycothiol disulfide reductase*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15 (24), s. 7638-7646.
- MANJUNATHA, U., BOSHOFF, H. I. M., BARRY, C. E. *The mechanism of action of PA-824. Novel insights from transcriptional profilig*. *Communicative & Integrative Biology*, 2009, 2 (3), s. 215-218.
- MASON, G. F. *The Occurrence of Benzoic Acid Naturally in Cranberries*. *Journal of The American Chemical Society*, 1905, 27 (5), s. 613-614.
- MENEZRS-DE-LIMA, O., HENRIQUES, M. *Mechanisms of Cell Accumulation Induced by Mycobacterium bovis BCG* [online], [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://www.bioline.org.br/request?oc97193>
- Microbiology in Picture [online], [cit. 2013-08-25]. Dostupné z: <http://www.microbiologyinpictures.com/mycobacterium%20tuberculosis.html>
- MUÑOS-ELÍAS, E., UPTON, A., CHERIAN, J., MCKINNEY, J. *Role of the methylcitrate cycle in Mycobacterium tuberculosis metabolism, intracellular growth, and virulence*. *Molecular Microbiology*, 2006, 60, s. 1109-1122.
- NAGAPRASHANTHA, L. D., VATSYAYAN, R., SINGHAL, J., LELSANI, P., PROKAI, L., AWASTHI, S., SINGHAL, S. S. *2'-hydroxyflavanone inhibits proliferation, tumor vascularization and promotes normal differentiation in VHL-mutant renal cell carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2011, 32 (4), s. 568-575.
- NAJAFIAN, M., JAHROMI, M. Z., NOWROZNEJHAD, M. J., KHAJEAIAN, P., KARGAR, M. M., SADEGHI, M., ARASTEH, A. *Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Molecular Biologic Reports*, 2012, 39, s. 5299- 5306.
- NETVAL, M. et al. *Mimoplicní tuberkulóza*. Praha: Grada, 2004. 1. vydání. ISBN 80-247-0654-7.
- NGUY, S., K`UNG, Z., AHMAD, S., MOKADDAS, E., VINŠOVÁ, J., KRÁTKÝ, M. *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments*. New York: Nova Publishers, 2009. ISBN 978-1608760558.
- PARICHATIKANOND, W., PINTHONG, D., MANGMOOL, S. *Blockade of the renin-angiotensin system with delphinidin, cyanin, and quercetin*. *Planta Medica*, 2012, 78, s. 1626-1632.
- PARISH, T., BROWN A. *Mycobacterium Genomics and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. ISBN 978-1-904455-40-0.

PAVLÍČEK, O. *Technika sekvenční injekční analýzy s lab-on-valve modulem (SIA-LOV) v analýze biologicky aktivních látek*. Hradec Králové, 2012. Disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Vedoucí disertační práce Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L., STOLAŘÍKOVÁ, J. *New S-benzylisothiosemicarbazones with antimycobacterial activity*. *Folia Microbiologica*, 2011, 56 (1), s. 10-12.

POKORNÝ, A., MERTA, Z., SALAJKA, F. *Tuberkulóza*. Brno: Masarykova Univerzita, 1998. 1. vydání. ISBN 80-210-1851-8.

PROTIVOVÁ, V. *Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin*. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecké fakulta. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Jaroslava Dubová, CSc.

PUGAZHENDHI, D., POPE, G. S., DARBRE, P. D. *Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines*. *Journal of Applied Toxicology*, 2005, 25 (4), s. 301-309.

RACEK, J., EISELT, J., FRIEDECKÝ, B., HOLEČEK, V., NEKULOVÁ, M., PITTROVÁ, H., RUŠAVÝ, Z., SENFT, V., ŠAVLOVÁ, M., TĚŠÍNSKÝ, P., VERNER, M. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.

RADULOVIĆ, N., STOJANOVIĆ, G., PALIĆ, R. *Composition and Antimicrobial Activity of Equisetum arvense L. Essentials oil*. *Phytotherapy research*, 2006, 20 (1), s. 85-88.

SEO, W. G., PAE, H. O., CHAI, K. Y., ZUN, Y. G., KWON, T. H., CHUNG, H. T. *Inhibitory effects of methanol extract of seeds of Job's tears (Coix lachryma-jobi L. var. mayuen) on nitric oxide and superoxide production in RAW 264.7 macrophages*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2000, 22 (3), s. 545-554.

SHARMA, V., SHARMA S., HÖNER ZU BENTRUP, K., MCKINNEY, J. D., RUSSEL, D. G., JACOBS, W. R. Jr., SACHCETTINI, J. C. *Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Structural Biology*, 2000, 7 (8), s. 663- 668.

SHI, R., ITAGAKI, N., SUGAWARA, I. *Overview of anti-tuberculosis drugs and their resistance mechanisms*. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 2007, 7 (11), s. 1177-1185.

SHIN, S. Y., KIM, J. H., LEE, J. H., LIM, Y., LEE, Y. H. *2'-Hydroxyflavanone induces apoptosis through Egr-1 involving expression of Bax, p21, and NAG-1 in colon cancer cells*. *Molecular nutrition & food research*, 2012, 56 (5), s. 761-774.

SCHÄGGER, H., JAGOW, V. G. *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Analytical Biochemistry, 1987, 166 (2), s. 368-379.

SRIRAM, D., YOGESHWARI, P., METHUKU, S., VYAS, D. R., SENTHILKUMAR, P., ALVALA, M., JEANKUMAR, V. U. *Synthesis of various 3-nitropropionamides as Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyase inhibitor*. Bioorganic & Medicinal Letters, 2011, 21 (18), s. 5149-5154.

SRIRAM, D., YOGESHWARI, P., SENTHILKUMAR, P., DEWAKAR, S., ROHIT, N., DEBJANI, B., BHAT, P., VEUGOPAL, B., PAVAN, B. B., THIMMAPPA, H. M. *Novel phthalazinyl derivatives: synthesis, antimycobacterial activities, and inhibition of Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyase enzyme*. Medicinal Chemistry, 2009, 5 (5), s. 422-433.

STRATIL, P. *ABC zdravé výživy*. 2. díl. Brno, 1993. 1. vydání. ISBN 80-900029-8-6.

ÚZIS. *Výskyt tuberkulózy v České republice v roce 2011* [online], [cit. 2012-11-6]. Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2012, 35. Dostupné z: http://www.uzis.cz/system/files/35_12.pdf

VAQUERO, M. J. R., ALBERTO, M. R., DE NADRA, M. C. M. *Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines*. Food Control, 2007, 18 (2), s. 93-101.

VAUZOUR, D., VAFEIADOU, K., RODRIGUEZ-MATEOS, A., RENDEIRO, C., SPENCER, J. P. E. *The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects*. Genes & Nutrition, 2008, 3 (3-4), s. 115-126.

VOLF, K., ANDRS, F. *Flavonoidy a jejich biologické působení* [online], [cit. 2012-23-01]. Dostupné z: <http://www.juwital.cz/flavonoidy.aspx>

VOSS DE, J. J., RUTTER, K., SCHROEDER, B. G., SU, H., ZHU, Y., BARRY, C. E. *The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth of macrophages*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2000, 97 (3), s. 1252-1257.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 1. vydání. ISBN 80-902896-6-5.

WANG, L., LEE, I. M., ZHANG, S. M., BLUMBERG, J. B., BURING, J. E., SESSO, H. D. *Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 89 (3), s. 905-912.

WATERHOUSE, A. L. *Wine Phenolics*. Annals of the New York Academy of Science, 2002, 957, s. 221-36.

WAYNE, L. G., LIN, K. I. *Glyoxylate metabolism and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to survival under anaerobic conditions*. Infection and Immunity, 1982, 37 (3), s. 1042-1049.

WHO. *Global Tuberculosis Report 2012* [online], [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: www.who.int/tb

YAHIA, B., R., BRYCHTA, T., BRYCHTOVÁ, S., LICHNOVSKÁ, R., STEJSKAL, P. *Thiazolidindiony, PPAR receptory a metabolický syndrom*. Praha: Galén, 2008. 1. vydání. ISBN 978-80-7262-543-7.

YAO, L., JIANG, Y., SINGANUSONG, R., DATTA, N., RAYMONT, K. *Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication*. Food Chemistry, 2004, 86 (2), s. 169-177.

YOSHIDA, H., WATANABE, V., OOMAGARI, H., TSURUTA, E., SHIDA, M., KUROKAWA, M. *Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes*. The Journal of Nutritional Biochemistry [online], [cit. 2013-02-05]. Dostupné z: <http://www.jnutbio.com/article/PIIS0955286312002720/abstract>

YUE-XIU, S., SHANG-JUN, Y., SANGHO, O., ZHI-JIANG, W., SEN, Y., LI, Y., JUN-MO, Y., YONG-DOO, P., JINHYUK, L., GUO-YING, Q. *An Integrated Study of Tyrosinase Inhibition by Rutin: Progress using a Computational Simulation*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2012, 5, s. 999-1012.

ZHANG, Y. M., ROCK, C.O. *Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase*. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279, s. 30994–31001.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mykobakteriální buněčná stěna	15
Obrázek 2: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Obrázek 3: Glyoxylátový cyklus u MT	19
Obrázek 4: Cyklus kyseliny citronové u MT	20
Obrázek 5: Úkol isocitrátlyásy v glyoxylátovém cyklu	21
Obrázek 6: Struktura monomeru mykobakteriální ICL	22
Obrázek 7: Obecné struktury novějších inhibitorů isocitrátlyásy	23
Obrázek 8: Isoniazid.....	24
Obrázek 9: Rifampicin	24
Obrázek 10: Streptomycin.....	25
Obrázek 11: Pyrazinamid	25
Obrázek 12: Ethambutol.....	25
Obrázek 13: Ethionamid.....	25
Obrázek 14: D-cykloserin	26
Obrázek 15: Kyselina para-aminosalicylová.....	26
Obrázek 16: Amikacin	26
Obrázek 17: Kapreomycin	26
Obrázek 18: Ciprofloxacin	27
Obrázek 19: Moxifloxacin	27
Obrázek 20: TMC207.....	27
Obrázek 21: OPC6768	28
Obrázek 22: PA-824.....	28
Obrázek 23: Linezolid.....	28
Obrázek 24: SQ109	28
Obrázek 25: Flavonový skelet.....	30
Obrázek 26: Kvercetin, morin a rutin.....	32
Obrázek 27: Strukturní vzorce vybraných flavonů	33
Obrázek 28: Strukturní vzorce vybraných flavanonů.....	35
Obrázek 29: Strukturní vzorec cyanin chloridu	35
Obrázek 30: Biochanin A	36
Obrázek 31: Strukturní vzorce vybraných katechinů	37

Obrázek 32: Strukturní vzorce kyseliny kávové a chlorogenové jakožto zástupců derivátů kyseliny hydroxykoičové	38
Obrázek 33: Strukturní vzorec 4-hydroxybenzoové kyseliny	38
Obrázek 34: Floridzin dihydrát	39
Obrázek 35: Struktura <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazonů	39
Obrázek 36: Úloha enzymu při přeměně substrátu na produkt	41
Obrázek 37: Jednosubstrátová reakce	42
Obrázek 38: Závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu	43
Obrázek 39: pEt-28a-c(+).....	57
Obrázek 40: SDS-PAGE elektroforéza isocitrátlyásy	59
Obrázek 41: Stanovení koncentrace bílkoviny dle Bradfordové.....	60
Obrázek 42: Graf Michaelis-Mentenové.....	61
Obrázek 43: Závislost aktivity na koncentraci 3-NP	62

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Antimykobakteriální aktivita S-benzylisothiosemikarbazonů	40
Tabulka 2: Podmínky štěpení His-Tagu z isocitrátlyásy	58
Tabulka 3: Procentuální inhibice koncentrační řady kyseliny 3-nitropropionové	62
Tabulka 4: Inhibiční vliv derivátů S-isothiosemikarbazonů	64
Tabulka 5: Míra inhibice ICL flavonoidy	67