

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**Zavedení metody MST pro studium interakcí mezi biomolekulami**

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Josef Krátký

Prohlášení:

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

V Hradci Králové

.....

Josef Krátký

## Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucí své diplomové práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, ale hlavně za neutuchající podporu a velkou trpělivost a vždy podnětné a přínosné rady. Dále bych chtěl poděkovat všem zaměstnancům katedry biochemických věd za ochotu mi pomoci při plnění práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Josef Krátký

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Zavedení metody MST pro studium interakcí mezi biomolekulami

Termoforéza v mikroměřítku (MST) je v současné době uznávanou metodou při studiu interakcí mezi biomolekulami, pomocí usměrněného pohybu biomolekul v teplotním gradientu je možné analyzovat prakticky jakékoliv interakce, kde dochází ke změně vlastností analytů. Tato práce byla zaměřena na zavedení metody pro studium interakcí proteinů s nízkomolekulárními látkami se zaměřením na ověření možnosti využití MST pro sledování interakce glutathion-S-transferasy (GST) s vybranými terpeny ((-)-fenchon, (-)-isopulegol, (+)-isomenthon, (-)-karvon, (+)-karvon, piperiton a thujon). Dalším cílem bylo stanovení vlastností terpenů pomocí klasických spektrofluorimetrických metod a MST. V práci bylo zjištěno spektrofluorimetrickými metodami, že terpeny ovlivňují fluorescenční spektra pro lidský sérový albumin a že neovlivňují fluorescenční spektrum pro barvivo NHS, které je využíváno pro přípravu vzorků pro MST. Dále byla v práci stanovena aktivita GST a bylo studováno její ovlivnění pomocí monoterpenů. GST po přidání terpenů vykazuje nižší aktivitu. Metodou MST pak bylo zjištěno, že veškeré použité monoterpeny ovlivňují fluorescenční spektrum pro GST, pomocí MST byla dále ověřena vazba pro jednotlivé terpeny s GST a jednotlivé komplexy byly podrobeny studiu afinity a byly u nich stanoveny disociační konstanty, které se dle výsledků řádově lišily od pM u (-)-karvonu ( $K_d = 785 \text{ pM}$ ) až do  $\mu\text{M}$  u piperitonu ( $K_d = 4,1 \mu\text{M}$ ). Z dosažených výsledků je vidět, že použití metody MST je vhodné pro inhibiční studie GST.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Josef Krátký

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Introduction of the MST method for the study of interactions between biomolecules

MicroScale thermophoresis (MST) is currently a recognized method for studying interactions between biomolecules; the method is using directed movement of biomolecules in a temperature gradient, which allows to analyze practically all interactions where changes in analyte properties are possible. This thesis was focused on introduction of the MST method for research of protein interactions with low molecular weight substances focusing on verifying the possibility of using MST in monitoring the interaction of glutathione S-transferase (GST) with selected terpenes ((-)-fenchone, (-)-isopulegone, (+)-isomenthone, (-)-carvone, (+)-carvone, piperitone, and thujone). Another aim was to determinate the properties of terpenes by classical spectrofluorimetric methods and MST. Using spectrofluorimetric methods it was found that terpenes affect the fluorescence of human serum albumin, and they do not affect the fluorescence spectrum of the dye NHS, which is used as a dye for samples for MST. Next part of experimental work was to determine activity of GST, and to find out if monoterpenes affect the GST activity. GST shows lower activity after the addition of terpenes. The MST method determined that all used monoterpenes affected the fluorescence spectrum of GST. Using MST method was verified the binding of terpenes with GST, and then the complexes were subjected to affinity studies and dissociation constants were determined. Obtained values of dissociation constants differed from pM in (-)-carvone ( $K_d=785$  pM) to  $\mu$ M in piperitone ( $K_d=4,1$   $\mu$ M). The results show that the use of the MST method is suitable for future GST inhibition studies.

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Současný stav .....	9
2.1	Termoforéza v mikroskopickém měřítku .....	9
2.1.1	Termoforéza.....	9
2.1.2	Využití fluorescence .....	9
2.1.3	Termoforéza v mikroskopickém měřítku .....	10
2.1.4	Princip MST technologie .....	11
2.1.5	Teoretické základy MST.....	13
2.1.6	Aplikace termoforézy v mikroskopickém měřítku .....	14
2.2	Biotransformace xenobiotik .....	15
2.2.1	Biotransformační enzymy.....	15
2.2.2	Glutathion-S-transferasy .....	16
2.3	Terpeny .....	20
2.3.1	Vybraní zástupci terpenů .....	22
3	Cíl práce .....	27
4	Experimentální část .....	28
4.1	Použitý biologický materiál, chemikálie a vybavení.....	28
4.1.1	Chemikálie, reagensie.....	28
4.1.2	Použité roztoky .....	29
4.1.3	Technické vybavení .....	30
4.2	Metodika .....	31
4.2.1	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy.....	31
4.2.2	Spektroskopické metody .....	31
4.2.3	Příprava vzorku pro analýzu metodou MST.....	32
4.2.4	MST metody .....	33
5	Výsledky.....	37

5.1	Stanovení inhibice glutathion-S-transferasy.....	37
5.2	Stanovení vlastností terpenů spektrofotometrickými metodami .....	38
5.2.1	Reakce terpenů s lidským sérovým albuminem .....	38
5.2.2	Reakce terpenů s barvivem RED-NHS.....	42
5.3	Stanovení vazby biomolekul pomocí MST .....	46
5.3.1	Kontrola vazby Glutathion-S-transferasy s terpeny.....	46
5.3.2	Stanovení vazebné afinity Glutathion-S-transferasy s terpeny.....	52
6	Diskuze.....	58
7	Závěr.....	61
8	Seznam použitých zkratk.....	62
9	Seznam použité literatury .....	63
10	Seznam použitých obrázků.....	70
11	Seznam použitých tabulek.....	73

# 1 Úvod

S rozvojem znalostí v oblasti biomolekulárních interakcí došlo také k potřebě účelné a rychlé kvantifikace těchto reakcí. Jedním z trendů poslední dekády v tomto směru je MST (z anglického *MicroScale Thermoforesis*), tedy mikroskopická termoforéza či termoforéza v mikroměřítku. Fenomén termoforézy je znám od poloviny 19. století. Základním principem metody je usměrněný pohyb molekul v regulovaném teplotním gradientu, jehož vlastnosti se dají silně ovlivnit i minimální změnou molekulárních vlastností analyzovaných látek (náboj, konformace), díky tomuto MST umožňuje přesnou kvantifikaci molekulárních událostí u širokého spektra vzorků. Pomocí infračerveného laseru dochází k přesně lokalizované indukci teplotního gradientu v rozmezí 4 °C a následné detekci a kvantifikaci pomocí fluoroforů a to jak vnitřních, tak kovalentně navázaných.

Pomocí této metody je možné zjišťovat afinitu širokého spektra biomolekul, a to včetně DNA, RNA, peptidů či iontů. Dále je možné sledovat interakce mezi vysokomolekulárními komplexy, ale také viry či nanočásticemi, či další vlastnosti analytů- agregaci, absorpci, homogenitu a stabilitu vzorků. Mezi další výhody oproti standardně používaným metodám patří nízká spotřeba reagensů a vzorků – pouze v jednotkách mikrolitrů a nízká časová náročnost s rychlými výstupy z experimentu při dostatečné robustnosti. Nejenom z těchto důvodů jsou MST analýzy v současnosti na vzestupu a vstupují čím dál více do popředí v oblasti studia biomolekulárních interakcí.

V této práci jsou v teoretické části shrnuty literární údaje o MST, dále o transformaci xenobiotik se zaměřením na enzymy glutathin-S-transferasy (GST) a o terpenech s popisem terpenů- karvon, isopulegol, piperiton, thujon, fenchon a isomenthon, které byly následně využity v praktické části. Hlavní náplní praktické části diplomové práce byla analýza interakce GST s terpeny pomocí MST, dále příprava vzorku pro analýzu, či studium zhášení HSA, či barviva NHS pomocí terpenů.



## 2 Současný stav

### 2.1 Termoforéza v mikroskopickém měřítku

#### 2.1.1 Termoforéza

Termoforéza, známá také jako tepelná difúze, termodifúze, nebo Soretův jev, je fyzikální jev odpovídající přímému pohybu molekul vyvolanému teplotním gradientem, typicky se jedná o pohyb ze zóny tepla do studené zóny, tento jev se nazývá jako pozitivní termodifúze, negativní termodifúze definuje opačný jev. (1)

Pozitivní termoforéza v kapalných směsích byla objevena Carlem Ludwigem v polovině 19. století, následně byla detailněji zkoumána a popsána Charlesem Sorettem v roce 1897. Termoforéza mezi plyny byla poprvé pozorována Johnem Tyndallem a popsána Johnem Struttem také v 19. století. Termoforéza na rozhraní pevných látek byla popsána až na začátku 21. století. Negativní termoforéza v tekutinách byla zaznamenána v druhé polovině 20. století, negativní termoforéza na rozhraní pevných látek byla pozorována a analyzována v roce 2016. (1; 2; 3)

Od objevení termoforézy byla s oblibou používána v anorganické chemii a pro separaci polymerů. Na začátku 21. století byla uvedena Deiterm Braunem a Albertem Libchaberem (2002) termoforetická difúze DNA s kvantifikovanou konstantou tepelné difúze, a to pomocí fluorescenčních barviv a laserového ohřevu analytu, což byl nový přístup pro použití termoforézy při studiu biomolekul. Následně Filip Reineck dokázal při studiu jednořetězcové DNA v mikroskopickém měřítku, že kapilára s průměrem 50  $\mu\text{m}$ , je dostatečně spolehlivá jako mikrofluidní prostředí pro optické zkoumání elektroforézy v roztoku, a tím vytvořil základ pro kvantitativní analýzu pomocí termoforézy. Následně v oblasti vazebných studií byla zavedena termoforéza v mikroskopickém měřítku (Microscale thermophoresis, MST), byla vyvinuta pro účelné řešení překážek jako je stabilita a specifická značení u jednotlivých bílkovin. (1; 4; 5; 6)

#### 2.1.2 Využití fluorescence

Fluorescenční molekuly se používají v biologických vědách ke sledování a analyzování molekulárních interakcí, techniky založené na fluorescenci se staly neocenitelné pro analýzu kvantitativních biologických procesů. Tyto techniky umožňují nejenom vizualizaci, ale také lokalizaci proteinů v jednotlivých buňkách pomocí rozmanitého množství mikroskopických technik, ale také se používají *in vitro* ke stanovení biofyzikálních parametrů u molekulárních procesů (rovnovážné vazebné konstanty, kinetické vlastnosti enzymů či termodynamika a

mechanismy skládání proteinů). V poslední době se podařilo objasnit velké množství biomolekulárních funkcí z důvodu rostoucího počtu fluorescenčních technik *in vitro*. Fluorescence může být detekována různými způsoby, a to v závislosti na vlastnostech zkoumaného systému – zhášení fluorescence či fluorescenční korelační spektroskopie. (7)

U MST je termoforetický pohyb detekován pomocí fluorescence jednoho z vazebných partnerů, ta pochází buďto z fluorescenčního značení, nebo z fluorescenčního fúzního proteinu, či se využívá produkce vnitřní fluorescence, pokud by barvivo mohlo výrazněji interagovat s analytem. Pro proteiny se nejčastěji používá značení reaktivní skupiny. Mezi nejpoužívanější fluorescenční barvivo patří N-hydroxysukcinimid-1-hydroxypyrrolidin-2,5-dion (NHS). Estery NHS reagují s primárními aminy lysinových postranních řetězců, nebo na N konci proteinu, také se mohou vázat na guanidinovou skupinu u argininu. Další možností je maleimidové barvivo, které se váže na sulfhydrylové skupiny. (7; 8)

### 2.1.3 Termoforéza v mikroskopickém měřítku

Mikroskopická termoforéza – MST (z anglického *Microscale Thermophoresis*) je výkonná technika využívající se pro kvantifikaci biomolekulárních interakcí. Je definována jako metoda monitorování změny intenzity fluorescence u molekul v mikroskopickém teplotním gradientu – TRIC (z anglického *temperature related intensity change*), který silně závisí na různých molekulárních vlastnostech, jako je velikost, náboj, hydratační obal nebo konformace. Tím pádem je tato technika vysoce citlivá na prakticky jakoukoliv změnu molekulárních vlastností, což umožňuje přesnou kvantifikaci molekulárních změn nezávisle na velikosti nebo povaze vyšetřovaného vzorku. (1; 7)

Během MST experimentu je teplotní gradient indukovaný infračerveným laserem, a to pouze v několika mikrolitrech vzorku. Což je jedna z výhod oproti jiným analytickým technikám založeným na fluorescenci, mezi další výhody patří jednoduchost přípravy vzorků a obecně nízké objemy všech použitých reagentů. Ve standardním MST je jeden z vazebných partnerů fluorescenčně značen, nicméně je možnost pracovat také s neoznačenými vzorky (využívá se vlastní fluorescence proteinů obsahujících tryptofanové zbytky). Navíc metoda MST překonává některé technické překážky pro běžné nefluorescenční techniky. MST nabízí systém bez imobilizace ve srovnání s rezonancí povrchového plasmonu (SPR, z anglického *surface plasmon resonance*), při jehož použití je potřeba navázat povrchový ligand. Oproti metodě ITC (z anglického *isothermal titration calorimetry*) dochází ke spotřebě nižšího objemu

vzorků, a to bez ohledu na čas a manuální náročnost celého postupu. Další výhodou je možnost použití prakticky jakéhokoliv pufru, krevní plazmy, či lyzátu buněk. Další výhodou metody je bezkontaktnost s analyzátozem, měření probíhá vždy v jednorázových kapilárách, tím dochází pouze k minimální kontaminaci vzorků mechanickými nečistotami. Nejenom z těchto důvodů je MST považováno za univerzálně použitelný, robustní a rychlý způsob detekce molekulárních interakcí. (1; 7; 8)

#### 2.1.4 Princip MST technologie

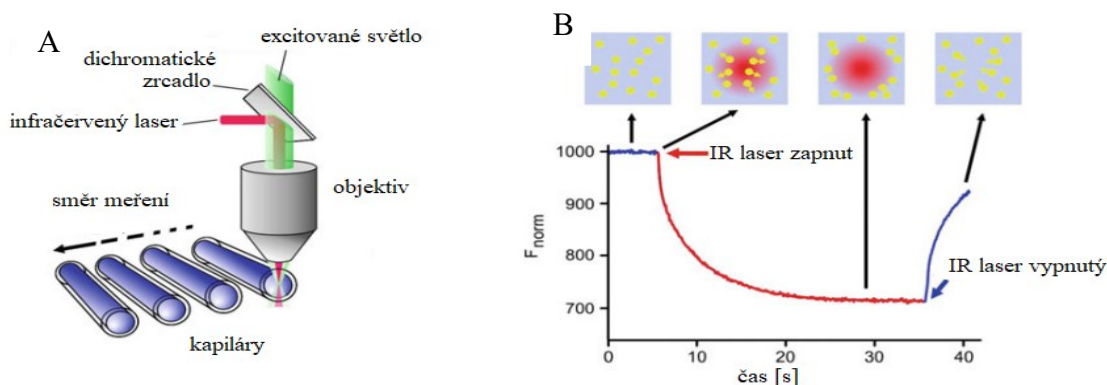
Mikroskopická termoforéza je optická metoda k charakterizaci vlastností biomolekul. V přístroji Monolith NT.115 (obr.1). MST se používá viditelné světlo pro spouštění excitace fluorescence a emise. Přístroj kombinuje tři druhy LED filtrů a to modrý (excitace 460-480 nm, emise 515-530 nm), zelený (excitace 515-525 nm, emise 560-585 nm) a červený filtr (excitace 605-645 nm, emise 680-685 nm). V přístroji Monolith NT.LabelFree je nastavena excitační vlnová délka 280 nm a emise na 360 nm, existuje i detekce viditelným světlem s rozsahem vlnových délek 480 - 720nm, který se používá pro detekci vnitřní fluorescence proteinů. (7; 9)



Obrázek 1. Přístroj Monolith NT.115, převzato z (7)

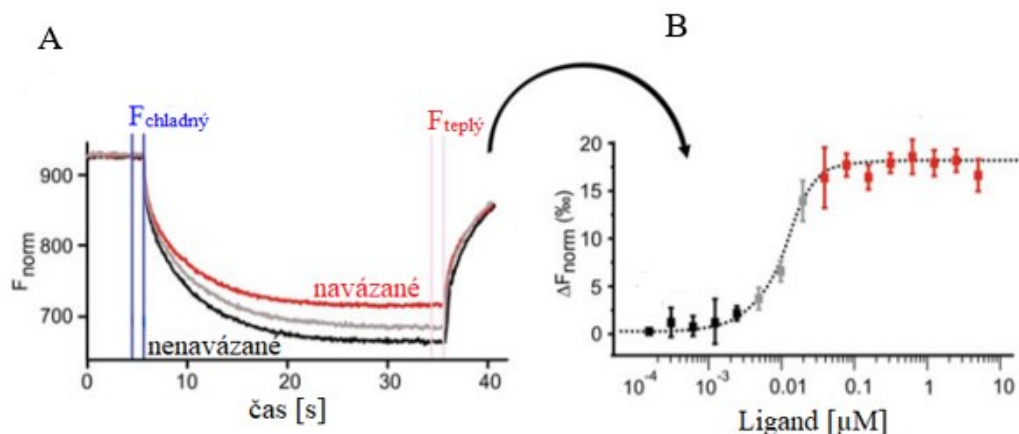
Přístroj Monolith NT.115 využívá infračervený paprsek (IR) laseru s emisní vlnovou délkou 1480 nm a dichromatickým zrcadlem, tento paprsek je zaostřen objektivem do kapiláry. Následně je IR záření absorbováno vodou v použitém pufru ve vzorku, a tím dojde k vytvoření teplotního gradientu. V tuto chvíli jsou fluorofory v roztoku excitovány a emitovány, fluorescence je sbírána stejným objektivem jako infračervené záření (viz obrázek 2 A). Toto nastavení umožňuje sledovat termoforézu závislou na vyčerpání/akumulaci fluoroforů v rámci

teplotního gradientu, který je indukován infračerveným laserem. Na obrázku 1 B je vidět typický průběh MST. V první fázi trvající 5 sekund je detekována iniciační fluorescence, která je konstantní pro všechny molekuly, které jsou rozmístěny v kapilárách. Ve chvíli, kdy je zapnut IR laser, nastává „T-jump“, který je přímo úměrný změně fluoroforových vlastností u molekul, tyto změny nastávají v důsledku tepelné změny. Doba zaznamenávání změny fluorescence je 30 sekund. Po vypnutí laseru, dochází k druhému „T-jumpu“, kdy jsou molekuly distribuovány zpět pomocí negativní difúze do celé kapiláry. (7; 9)



Obrázek 2. A, schéma objektivu v MST; B, typický signál MST, převzato z (9)

Obrázek 3 ukazuje 2 na sobě závislé výstupy, které jsou typické pro metodu měření vazebné afinity přístrojem MST. V části A je znázorněna změna termoforézy –  $\Delta F_{\text{norm}}$ , což je poměr hodnot fluorescence mezi definovanými oblastmi –  $F_{\text{teplý}}/F_{\text{chladný}}$ . Dalším jevem, který je na tomto výstupu patrný, je rozdíl u termoforézy mezi volnými fluorescenčními molekulami (znázorněno černou křivkou) a molekulami s navázaným ligandem (červená křivka). V případě, že ligand nevykazuje žádnou fluorescenci, je na základně titrace fluorescenčních molekul tímto ligandem a změnou fluorescence v tepelném gradientu sestrojen výstup, který udává závislost změny fluorescence na zvolené koncentraci ligandu. Z křivky je následně vypočtena disociační konstanta  $K_a$ , která vyjadřuje afinitu proteinu ke zvolenému ligandu – obrázek 3 část B. (7; 9)



Obrázek 3. Výstup z MST vyjadřující závislost fluorescence na čase, jednotlivé křivky znázorňují změnu fluorescence na titraci proteinu ligandem. Část B vyjadřuje změnu fluorescence ku koncentraci ligandu, převzato z (9)

Koherentní laserové zařízení lze jednoduše zaostřit, proto dochází k velmi dobře lokalizovanému teplotnímu rozdílu  $\Delta T$  v rozmezí 2-6 °C v prostoru o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , v závislosti na výkonu infračerveného laseru a druhu kapilár. Kapacita MST přístroje je až 16 vzorků, které je možné opakovaně použít, objem v jedné kapiláře je 20  $\mu\text{l}$ , kapiláry jsou vyrobené z čistého skla a jsou potažené z vnitřní strany hydrofobními nebo hydrofilními polymery, aby nedocházelo k adsorpci na stěny kapilár. Rozměry těchto kapilár jsou přesně definované a vnitřní odchylka nesmí být větší než 1  $\mu\text{m}$  z důvodu vysoké reprodukovatelnosti teplotních přechodů. Speciální kapiláry pro MST (NanoTemper Technologies) jsou ošetřeny tak, aby měly homogenní povrch, a tím slabý signál na pozadí. (1; 7; 9; 8)

### 2.1.5 Teoretické základy MST

Termoforéza je molekulární tok, který je přímo úměrný teplotnímu gradientu s konstantou proporcionality  $D_T$ , koeficient tepelné difúze je možné vyjádřit jako:

$$j = -cD_r \cdot \text{grad } T$$

Kdy  $j$ - molekulární tok;  $c$ - molární koncentrace;  $D_r$ - teplotní difúzní koeficient;  $T$ - teplota

V rovnovážném stavu je termoforéza kompenzována hromadnou difúzí vyjádřenou vztahem.

$$j = -D \cdot \text{grad } C$$

$D$ - difúzní koeficient

Na základě těchto dvou vztahů byl definován Soretův koeficient  $S_T$ , který udává termoforeticky indukovanou změnu koncentrace

$$S_T = D/D_T$$

Z tohoto vztahu je odvozen další, který popisuje poměr koncentrací za ustálených podmínek

$$\frac{c_{hot}}{c_{cold}} = \exp(-S_T \Delta T)$$

Kde  $c_{hot}$ - molekulární koncentrace v teplé zóně;  $c_{cold}$ - molekulární koncentrace v chladné zóně

Úbytek částic v teplotně exponované oblasti je přímo závislý na rozhraní mezi molekulami a rozpouštědly. Za podmínky konstantních vlastností pufru, náboje, entropie solvatace a konformace a velikosti molekul, kdy mohou vazebné události ovlivnit minimálně jeden z výše uvedených parametrů, je možné použít termoforézu pro kvantifikaci afinity. (1; 8)

#### 2.1.6 Aplikace termoforézy v mikroskopickém měřítku

Využití MST lze rozdělit do dvou základních skupin - proteinové interakce a interakce nukleových kyselin. Využití MST v interakcích protein-protein je pestré - charakterizace cílené imunoafinity mezi lidskými protilátkami, nebo ke kvantifikaci interakcí autoimunitních protilátek (proti  $\beta 1$ - adrenergním receptorům) a peptidovému antigenu, který je možné léčivo pro léčbu dilatační kardiomyopatie, dále se používá k určení role proteinů, které se podílí na iniciaci či průběhu tvorby karcinomů. (1; 4)

V sekci interakce ligandů obsahující malé molekuly, které reagují s proteiny, patří mezi hlavní směry analýza drog a jejich vliv na konkrétní enzymy, dále vliv kovů na biologické procesy - konkrétně vliv sloučenin olova na identifikaci sloučenin aktivující glukocerebrosidázy (enzym účastnící se degradace glykosfingolipidů). Další studie se týkají terapeutické protilátky bevacizumab a jeho schopnosti na rozbití agregovaných proteinů. Posledním velkým okruhem je studium přírodních látek jako potenciálních inhibitorů, či induktorů enzymatické aktivity. Další možností je také sledování interakcí mezi enzymy a ionty kovů, např. zkoumání interakce mezi oxalát oxidázou a  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  v různém pH a studium inhibičních vlastností těchto kovů. (1; 10)

MST se využívá ovšem i v interakci nukleových kyselin, termoforetické účinky DNA/RNA byly studovány již v začátcích MST experimentů. Pomocí této metody došlo k charakterizaci snoRNA (z anglického *small nucleolar RNA*), či k určení proteinu spojeného s chromatinem a známého jako dekonzenzační faktor 31 (Df31), dále byly zkoumány přímé interakce mezi snoRNA a Df31 jako mediátoru chromatinu vyššího řádu. (1; 11)

## 2.2 Biotransformace xenobiotik

Látky vstupující do organismu mohou mít fyziologickou funkci a nazývají se eobiotika (voda, minerální látky, živiny či vitamíny), tyto látky slouží jako zdroj energie a pro tvorbu vlastních sloučenin organismu. Naopak xenobiotika (*xenos* – cizí, *bios* - život) jsou sloučeniny, které jsou cizí živému organismu, neslouží jako zdroj energie, ani pro výstavbu endogenních látek. Mezi hlavní xenobiotika patří látky syntetického původu: léky, karcinogeny a látky, které byly do prostředí zavedeny jako nežádoucí produkty průmyslu, i látky přírodní např. aflatoxiny, botulotoxiny, tetrodotoxiny, terpeny, alkaloidy či látky, které se zneužívají jako návykové látky – kokain, kanabinoidy, kofein a mnohé další. (12)

Každé xenobiotikum, ať už je přijaté záměrně či nechtěně, představuje pro organismus potenciální zátěž a nebezpečí. Proto mají organismy vyvinuté systémy, kterými xenobiotika metabolizují. Bez metabolismu by mnoho xenobiotik v organismu dosáhlo toxických koncentrací. Metabolické aktivity vedoucí k biotransformaci xenobiotik v buňce vyžadují energii, enzymy a kofaktory. Enzymy, které metabolizují xenobiotika, dělíme na enzymy I. fáze, II. fáze a transportní proteiny. (12; 13)

### 2.2.1 Biotransformační enzymy

Enzymy první fáze biotransformace katalyzují oxidační, redukční či hydrolytické reakce. V aerobních vyšších organismech je velké množství xenobiotik přeměňováno oxidační cestou. Redukční biotransformační reakce jsou méně časté než oxidační. Dominantní úlohu mezi oxidoredukčními enzymy první fáze zastávají cytochromy P450. Hydrolytické reakce jsou katalyzovány různými více či méně specifickými hydrolasami.

Druhou fází biotransformace představují reakce konjugační, při kterých xenobiotikum nebo konverzí vzniklý metabolit I. fáze reaguje s endogenní sloučeninou. Vzniklé konjugáty

jsou většinou hydrofilnější a snadněji eliminovatelné z organismu, také dochází k snížení biologické aktivity a toxicity. Konjugačních reakcí je řada typů. Rozhodující je přítomnost funkčních skupin ve struktuře xenobiotika. Konjugační reakce katalyzují různé transferasy. Jsou to převážně enzymy cytosolické nebo mikrosomální a vyskytují se téměř ve všech orgánech a tkáních. U člověka jsou nejběžnější konjugace s kyselinou glukuronovou, sulfonace, acetylace, methylace, konjugace s aminokyselinami a konjugace s glutathionem pomocí glukuronosyltransferas, sulfotransferas, acetyltransferas, methyltransferas a glutathion-S-transferas, které jsou podrobněji rozebrány níže. (12; 13)

## 2.2.2 Glutathion-S-transferasy

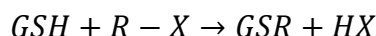
### 2.2.2.1 Charakterizace GST

Glutathion-S-transferasy (GST) (EC. 2.5.1.18.) byly identifikovány v roce 1961 z potkaních jater a následně byly nalezeny ve většině živých organismů. Původní název GST-ligandin odkazuje na schopnost vázat toxické látky a zároveň fungovat jako transportní protein. GST patří do třídy enzymů transferas (EC 2), transferasy katalyzují přenos atomů z jedné molekuly na druhou (donor-akceptor). Tímto mechanismem účinku katalyzují velké množství biochemických reakcí. Nomenklatura u všech nadrodin GST je stejná jako u cytochromů P450, enzymy jsou řazeny do rodin a podrodin podle aminokyselinové sekvence. (14; 15; 16)

GST patří mezi detoxikační enzymy druhé fáze biotransformace, jsou schopné detoxikovat jak endogenní, tak exogenní látky. Hlavní funkcí glutathiontransferasy označované také jako glutathion-S-transferasy je schopnost katalyzovat konjugaci glutathionu (GSH) na řadu elektrofilních sloučenin. Díky pokrokům v molekulární biologii byla poodhalena širší role těchto enzymů, např. účast při biosyntéze a při metabolismu u prostaglandinů, steroidů, leukotrienů, regulují také intracelulární transport dalších hormonů. Dále hrají klíčovou roli v boji proti karcinogenům, ale také při získávání rezistence na chemoterapeutika, podílejí se i na regulaci a odstraňování toxických produktů oxidace lipidů a S-glutathiolovaných proteinů, které jsou produkovány při oxidačním stresu. Některé izoenzymy GST modulují buněčné signální dráhy, které kontrolují buněčnou proliferaci a buněčnou smrt (apoptózu). (17; 18; 19; 20)



Schéma reakce katalyzované glutathion-S-transferasou (21):



Glutathion-S-transferasy se dělí do třech nadrodin, nejčastější zastoupení má cytosolická nadrodina, jsou ale popsány i enzymy z mikrosomální a mitochondriální nadrodiny. U člověka rozlišujeme dvě strukturně odlišné nadrodiny GST, a to cytosolickou (GST) a mikrosomální (MGST, nebo jako zkratka z *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism* MAPEG). Cytosolické GST vykazují shodu v rámci třídy více než 40 % v aminokyselinové sekvenci, naopak homologie mezi třídami je maximálně do 25 %. GST se dle podobnosti v aminokyselinové sekvenci dělí do třinácti tříd a to alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), zéta ( $\zeta$ ), théta ( $\theta$ ), mí ( $\mu$ ), ný ( $\nu$ ), sigma ( $\sigma$ ), tau ( $\tau$ ), pí ( $\pi$ ), a omega ( $\omega$ ). U lidí se ale vyskytují pouze třídy alfa, zéta, théta, mí, pí, sigma a omega. První třída byla objevena v roce 1993, naopak poslední (skupina ný) v roce 2005. Cytosolická GST je schopná tvořit dimery, stejnou vlastnost má i mitochondriální GST. Byly identifikovány heterodimery, které obsahují řetězce patřící do stejné skupiny. (18; 22; 12)

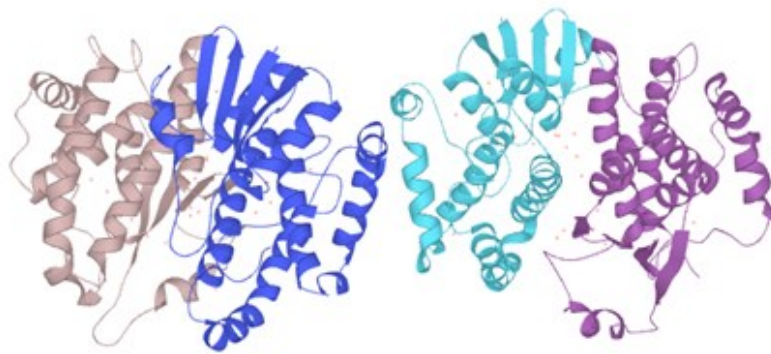
Mitochondriální GST obsahuje třídu kappa ( $\kappa$ ), která se nachází i v peroxisomech. Nadrodina MAPEG se skládá z čtyř podskupin (I-IV), tyto podskupiny mají shodu v proteinové sekvenci menší než 20 %. U lidí bylo identifikováno 6 izoenzymů, které patří do skupin I, II a IV. (22; 12)

Cytosolické GST (rozpustné) a MAPEG jsou široce distribuovány v lidském těle, nachází se v játrech, ledvinách, mozku, slinivce břišní, varlatech, srdci, plicích, tenkém střevě, kosterní svalovině, ale i v prostatě či slezině a placentě, u některých savčích orgánů mohou GST tvořit až 10 % ze všech intracelulárních proteinů. (16; 12)

#### 2.2.2.2 Struktura GST

Většina GST je složena z několika podjednotek. Každá podjednotka se skládá přibližně z 200-245 aminokyselin a molekulová hmotnost podjednotky se pohybuje od 22-29 kDa. Každá podjednotka obsahuje katalyticky nezávislé aktivní místo-GSH-vazebné místo („G-místo“), které se nachází na N-koncové doméně, tato doména je podobná thioredoxinu (s topologií  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ). Na C koncové doméně složené z  $\alpha$ -šroubovice se nachází místo vázající hydrofobní substráty („H-místo“). Takto popsaná struktura byla určena z enzymu třídy  $\pi$  (pGSTP1-1) a obsahuje typické rysy členů cytosolické nadrodiny GST a slouží jako srovnávací bod s jinými

izoenzymy (obr. 4). Je známo 16 lidských genů, které jsou lokalizované na více chromozomech (např. 1p13, 22q11, 14q24 a 6p12) a kódují cytosolické GST. Mitochondriální GST obsahují také doménu podobnou thioredoxinu, ale s vloženou  $\alpha$ -helikální doménou mezi  $\alpha$ 2-helix a  $\beta$ 3-vlákno. (18; 22; 23; 12)



Obrázek 4.. Krystalografická struktura GST, 2,68 Å, převzato z (24)

Všechny proteiny z nadrodiny MAPEG jsou levotočivé, obsahují čtyři  $\alpha$ -šroubovice (TM1-TM4), které jsou sestavené do struktury trimerů se spirálovitými svazky, které jsou kolmo orientovány k rovině membrány (obr. 5). Topologicky je nápadná shoda s podjednotkou I ba3 cytochrom c oxidasy. GSH se může vázat na třech vazebných místech, která jsou umístěna proximálně k cytoplasmatické straně. Za produkci MAPEG mohou tři geny, které se nachází na různých chromozomech (12p12, 1q23 a 4q28). (19; 9)



Obrázek 5. Krystalografická struktura mGST, 1,90 Å, převzato z: (25)

### 2.2.2.3 GST substráty, inhibitory a induktory

Jednotlivé nadrodiny GST nemají příliš odlišnou substrátovou specifíčnost, substrátem pro GST mohou být všechny sloučeniny, které jsou schopné reagovat s thiolovou částí glutathionu. Nejčastěji se jedná o elektrofilní sloučeniny jako epoxidy, estery, peroxidy či  $\alpha,\beta$ -nenasyčené ketony. Ale již byly popsány i specifické substráty pro určitou isoformu GST. Do této kategorie patří např. *trans*-stilbenoxid, který je diagnostickým substrátem pro GST-M1, nebo kyselina ethakrynová, která je specifickým substrátem pro GST-P1, či methylenchlorid, který je velmi dobře konjugován pomocí GST-T1. V současné době se jako „univerzální substrát“ používá CDNB (1-chlor-2,4-dinitrobenzen). Ovšem enzymy třídy théta nevykazují afinitu k tomuto substrátu. (16; 12; 26)

V současné době je známo také velké množství inhibitorů GST, a to jak endogenního, tak exogenního původu např. fenoly, deriváty vitamínu C, dopamin,  $\alpha$ -methyldopa, chinony, nitrobenzoxadioly, pyridinové deriváty, flavonoidy či bilirubin. Bylo zjištěno, že GST jsou inhibovány také deriváty glutathionu. (16; 27)

Některá xenobiotika či léčiva mají schopnost zvýšit aktivitu GST, důvodem je indukce exprese GST, určité formy GST obsahují v promotoru responzivní elementy EpRE (*electrophile RE*) nebo ARE (*antioxidant responsive element*). Extrakty z *Gingo biloba* indukují GST-P1 a zvýšení aktivity GST u člověka, mezi další extrakty, které indukují GST,

lze zařadit výtažky z grapefruitů či z brukvovité zeleniny. Indukční účinek vykazují také barbituráty. (12; 28; 29)

Mezi faktory, které významně ovlivňují aktivitu GST, patří genetický polymorfismus. V třídách, alfa, mí, pí a théta bylo identifikováno několik typů alelických variací. Jedinci bez GST-M1, GST-T1, GST-P1 mají vyšší výskyt karcinomu močového měchýře, prsu, rakoviny plic, při ztrátě těchto genů se zvyšuje náchylnost k astma bronchiale, či alergickým onemocněním. (30)

V této práci byla použita rekombinantní GST ze *Schistosoma japonicum*, která má molekulovou hmotnost 26,98 kDa. Tato GST se používá jako antigen k produkci nebo purifikaci, další možností je využití jako pozitivní kontrola při testech aktivity GST a při screeningových testech inhibitorů. (31)

## 2.3 Terpeny

Rostliny produkují velké množství sekundárních metabolitů, velké množství z nich je, a historicky bylo, využíváno pro svoje účinky. Terpeny tvoří velkou skupinu sekundárních metabolitů. Terpeny jsou složeny primárně z uhlíku a vodíku, které se skládají do izoprenové jednotky –  $C_5H_8$ . Některé terpeny, např. menthol, mají ve své struktuře zabudovaný i kyslík. Význam terpenů pro rostliny je velký, ovlivňují růst rostlin, mají protektivní funkci před živočichy a patogeny, nebo naopak fungují jako lákadla pro opylovače. Terpeny lze dělit dvojím způsobem, a to dle počtu izoprenových jednotek (tabulka 1) nebo dle funkčních chemických skupin (tabulka 2). Terpeny v rostlinách mohou vznikat pomocí dvou drah - mevalonátové a methylerythritol fosfátové dráhy. (32; 33)

Terpeny jsou využívány už od dob starověku. Využití terpenů je různorodé, používají se jako přídavek do potravin a nápojů, mýdel, parfémů, éterických olejů, které se často používají jako léčivo. Také se používají v zemědělství a v chemickém průmyslu. (33)

Tabulka 1. Dělení terpenů na základě počtu izoprenových jednotek, převzato z (33)

<b>Sumární vzorec</b>	<b>Název</b>
C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	Hemiterpeny
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Monoterpeny
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Seskviterpeny
C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	Diterpeny
C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>	Sesterpeny
C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>	Triterpeny
C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	Tetraterpeny

Tabulka 2. Dělení terpenů na základě chemických vlastností a příklady, převzato z (33)

<b>Chemické vlastnosti</b>	<b>Příklad terpenu</b>
Uhlovodíky	Limonen
Alkoholy	Geraniol
Estery	Linalylacetát
Aldehydy	Geranial
Ketony	Carvon
Fenoly	Eugenol
Ethery	Cineol
Peroxidy	Askaridol

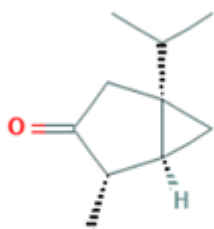
## 2.3.1 Vybraní zástupci terpenů

### 2.3.1.1 Thujon

Thujon ( $C_{10}H_{16}O$ ) patří mezi monoterpenketony, přirozeně se vyskytuje ve dvou epimerních formách a to levotočivý  $\alpha$ -(-)-thujon a pravotočivý  $\beta$ -(-)-thujon, rozdíl mezi nimi je pouze v orientaci methylové skupiny. Molární hmotnost thujonu je 152,23 g/mol, hustota 0,92 g/cm<sup>3</sup> a teplota varu 201 °C. Thujon obsahuje tři chirální atomy uhlíku. Je rozpustný v ethanolu a chloroformu, naopak není rozpustný ve vodě. (34; 35)

Thujon je kompetitivní antagonist receptorů GABAA, inhibicí aktivace GABA receptorů dochází ke svalovým křečím až zástavě dechu. Proto je thujon považován za neurotoxický jed. Letální dávka u  $\alpha$ -(-)-thujonu (aktivnější z obou izomerů) je 45 mg/kg s 0 % úmrtností při 30 mg/kg a 100 % při 60 mg/kg. Při studiu na myších nastávala smrt u vyšších dávek do 1 minuty. (36; 37)

Thujon má zastoupení ve velkém množství rostlin, jako např. v čeledi cypřišovitě. Dále se vyskytuje například v jalovci obecném (*Juniperus communis L.*), oreganu (*Origanum vulgare*), šalvěji luční (*Salvia pratensis*) či pelyňku pravém (*Artemisia absinthium*) a mátě pepřné (*Mentha piperita*). Používá se v parfumerii jako součást éterických olejů, či jako potravní doplněk stravy (řádově mg/kg). Ve známost vstoupil thujon hlavně jako součást nápoje Absintu. Právě thujon byl považován za hlavní problematickou složku v tomto nápoji, protože hlavní složkou byl pelyněk pravý (*A. absinthium*), který obsahuje právě thujon. Na přelomu 19. a 20. století se předpokládalo, že obsah thujonu v nápoji je 260-350 mg/l. V současné době byl tento názor vyvrácen rozsáhlými studiemi. Při studii v roce 2008 byly analyzovány lahve z přelomu 19. a 20. století a byl zjištěn průměrný obsah thujonu 25,4 mg/l nápoje, přičemž v žádné lahvi nebyl obsah vyšší než 50 mg/l. (37; 38; 39)

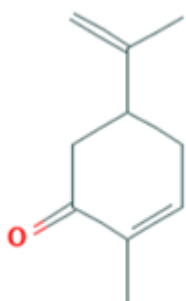


Obrázek 6. Chemická struktura thujonu, převzato z (35)

### 2.3.1.2 Karvon

Karvon ( $C_{10}H_{14}O$ ) patří mezi p-mentanové monoterpenoidy, což jsou těkavé sekundární metabolity, které byly nalezeny v rostlinné říši. Molární hmotnost karvonu je 150,22 g/mol, hustota  $0,96 \text{ g/cm}^3$  a teplota varu  $231 \text{ }^\circ\text{C}$ . Karvon tvoří 2 enantiomery R a L-(-)-karvon, který má nasládlou mátovou vůni, naopak S a D-(+)-karvon má vůni po žitě. V tomto ohledu je zajímavé, že člověk vnímá dva odlišné enantiomery rozdílnou vůní, svědčí to o tom, že čichové receptory musí obsahovat chirální skupiny, což ovlivňuje schopnost silněji reagovat na určité enantiomery. (40; 41; 42)

V přírodě nacházíme karvon například v mátě peprné (*Mentha piperita*), kmínu kořeném (*Carum carvi*), či v blahovičnicku kulatoplodém (*Eucalyptus globulus*) a koprů vonném (*Anethum graveolens*). V průmyslu je karvon dominantní složkou komerčně důležitých éterických olejů, obsah karvonu v těchto olejích je od 30 do 60 %, používá se do osvěžovačů vzduchu, velký význam má také v alternativní medicíně, kde se mu přikládá relaxační účinek. U S-(+)-karvonu byl prokázán účinek proti obezitě u myši, která byla vyvolána stravou s vysokým obsahem tuku. (43; 41)

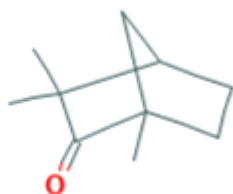


Obrázek 7. Chemická struktura karvonu, převzato z (40)

### 2.3.1.3 Fenchon

Fenchon ( $C_{10}H_{16}O$ ) je organická sloučenina klasifikovaná jako monoterpenketon, je to bezbarvá olejovitá kapalina, která vykazuje podobnou strukturu jako kafr. Molární hmotnost pro fenchon je 152,23 g/mol, hustota  $0,948 \text{ g/cm}^3$  a teplota varu  $193,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vyskytuje se v přírodě ve formě dvou enantiomerů. (+)-fenchon se nachází v oleji ze semen fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) a v oleji z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*). (-)-fenchon je složkou v oleji z listů zeravu západního (*Thuja occidentalis*). (44; 45)

Využití fenchonu je různorodé, ať už v potravinářském průmyslu např. jako součást absintu, či jako potravní dochucovadlo. Jako většina monoterpenů se používá také v parfumerii. Fenchon vykazuje protizánětlivou a antimikrobiální aktivitu, proto je možné využívat oleje pro léčbu kožních ran. Silice z fenyklu obecného se používají v přírodní medicíně pro léčbu dýchacích onemocnění. (45; 46)

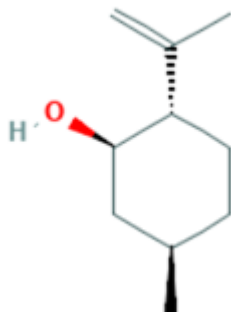


Obrázek 8. Chemická struktura fenchonu, převzato z (44)

#### 2.3.1.4 Isopulegol

Molární hmotnost (-)-isopulegolu, který se řadí mezi monocyklické monoterpeny, je 154,25 g/mol, hustota 0,912 g/cm<sup>3</sup>, teplota varu je 212 °C. Isopulegol se vyskytuje ve dvou stereoisomerech jako (-)-isopulegol (levotočivý) a (+)-isopulegol (pravotočivý). (47; 48)

(-)-Isopulegol se přirozeně vyskytuje v přírodě v rostlinách jako: korymbie citroníková (*Corymbia citriodora*), žlutodřev vínobobovitý (*Zanthoxylum schinifolium*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) a eukalyptus citrónový (*Eukalyptus citriodora*). Všechny tyto uvedené rostliny s obsahem (-)-isopulegolu mají silné protizánětlivé a antifungální účinky, což je důvod proč se éterické oleje používají v medicíně, navíc éterický olej z eukalyptu má také centrální a periferní analgetický účinek. (47; 48)



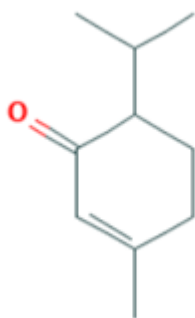
Obrázek 9. Chemická struktura isopulegolu, převzato z (47)



### 2.3.1.5 Piperiton

Piperiton ( $C_{10}H_{16}O$ ) řadíme mezi přírodní monoterpenketony. Hustota piperitonu je  $0,933 \text{ g/cm}^3$ , molární hmotnost  $152,23 \text{ g/mol}$  a bod varu je mezi  $232\text{-}233 \text{ }^\circ\text{C}$ , což je nejvyšší hodnota z vybraných terpenů. Jsou známé dva stereoizomery (+)-piperion a (-)-piperiton. (49)

Výskyt v rostlinách se liší podle toho, o jaký stereoizomer se jedná. (-)-Piperiton se nachází např. v smrku sitka (*Picea sitchensis*), (+)-piperiton má větší zastoupení a vyskytuje se v rostlinách rodů *Andropogon* a *Mentha*, tato forma má aroma podobné mátě peprné (*Mentha piperita*). Průmyslové využití je kromě éterických olejů také ve výrobě syntetického mentolu, kde je to základní surovinou. Piperiton byl také nalezen v červeném víně a ovlivňuje vůni u zrajících vín. (49; 50)

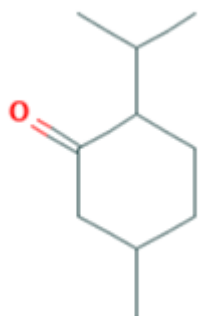


Obrázek 10. Chemická struktura piperitonu, převzato z (49)

### 2.3.1.6 Isomenthon

Menthon má dvě asymetrická uhlíková centra, z toho důvodu může mít čtyři různé stereoizomery, stereoizomery v cis konformaci se nazývají isomenthony. Je zřejmá strukturální podobnost s mentolem, který má ovšem místo karbonylu sekundární alkohol. Molární hmotnost menthonu je  $154,253 \text{ g/mol}$ , hustota  $0,933 \text{ g/cm}^3$  a teplota varu  $207 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jedná se o bezbarvou kapalinu s mátovou vůní. (51; 52)

Menthon se v přírodě vyskytuje v mnoha druzích máty (*Mentha*) či v rodu *Pelargonium*. Je ovšem možné ho syntetizovat oxidací mentholu. Jako všechny zde uvedené terpeny se používá ve formě éterických olejů, které mají antimikrobiální a analgetické účinky, dále se využívají v kosmetice nejčastěji jako přísada do parfémů pro svoji vůni. (53)



Obrázek 11. Chemická struktura menthonu, převzato z (51)

### 3 Cíl práce

Cílem práce bylo zavedení metody MST pro studium interakcí proteinů s nízkomolekulárními látkami a ověření vhodnosti této metody pro sledování interakce glutathion-S-transferasy s vybranými terpeny ((-)-isopulegol, (+)-isomenthon, (-)-karvon, (+)-karvon, thujon, piperiton, (-)-fenchon).

Díličními cíli bylo:

Literární rešerše shrnující aktuální poznatky o MST

Stanovení aktivity GST a ovlivnění její aktivity monoterpeny

Stanovení vlastností terpenů spektroskopickými metodami – spektrofluorimetrií a MST

- Sledování interakce lidského sérového albuminu (HSA) s terpeny
- Interakce barviva NHS s terpeny
- Příprava vzorku GST pro metodu MST (výměna pufru, značení barvivem NHS)
- Kontrola vazby GST s terpeny metodou MST
- Studium afinity a stanovení disociační konstanty GST a terpenů metodou MST

Posouzení vhodnosti MST pro inhibiční studie s GST

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použitý biologický materiál, chemikálie a vybavení

#### 4.1.1 Chemikálie, reagensie

(-)-Karvon- Extrasynthese

(+)-Karvon- Extrasynthese

(-)-Fenchon- Extrasynthese

(-)-Isopulegol- Extrasynthese

(+)-Isomenthon- Extrasynthese

Alpha-(-)-Thujon- Extrasynthese

Piperiton- Extrasynthese

1-chloro-2,4-dinitrobenzen- CDNB- Sigma Aldrich

Dimethylsulfoxid- DMSO- Sigma Aldrich

Ethanol- Sigma Aldrich

Glutathion-S-transferasa ze *Schistosoma japonicum*, rekombinantní- GST-  
kategorie Z02039-GenScript

*Human serum albumin*- HSA- Sigma-Aldrich

Tween 20- NanoTerpen

Pluronic F-127- NanoTerpen

RED-N-Hydroxysuccinimide (RED-NHS)- NanoTemper

#### 4.1.2 Použité roztoky

Na-fosfátový pufr- 0,1 M, pH 6,5; 1,79 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O – do 50 ml doplněno redestilovanou vodou; 1,56 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O – do 100 ml doplněno redestilovanou vodou; obě složky byly smíchány v poměru 1:3, pH upraveno na 6,5

PBS- 0,1 M, pH 6,5; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 3,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 10 H<sub>2</sub>O; 0,272 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do 1000 ml doplněno redestilovanou vodou, následně pH upraveno pomocí HCl

Roztok CDNB- 51,5 mM CDNB v ethanolu; 5,22 mg CDNB rozpuštěno v 0,5 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O

Roztok GSH- 5,15 mM GST v 0,1 M Na-fosfátovém pufru; 7,92 mg GSH rozpuštěno v 5ml 0,1 M Na-fosfátovém pufru-pH 6,5

Roztok HSA - 4·10<sup>-6</sup> M v Na-fosfátovém pufru, 2,6 mg HSA rozpuštěno v 1 ml 0,1 M Na-fosfátovém pufru-pH 6,5

Roztok GST – 10 μM v Na-fosfátovém pufru, 1 mg GST rozpuštěn v 3,8 ml Na-fosfátového pufru

Pro přípravu zásobních roztoků terpenů o koncentraci 4·10<sup>-5</sup> M bylo použito množství uvedené v tabulce 3 a doplněno DMSO na objem 1 ml

*Tabulka 3. Objem terpenů pro přípravu 1 ml 4·10<sup>-5</sup> M roztoku*

<b>Terpen</b>	<b>Objem [μl]</b>
(-)-isopulegol	6,76
(+)-isomenthon	6,89
(-)-karvon	6,26
(+)-karvon	6,26
thujon	6,65
piperiton	6,53
(-)-fenchon	6,42

#### 4.1.3 Technické vybavení

- Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Německo)
- Magnetická míchačka RSM-10 B (PHOENIX instrument, Německo)
- Minicentrifuga (Benchmark, USA)
- Monolith NT.115 Series (Nanotemper, Německo)
- PH metr pH/mV/Ion/Temp Meter (Boeco, Německo)
- Spektrofluorimetr Perkin-Elmer LS 50 B (PerkinElmer, USA)
- Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)
- Termostat ThermoHaake P5 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Třepačka MS2 Minishaker (Marshall Scientific, USA)
- Váhy Scaltec SBC (SCALTEC, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Unimed, Česká republika)
- Membránová vakuová pumpa KNF UN840 (KNF group, Německo)
- Centrifuga-Biofuge stratus Heraeus (ThermoFisher Scientific, Německo)

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Stanovení aktivity glutation-S-transferasy

Pro stanovení aktivity GST byla modifikována metoda dle Ye and Zhang (2001) (54). Měření aktivity GST je založeno na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrophenylglutathionu (GSH-CDNB) pomocí specifického substrátu 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) a konjugačního činidla redukovaného glutathionu (GSH). Pomocí Lambert-Beerova zákona lze ze změny absorbance kvantitativně vyjádřit aktivitu GST. Jako inhibitory byly použity terpeny rozpuštěné v DMSO.

Absorbance byla měřena na spektrofotometru Tecan Infinite M200, byl nastaven příslušný program, který měří absorbanci 6krát v minutových intervalech. Byla zvolena destička Greiner s plochým dnem. Do jamek byly napipetovány 2  $\mu\text{l}$  DMSO (kontrola) nebo 2  $\mu\text{l}$   $1,3 \cdot 10^{-5}$  M terpenu (pro stanovení inhibice), do všech jamek bylo následně přidáno 192  $\mu\text{l}$  reakční směsi (2 ml GSH, 0,2 ml CDNB a 7,8 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru) a reakce byla odstartována přidávkem 6  $\mu\text{l}$  GST o ředění 2,5x (ve slepém vzorku byl místo GST použit 0,1 M Na-fosfátový pufr-pH 6,5). Výška roztoku v jamce byla 0,8 cm. Vzorky byly protřepány a vloženy na analýzu do přístroje Tecan, kde proběhlo měření absorbance. Aktivita GST byla vypočítána ze změny absorbance za 1 minutu s použitím extinkčního koeficientu ( $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) při 340 nm. Specifická aktivita je vyjádřena jako počet jednotek U / mg proteinu.

### 4.2.2 Spektroskopické metody

#### 4.2.2.1 Stanovení reakce lidského sérového albuminu s terpeny

Pro měření byla použita metoda standardního přidavku, tato metoda byla modifikována dle Trnková (2012) (55). Reakční směs obsahovala 10  $\mu\text{l}$  HSA o koncentraci  $4 \cdot 10^{-6}$  M v 0,1 M Na-fosfátovém pufru a 100  $\mu\text{l}$  zvoleného terpenu (isopulegol, isomenthon, fenchon, (-)-karvon, (+)-karvon, piperiton, thujon) o jedné z následných koncentrací  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M,  $2,6 \cdot 10^{-5}$  M a  $4 \cdot 10^{-5}$  M rozpuštěné v DMSO, poměr HSA/terpeny byl vždy 1:10, takto připravená směs byla inkubována po dobu 5 minut při 37 °C. Byla sledována vnitřní fluorescence tryptofanu v molekule HSA. Pro měření byl použit spektrofluorimetr Perkin-Elmer LS 50 B, emisní spektra byla měřena v intervalu 300-550 nm při 37 °C za neustálého míchání v kyvetě. Excitace

byla nastavena na základě vlastností tryptofanu na 295 nm. Na doplnění objemu do 1 ml byl použit 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 6,5. Veškerá měření probíhala v duplikátech.

#### 4.2.2.2 Stanovení reakce RED-N-Hydroxysuccinimide barviva s terpeny

Pro ověření eventuálního zhášení barviva RED-NHS druhé generace pomocí terpenů byla upravena metoda z kapitoly 4.2.2.1. 10  $\mu$ l Barviva RED-HNS bylo rozpuštěno v 25  $\mu$ l DMSO, finální koncentrace zásobního roztoku barviva byla 600  $\mu$ M. Poměr mezi barvivem a terpeny byl 1:5. Dále byl postup stejný dle 4.2.2.1., pouze HSA byl nahrazen barvivem RED-NHS druhé generace. Veškerá měření probíhala v duplikátech.

#### 4.2.3 Příprava vzorku pro analýzu metodou MST

Microscale thermophoresis (termoforéza v mikroměřítku, MST) prováděná pomocí přístroje Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Mnichov, Německo) je vysoce citlivá technika založená na Soretově efektu, která umožňuje kvantitativní analýzu molekulárních interakcí v roztoku v mikrolitrovém měřítku. Vazebné konstanty lze určit např. pro interakce protein-protein, protein-DNA a protein-malá molekula.

Pro přípravu vzorku byl použit komerčně dodávaný kit „Monolith Protein Labeling RED-NHS 2nd Generation“, který je optimalizovaný na proteiny s molekulární hmotností vyšší než 5 kDa. Tento kit obsahuje: barvivo RED-NHS druhé generace, pufr NHS pro značení, kolonu A, kolonu B a adaptér na kolonu B.

##### 4.2.3.1 Výměna pufru ve vzorku proteinu

Pro výměnu pufru ze vzorku GST (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ l v 0,1 M Na-fosfátovém pufru pH 6,5) byla použita kolona A, společně s pufrem NHS pro značení (pufr z kitu byl rozpuštěn v 3 ml destilované vody, konečné pH je 8,2-8,3 při laboratorní teplotě).

Po několikanásobném protřepání kolony A byla otevřena a odstraněna zátka, kolona byla umístěna do mikrozkuhavky a byla centrifugována při 1500 g po dobu 1 minuty, čímž došlo k odstranění roztoku v koloně. Následně byla kolona dána do čisté mikrozkuhavky a bylo přidáno 300  $\mu$ l pufru NHS pro značení pro ekvilibraci kolony A. Takto připravená kolona



byla centrifugována při 1500 g po dobu 1 minuty, vždy po centrifugaci byl vyhozen proteklý pufr. Tento krok následně opakujeme třikrát.

Po ekvilibraci byla kolona dána do čisté mikrozkušavky. Následně bylo na kolonu pipetováno 100  $\mu$ l 10  $\mu$ M vzorku proteinu a proběhla centrifugace při 1500 g po dobu 2 minut. Protein protekl kolonou do mikrozkušavky.

#### 4.2.3.2 Značení proteinu fluorescenčním barvivem

Nejprve bylo smícháno 7  $\mu$ l barviva RED-NHS druhé generace rozpuštěného v DMSO s 7  $\mu$ l pufru HNS pro značení (získali jsme 300  $\mu$ M barvicí roztok). V čisté mikrozkušavce bylo smícháno 10  $\mu$ l 300  $\mu$ M barvicího roztoku s 90  $\mu$ l 10  $\mu$ M vzorku proteinu. Takto připravený vzorek byl inkubován po dobu 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

V době, kdy byl vzorek inkubován, byla ekvilibrována kolona B; doba ekvilibrace byla cca 15-20 minut. Z kolony B byly odstraněny zátky a byla umístěna pomocí adaptéru do 15 ml zkušavky. Kolona byla promývána cca 2-2,5 ml pufru volby (pro GST byl vybrán 0,1 M PBS pH 6,5), kolona byla promyta pouze pomocí gravitace, tento krok byl třikrát opakován. Celková spotřeba pufru v tomto kroku byla cca 8-10 ml. V případě, že ekvilibrace byla dokončena dříve než inkubace, byly nasazeny zpět zátky, aby nedošlo k vyschnutí již ekvilibrované kolony B.

#### 4.2.3.3 Odstranění přebytečného volného barviva z proteinu

Na kolonu B bylo pipetováno 100  $\mu$ l obarveného proteinu, ten se nechal vsáknout do kolony, následně bylo přidáno 550  $\mu$ l ekvilibračního pufru volby-PBS. Po protečení 550  $\mu$ l pufru s přebytečným barvivem (cca 5 minut) zůstává protein zachycen na koloně a je připraven k eluci. Kolonu dáme do čisté mikrozkušavky. Pro eluci proteinu bylo přidáno 450  $\mu$ l pufru PBS, tímto postupem bylo získáno 450  $\mu$ l obarvené GST o finální koncentraci 2  $\mu$ M. Takto připravený vzorek byl rozdělen na alikvoty - 100  $\mu$ l a uskladněn při  $-80$  °C.

#### 4.2.4 MST metody

Veškeré metody byly provedeny v programu MO.Control v 1.6.1. K analýze byly celou dobu používány kapiláry typu Monolith NT. 115 Premium Capillary dodávané společností Nanotemper. Pro analýzu byl použit enzym GST, který byl označen fluorescenčním barvivem

dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3. Spektrum pro analýzy Nano-RED bylo vybráno automatickou programovou detekcí. Pro analýzu byl použit 0,1 M fosfátový pufr o pH 6,5.

#### 4.2.4.1 Předběžné testování

Pro kontrolu správného provedení postupu uvedeného v kapitole 4.2.3 byla použita metoda Pretest. Výsledkem tohoto stanovení je určení, zda došlo k obarvení proteinu v analyzovaném vzorku. Vzorek GST (původní koncentrace 2  $\mu\text{M}$ ) byl naředěn 0,1 M PBS o pH 6,5 na koncentraci 40 nM, následně byl takto naředěný vzorek smíchán s 0,1 M PBS pufrem o pH 6,5 v poměru 1:1, minimální množství pro provedení 1 pretestu je 30  $\mu\text{l}$ . Takto připravený vzorek byl nanesen do dvou kapilár a umístěn v nosiči do přístroje Monolith NT. 115.

#### 4.2.4.2 Kontrola vazby GST s terpeny

Pro orientační určení interakce mezi enzymem GST a ligandem-terpeny byla využita metoda „Binding Check“- kontrola vazby. Zároveň v této analýze proběhla kontrola zobrazení terpenů ve spektru, totéž platí pro kontrolu zobrazení rozpouštědel – PBS pro enzym, DMSO pro terpeny. GST byla naředěna 0,1 M PBS o pH 6,5 na koncentraci 40 nM (minimální množství pro analýzu 50  $\mu\text{l}$ ). Zvolený terpen byl naředěn ze zásobního roztoku 40  $\mu\text{M}$  na koncentraci 4  $\mu\text{M}$  (minimální množství pro analýzu 50  $\mu\text{l}$ ). Dále byl připraven vzorek smícháním 6  $\mu\text{l}$  DMSO s 54  $\mu\text{l}$  PBS.

- Vzorek 1 byl připraven smícháním 25  $\mu\text{l}$  40 nM GST s 25  $\mu\text{l}$  smíchaných pufrů. Vzorek pouze s GST byl nanesen do kapilár 1-4.

- Vzorek 2 byl připraven smícháním 25  $\mu\text{l}$  40 nM GST s 25  $\mu\text{l}$  4  $\mu\text{M}$  terpenem. Vzorek s komplexem byl nanesen do kapilár 5-8.

- Vzorek 3 byl připraven smícháním 25  $\mu\text{l}$  4  $\mu\text{M}$  terpenem s 25  $\mu\text{l}$  PBS. Kontrolní vzorek pro ligand byl nanesen do kapilár 9-12.

- Vzorek 4 byl připraven smícháním 25  $\mu\text{l}$  smíchaných pufrů s 25  $\mu\text{l}$  PBS. Kontrolní vzorek pro pufr byl nanesen do kapilár 13-16.

Naplněné kapiláry byly na nosiči (obr. 12) umístěny do přístroje Monolith NT. 115 na analýzu.



Obrázek 12. Nosič kapilár pro přístroj Monolith NT. 115

#### 4.2.4.3 Stanovení vazebné afinity

Zásobní roztok GST o koncentraci 2  $\mu\text{M}$  byl naředěn 0,1 M PBS o pH 6,5 na finální koncentraci 40 nM a byl použit pro analýzu vazebné afinity („Binding Affinity“). Koncentrace terpenů pro analýzu byla stanovena na základě stanovení analýzy HSA s terpeny na přístroji Perkin-Elmer LS 50 B (viz metoda 4.2.2.1) na 13  $\mu\text{M}$ , což je koncentrace, která minimálně zháší/vůbec nezaháší fluorescenci barviva RED-NHS použitého pro značení GST v závislosti na druhu terpeny. Pro tuto analýzu je potřeba 16 zkumavek na přípravu vzorků. Do druhé až šestnácté zkumavky bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  PBS, do první zkumavky bylo napipetováno 20  $\mu\text{l}$  13  $\mu\text{M}$  terpeny, následně byl terpen pomocí dvojkového ředění přenesen do zbývajících patnácti zkumavek (z poslední zkumavky bylo následně odstraněno přebytečných 10  $\mu\text{l}$  vzorku). Následně bylo do všech zkumavek napipetováno 10  $\mu\text{l}$  GST. Všechny vzorky byly nanášeny do jednotlivých kapilár, kapiláry byly na nosiči umístěny do přístroje Monolith NT. 115 na analýzu.

#### 4.2.4.4 Řešení problémů

Jako nejčastěji se vyskytující problém při analýze interakce GST s terpeny na přístroji Monolith NT. 115 byl problém s agregací vzorku. Agregace byly způsobeny nespecifickými

interakcemi mezi molekulami. Pro odstranění agregací byl PBS pufr filtrován přes membránu s velikostí póru 0,22  $\mu\text{m}$  pomocí vakuové membránové pumpy, čímž došlo k odstranění nerozpuštěných částí a dalších nečistot, následně byl pufr na 15 minut dán do ultrazvukové lázně pro odstranění eventuálních bublin v pufru.

Dále byly jednotlivé vzorky po smíchání všech složek centrifugovány při minimálně 20 000 g, po dobu 10 minut při 4 °C. Následně byl ke každému vzorku přidán komerčně dodávaný detergent - 0,05 % Tween 20 nebo 0,1 Pluronic F-127, a to v poměru 1  $\mu\text{l}$  detergentu ku 10  $\mu\text{l}$  reakční směsi a byly důkladně promíchány.

Po zařazení obou těchto kroků, vždy došlo k odstranění agregací ve vzorcích.

## 5 Výsledky

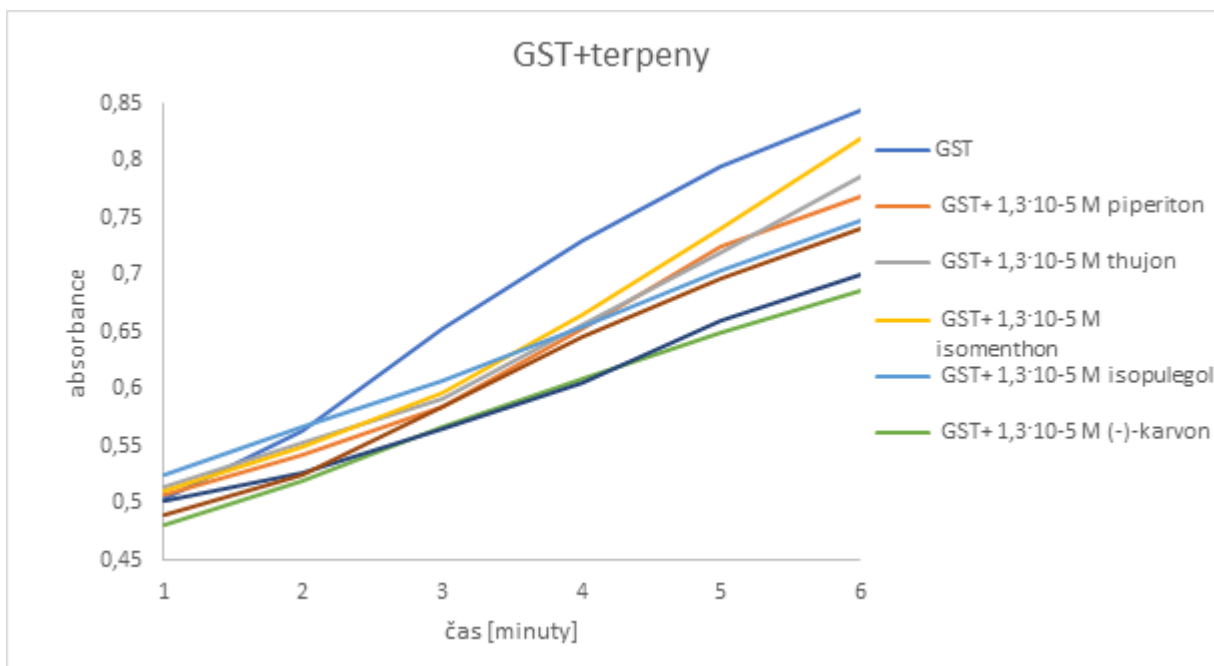
### 5.1 Stanovení inhibice glutathion-S-transferasy

Postup pro stanovení aktivity GST a komplexu GST s terpeny je podrobně popsán v kapitole 4.2.1.

Veškeré terpeny snížily aktivitu GST, pokaždé došlo k poklesu absorbance, nejméně byla absorbance ovlivněna u isomenthonu –  $96,9 \pm 0,15$  %, což odpovídá specifické aktivitě  $8,62 \pm 0,02$  U/mg, naopak nejvíce byla absorbance ovlivněna u (-)-karvonu  $81,2 \pm 0,09$  % a (+)-karvonu  $83,0 \pm 0,21$  %, kde byla specifická aktivita  $7,39 \pm 0,11$  U/mg, respektive  $7,73 \pm 0,24$  U/mg (obr. 13). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Specifická aktivita GST a její inhibice studovanými terpeny

Komplex	Absorbance [%]	Specifická aktivita [U/mg]
GST kontrola	$100 \pm 0,31$	$8,90 \pm 0,01$
GST + piperiton	$91,1 \pm 0,23$	$8,11 \pm 0,13$
GST + thujon	$92,5 \pm 0,41$	$8,23 \pm 0,07$
GST + isomenthon	$96,9 \pm 0,15$	$8,62 \pm 0,02$
GST + isopulegol	$88,7 \pm 0,43$	$7,89 \pm 0,18$
GST + (-)-karvon	$81,2 \pm 0,09$	$7,73 \pm 0,11$
GST + (+)-karvon	$83,0 \pm 0,21$	$7,39 \pm 0,24$
GST + fenchon	$87,4 \pm 0,12$	$7,78 \pm 0,32$



Obrázek 13. Absorpční spektrum pro GST s terpeny v čase

## 5.2 Stanovení vlastností terpenů spektrofotometrickými metodami

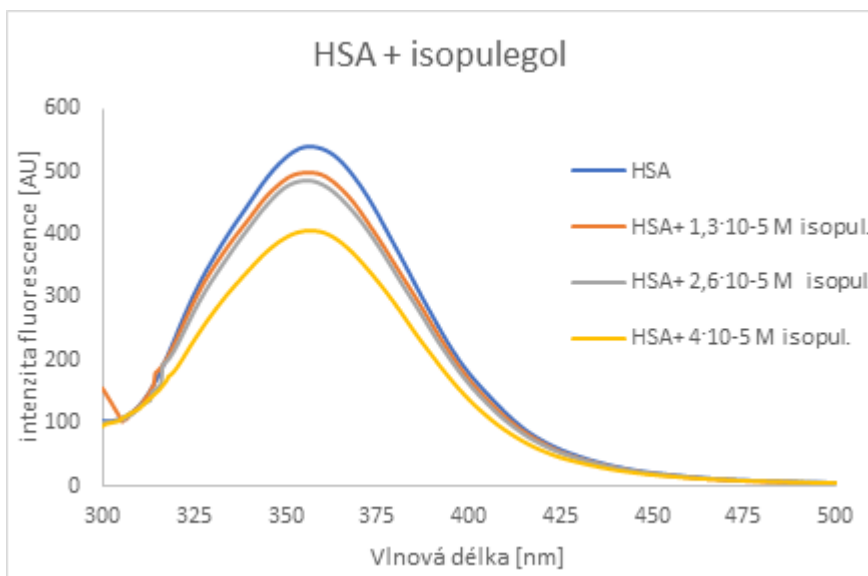
### 5.2.1 Reakce terpenů s lidským sérovým albuminem

Pro stanovení vlastností terpenů byl použit běžně dostupný standard HSA. Podrobný popis metody je uveden v části 4.2.2.1. Bylo sledováno zhášení vnitřní fluorescence tryptofanu HSA studovanými terpeny.

Všechny použité terpeny ovlivňovaly fluorescenční spektrum HSA. Rozdíly byly dány především strukturními rozdíly u jednotlivých terpenů, jelikož použité koncentrace byly ve všech případech stejné. Jako výsledná koncentrace terpenů použitá pro další analýzu byla na základě výsledků vybrána koncentrace  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M. U této koncentrace nedocházelo k výrazné změně emisního spektra (největší pokles byl na 82 %) na rozdíl od vyšších koncentrací.

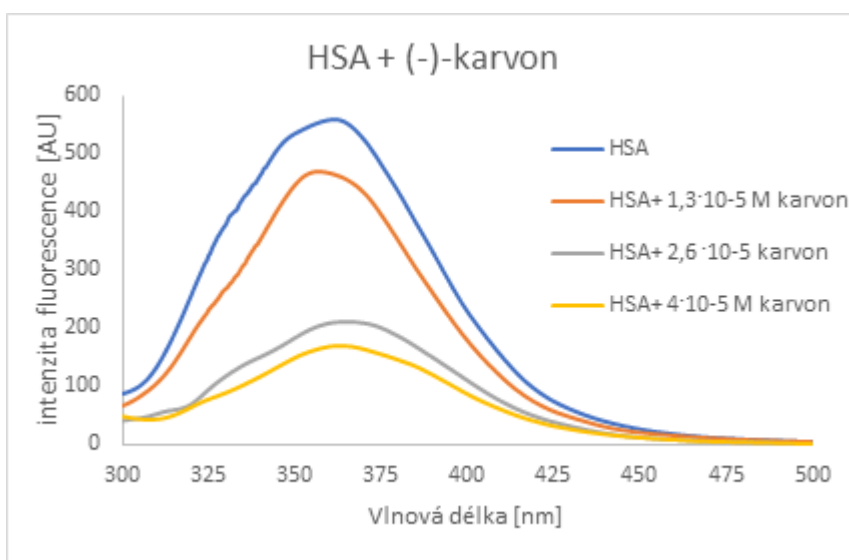
Mezi terpeny, které nejméně ovlivnily spektrum, patřil (+)-karvon a isopulegol, kde byla zaznamenána nejmenší změna spektra. Průměrně se spektra po přidavku  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M terpenů snížila na hodnotu 88,3 %, po přidavku  $2,6 \cdot 10^{-5}$  M terpenů na hodnotu 61,8 % a při nejvyšší koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  M na 50,7 %.

Maximum ve fluorescenčním spektru pro HSA má hodnotu 540 AU, při výše zmíněné koncentraci isopulegolu  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M došlo k poklesu na úroveň 92 %, při koncentraci  $2,6 \cdot 10^{-5}$  M na 89 % a při nejvyšší použité koncentraci na hodnotu 75 % (obr. 14).



Obrázek 14. Fluorescenční spektrum čistého HSA a HSA s isopulegolem v různých koncentracích.

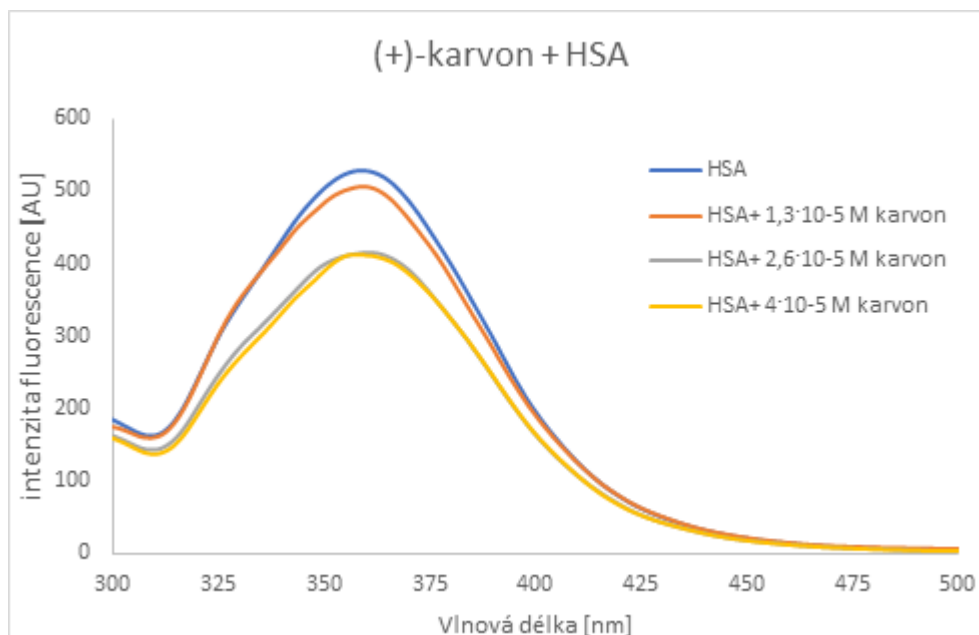
Ve fluorescenčním spektru měla fluorescence HSA hodnotu 559 AU, po přidání (-)-karvonu klesla hodnota na 84 %, při střední hodnotě zvolené koncentrace byl propad až na 38 %, při maximální zvolené koncentraci až na 31 % (obr. 15).



Obrázek 15. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s (-)-karvonem v různých koncentracích

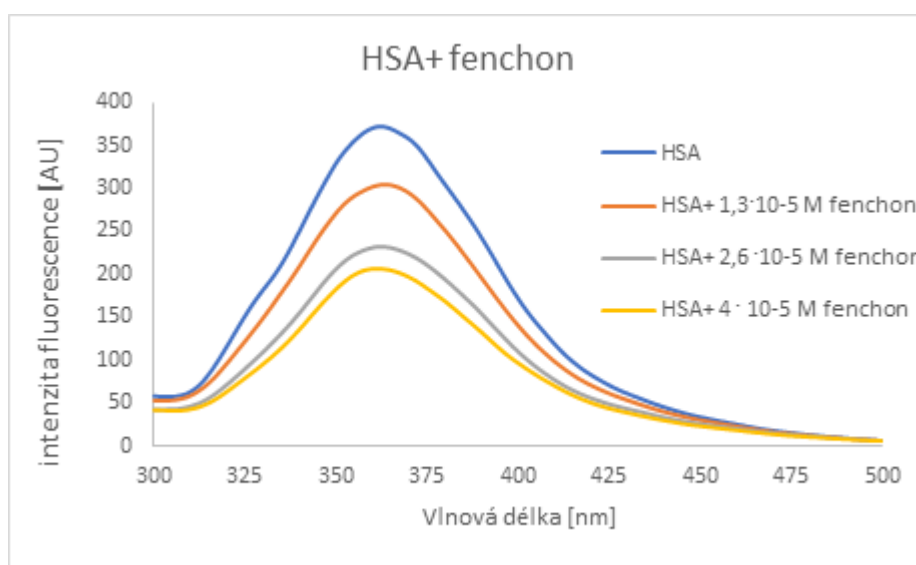
HSA v tomto fluorescenčním spektru mělo hodnotu 528 AU, po přidavku 1,3 · 10<sup>-5</sup> M (+)-karvonu byl zaznamenán pokles na 95 %, po dalším přidavku na koncentraci 2,6 · 10<sup>-5</sup> M

byl zaznamenán pokles na 82 %, po finálním přidavku byl zaznamenán pokles až na 81 % (obr. 16).



Obrázek 16. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s (+)-karvonem v různých koncentracích

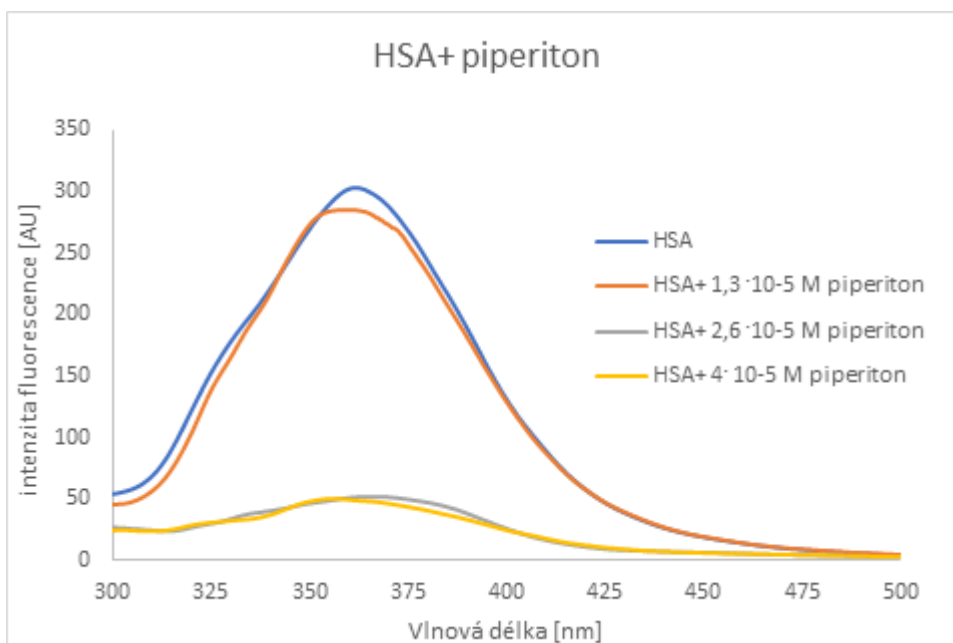
Hodnota fluorescence pro HSA byla naměřena na 393 AU, po přidání nejnižší koncentrace fenchonu klesla na 82 %, po dalších přidávcích terpenů následoval pokles na 62 %, respektive až na hodnotu 53 % (obr. 17).



Obrázek 17. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s fenchonem v různých koncentracích

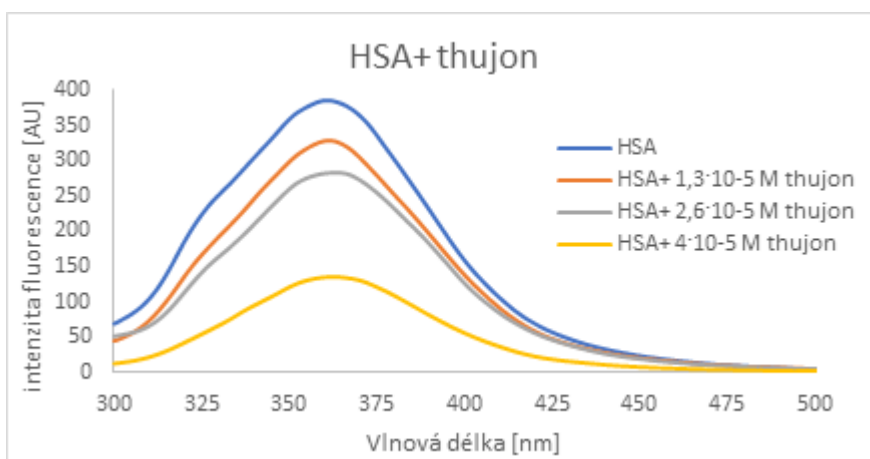


Maximum v tomto fluorescenčním spektru bylo stanoveno na 302 AU, po přidavku piperitonu nastal pokles na hodnotu 94 % z maxima, následný pokles byl na 17 % či v posledním přidavku až na 16 % (obr. 18).



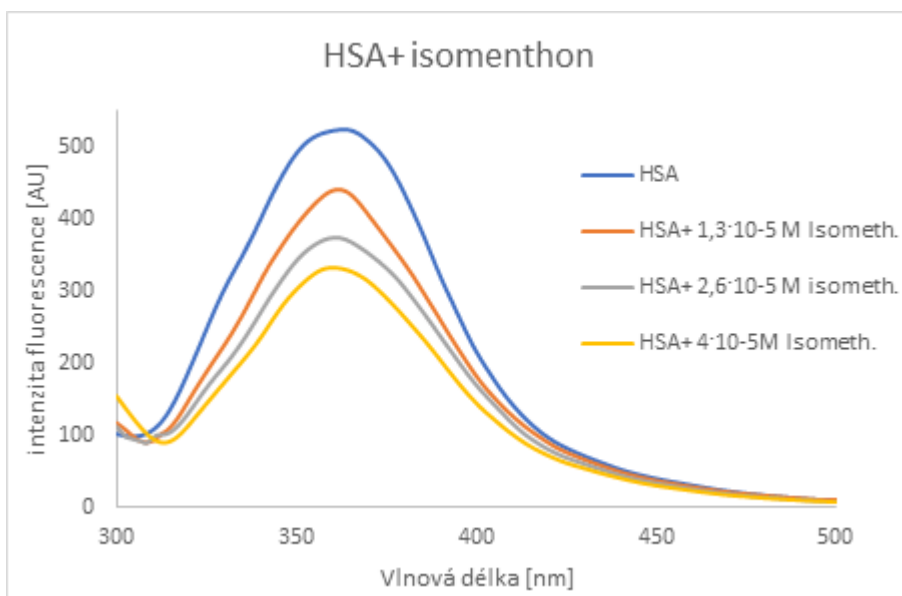
Obrázek 18. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s piperitonem v různých koncentracích

V tomto fluorescenčním spektru byla hodnota HSA stanovena na 385 AU, po přidání nejnižší zvolené koncentraci thujonu ( $1,3 \cdot 10^{-5}$  M) byl zaznamenán pokles na 85 %, po dalších přidavcích terpenů byl pokles na 74 %, při nejvyšší koncentraci byl zaznamenán pokles až na 35 % (obr. 19).



Obrázek 19. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s thujonem v různých koncentracích

Při stanovení HSA s isomenthonem byla naměřena hodnota pro HSA na 523 AU, po přidavku terpenu následoval pokles na 85 %, po dalším na 71 % a při maximální hodnotě koncentrace na 64 % (obr. 20).



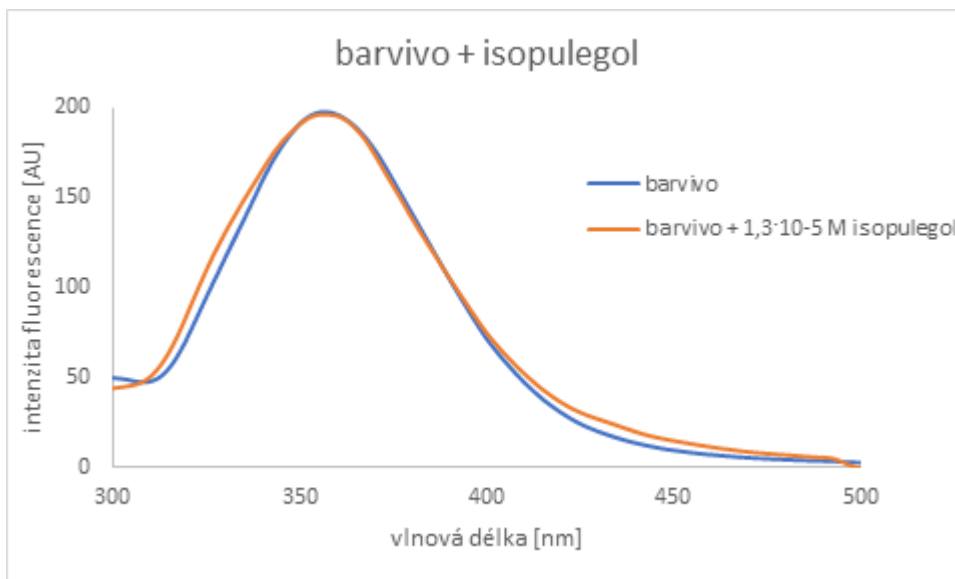
Obrázek 20. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s isomenthonem v různých koncentracích

### 5.2.2 Reakce terpenů s barvivem RED-NHS

Pro stanovení vlastností terpenů bylo použito barvivo RED-NHS. Podrobný popis metody je uveden v části 4.2.2.2. Byl sledován rozdíl ve fluorescenci u barviva a po přidavku terpenů.

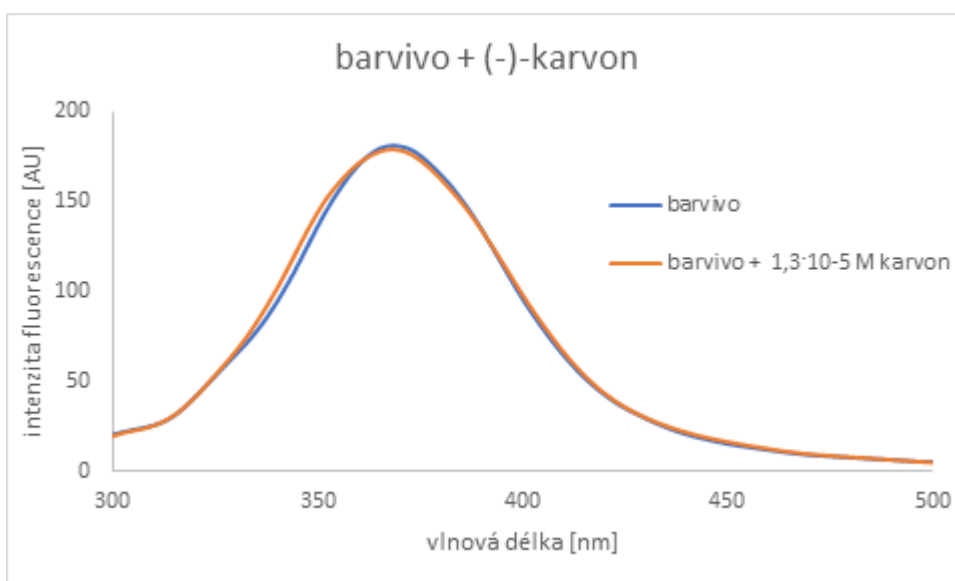
Fluorescenční spektra barviva se po přidavku terpenů o koncentraci  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M výrazněji nezměnila, největší pokles zaznamenán u piperitonu, a to na 94,58 % a u (-)-karvonu, kde došlo i k největší změně spektra, naopak prakticky bez změny bylo spektrum po přidavku isopulegolu – 99,27 %. Piperiton jak u HSA, tak u barviva vyvolal nejmenší změny ve fluorescenčním spektru.

Terpen isopulegol nejméně ovlivnil fluorescenční spektrum, hodnota bez terpenu byla stanovena na 197,9, pokles byl pouze na 99,27 % (obr. 21).



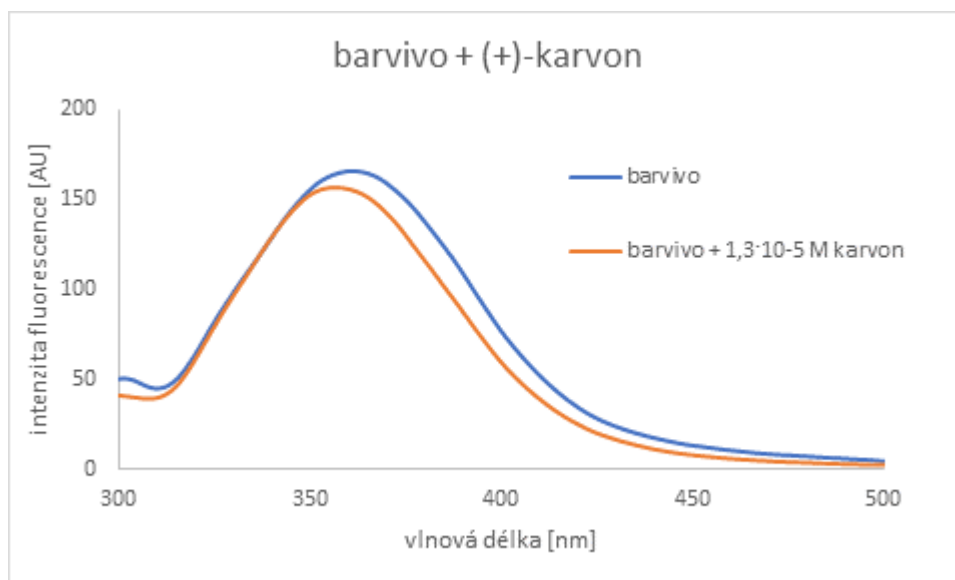
Obrázek 21. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s isopulegolem

Hodnota naměřená pro terpen byla 181 AU, po přidavku  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M (-)-karvonu byl naměřen pokles na 98,88 % z maxima (obr. 22).



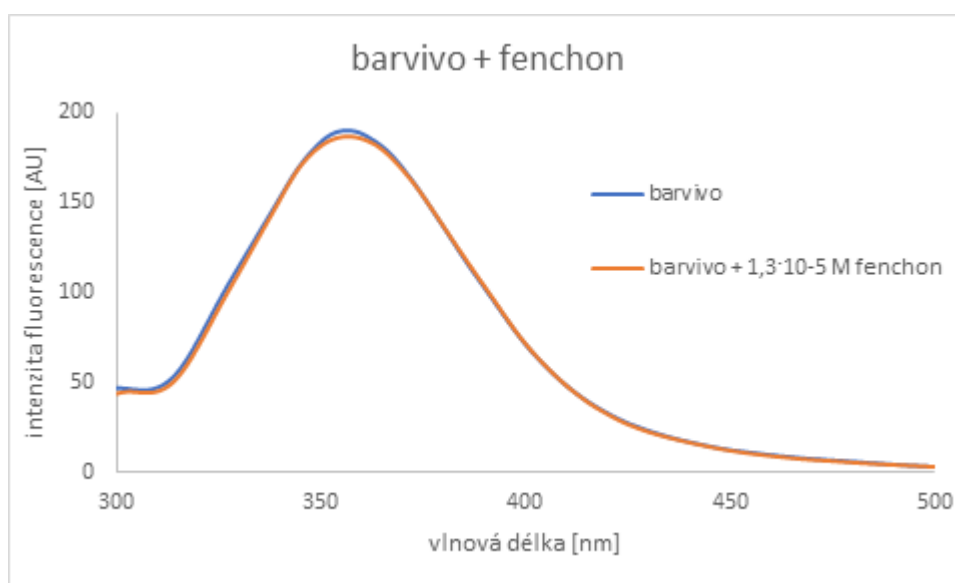
Obrázek 22. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s (-)-karvonem

Maximum barviva ve spektru bylo stanoveno na 176 AU, po přidavku  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M (+)- karvonu byl zaznamenán pokles na 94,49 %. Jako u jediného terpenu došlo ke změně hodnoty absorbance, kde bylo naměřeno maximum oproti čistému barvivu, u ostatních bylo naměřeno maximum v prakticky stejné hodnotě (obr. 23).



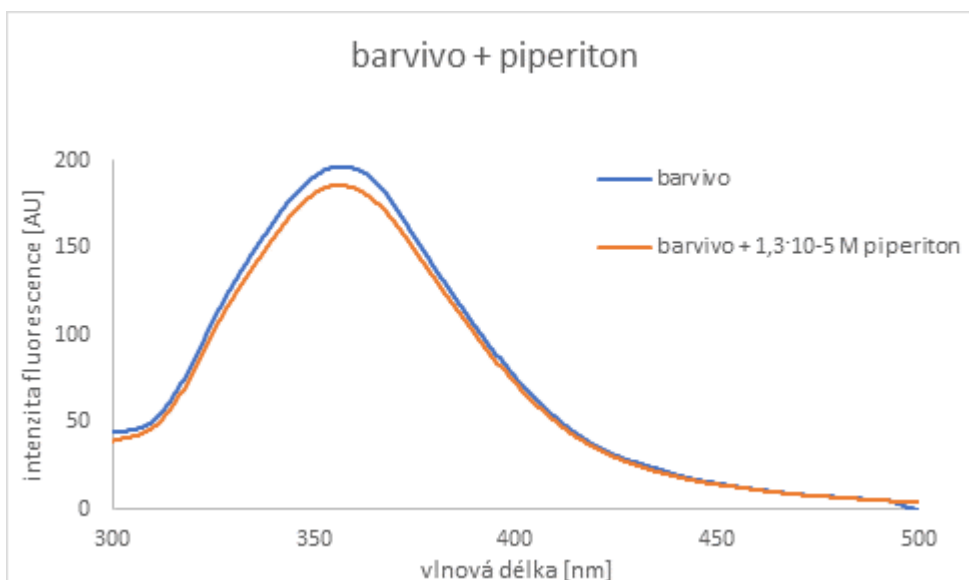
Obrázek 23. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s (+)-karvonem

Hodnota pro barvivo byla stanovena na 190 AU, po přidavku  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M fenchonu se spektrum významněji nezměnilo, maximum barviva s terpenem bylo na 98,51 % (obr. 24).



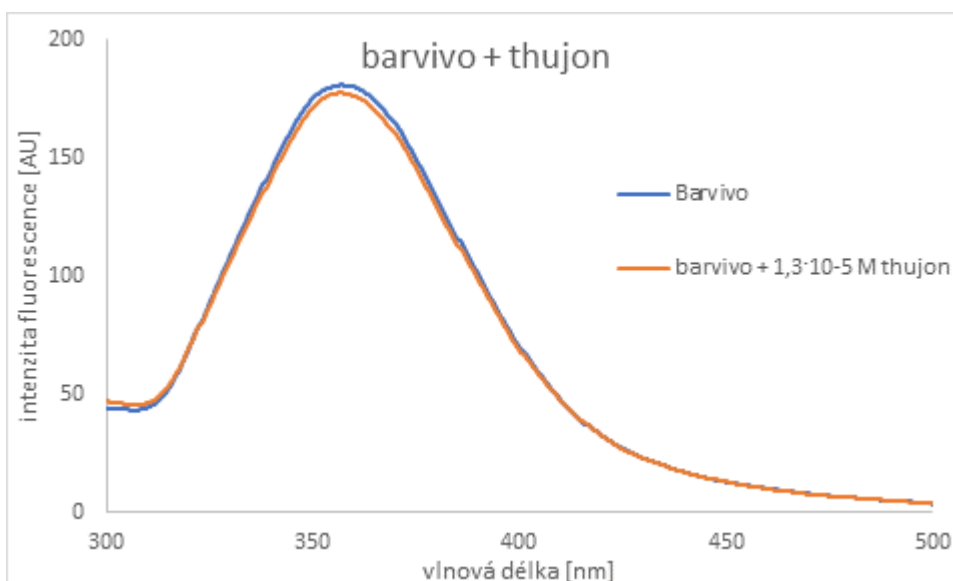
Obrázek 24. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s fenchonem

Přídavkem piperitonu byla zaznamenána změna spektra na 94,58 % - a je to druhý z terpenů, po jehož přidání došlo k poklesu pod 95 %. Maximum samotného barviva bylo stanoveno na 197 AU (obr. 25).



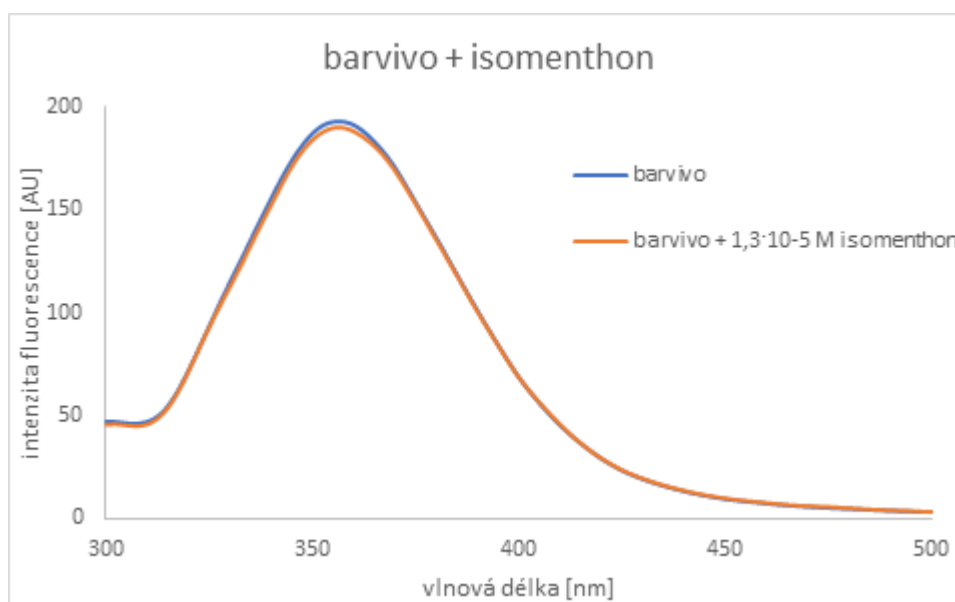
Obrázek 25. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s piperitonem

Hodnota maxima pro barvivo v fluorescenčním spektru byla stanovena na 181 AU, po přídavku  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M thujonu byl zaznamenán pokles na 98,12 % maxima (obr. 26).



Obrázek 26. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s thujonem

Ve fluorescenčním spektru byla hodnota pro barvivo stanovena na 193 AU, po přidavku isomenthonu o koncentraci  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M byla zaznamenána změna na 98,43 % z maxima (obr. 27).



Obrázek 27. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s isomenthonem

### 5.3 Stanovení vazby biomolekul pomocí MST

Veškeré výsledky byly naměřeny na přístroji Monolith NT.115. V následující kapitole jsou vždy použity výstupy, které jsou zpracovány přímo programem MO.Control v 1.6.1. Na začátku každé podkapitoly je vždy ukázán u konkrétního terpenu (isopulegol) kompletní výstup z programu, u dalších jsou uvedeny zpracované grafy s popisem.

#### 5.3.1 Kontrola vazby Glutathion-S-transferasy s terpeny

Přesný popis použité metody je uveden v kapitole 4.2.4.2. Po přidavku terpenů vždy došlo k snížení fluorescence. Mezi terpeny, které nejvíce ovlivnily fluorescenční spektrum, patřil isopulegol a (-)-karvon, naopak nejméně ovlivnil spektrum piperiton a isomenthon, také vždy došlo ke změně fluorescenčního spektra po MST analýze. Směs rozpouštědel v žádném z měření nevykazovala výraznější fluorescenční pozadí ve spektru, proto u posledních dvou

analyzovaných terpenů (thujon, piperiton) již nebyla provedena zkouška pro ověření, to také platí pro samotný analyzovaný pufr. Veškeré vzorky byly bez agregací a neobsahovaly žádné adsorpce, které jsou nejčastěji způsobeny mechanickými nečistotami.

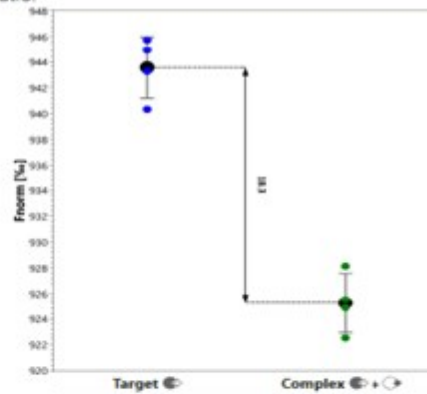
Hodnota maxima pro GST byla v tomto fluorescenčním spektru naměřena 527 AU, ve vzorcích obsahujících komplex GST s terpenem isopulegolem byl zaznamenán pokles na 242 AU, což znamená pokles o 54,1 %. V tomto měření také došlo k největší změně fluorescence, která je změřena po MST analýze a není způsobena ligandem, změna byla o  $\pm 37,1$  %. Vzorky a komplexy nevykazují žádnou agregaci viz. MST Traces a došlo k viditelnému rozdělení vzorků GST - (modře označené) a komplexů, kde došlo k navázání s isopulegolem. Zároveň došlo k poklesu relativní fluorescence u vzorků s terpenem (obr. 28).

## 18 GST+ isopulegol

**Experiment Type:** Binding Check  
**Filename:** C:\Users\NanoTemper\Desktop\2021 1 6 JK.moc  
**Date measured:** Thu, 07 Jan 2021 14:49:20 GMT  
**Target:** 20 nM GST  
**Ligand:** 2  $\mu$ M isopulegol  
**Buffer:** PBS-pH 6.5  
**Capillary:** Monolith NT.115 Premium Capillary  
**Excitation Cuvet:** Nano - RED  
**Excitation Power:** 100% (Auto-detect)  
**MST Power:** Medium  
**Device:** Monolith NT.115 (201810-BR-N006)

Comment:

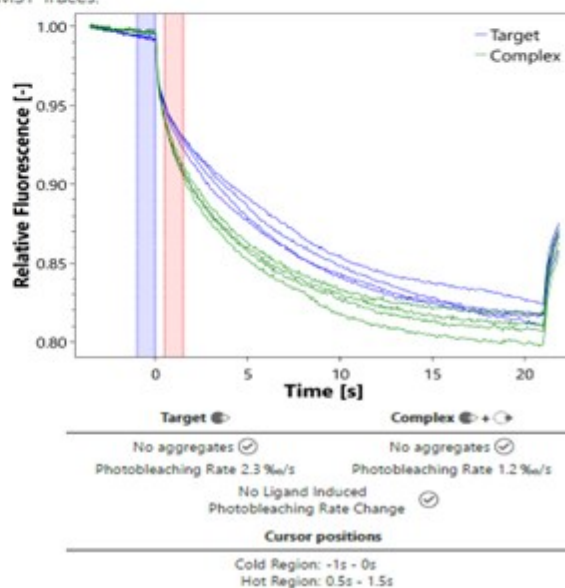
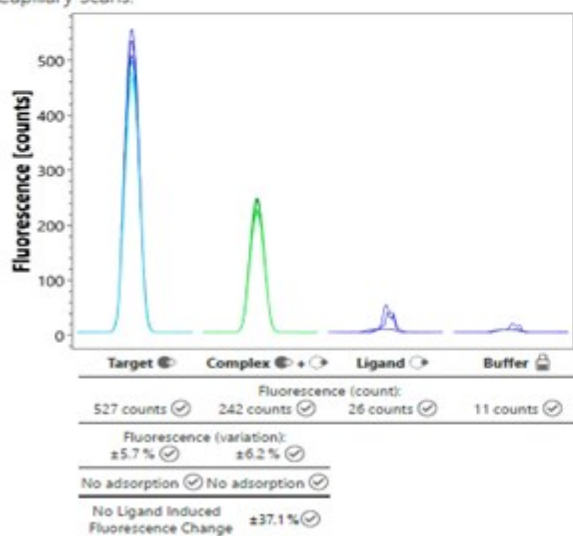
Signal to Noise Ratio:



**Response Evaluation:**  
**Response:** 944  
**Noise:** 2.4  
**Response Amplitude:** 18.3  
**Signal to Noise Ratio:** 7.8

MST Traces:

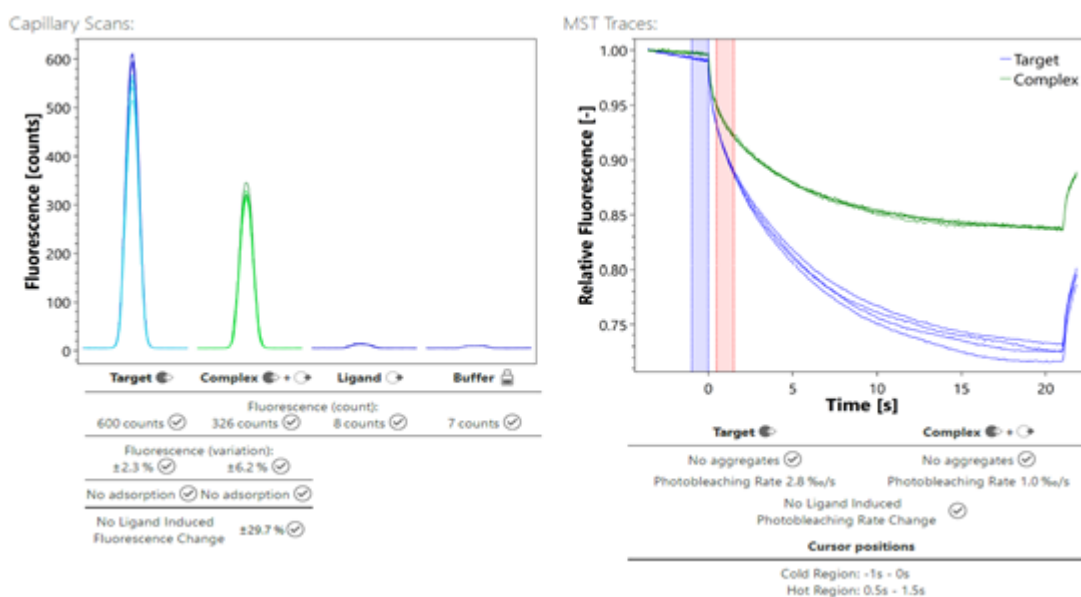
Capillary Scans:



Obrázek 28. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M isopulegolem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu; Signal to Noise Ratio ukazuje rozptyl relativní fluorescence u GST a komplexu s terpenem

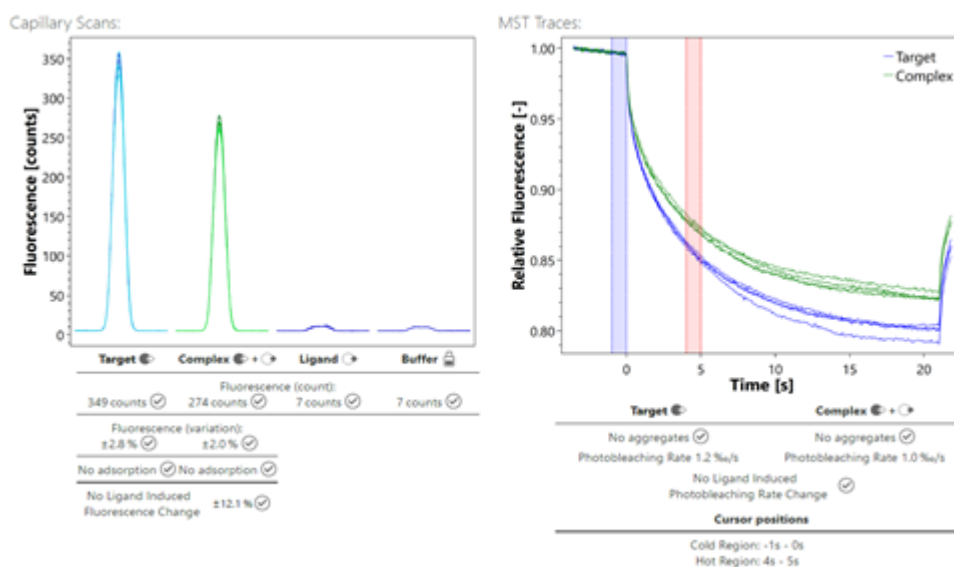
Maximum pro GST v tomto fluorescenčním spektru bylo 600 AU, po přidavku (-)-karvonu byl zaznamenán pokles o 46,6 % na výslednou hodnotu 326 AU. Změna fluorescence po MST analýze byla  $\pm 29,7$  %. Opět došlo k výraznému oddělení čistého GST a GST s terpenem (obr. 29).





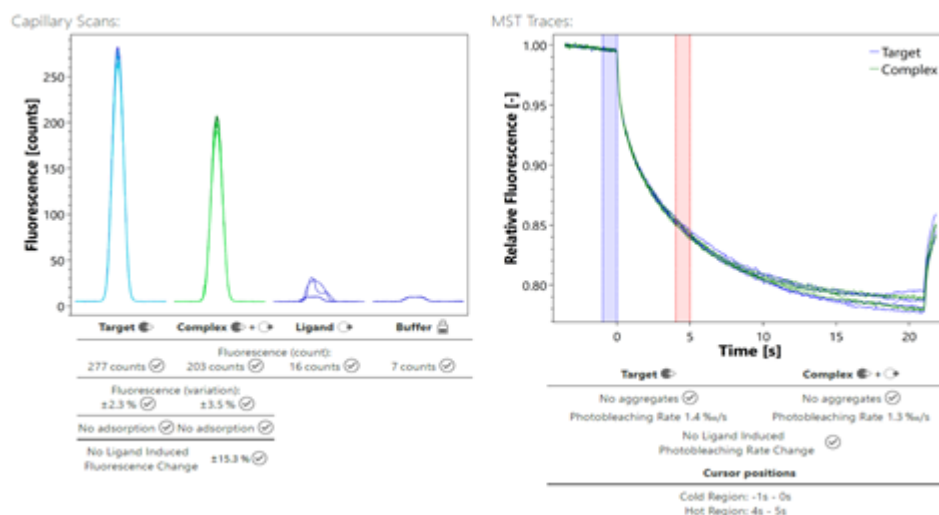
Obrázek 29. Výstup z Monolith NT. 115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M (-)-karvonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí- GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu

Ve fluorescenčním spektru mělo GST maximum 349 AU, po přidavku (+)-karvonu ke GST došlo k poklesu o 21,5 % na 274 AU, hodnota fluorescence po MST byla změněna o  $\pm 12,1$  % tento pokles patří mezi nejnižší ze všech analyzovaných terpenů. Opět došlo k jasnému oddělení mezi vzorky obsahujícími pouze GST a mezi vzorky, kde vznikl komplex. Je zajímavé, že u obou komplexů GST s karvonem došlo k nárůstu relativní fluorescence, jak je vidět na výstupu MST Traces, zbývající terpeny vykazují nižší, nebo maximálně stejné hodnoty relativní fluorescence (obr. 30).



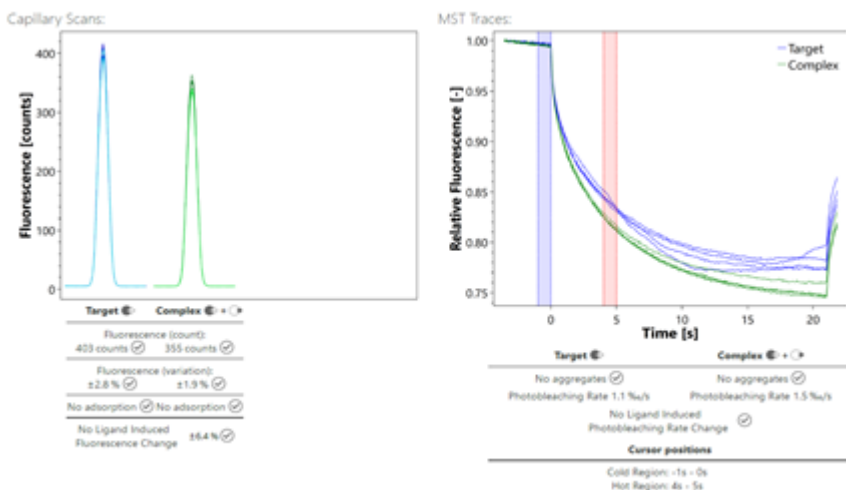
Obrázek 30. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M (+)-karvonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí- GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu

Maximem pro GST v tomto fluorescenčním spektru bylo 277 AU, maximem pro komplex GST a fenchonu bylo 203 AU, což znamená pokles o 26,7 %. Změna fluorescence po provedené MST analýze byla  $\pm 15,3$  %. Dle výstupu z MST Traces nedošlo k výraznějšímu oddělení GST a komplexu, to stejné se týká změny relativní fluorescence (obr. 31).



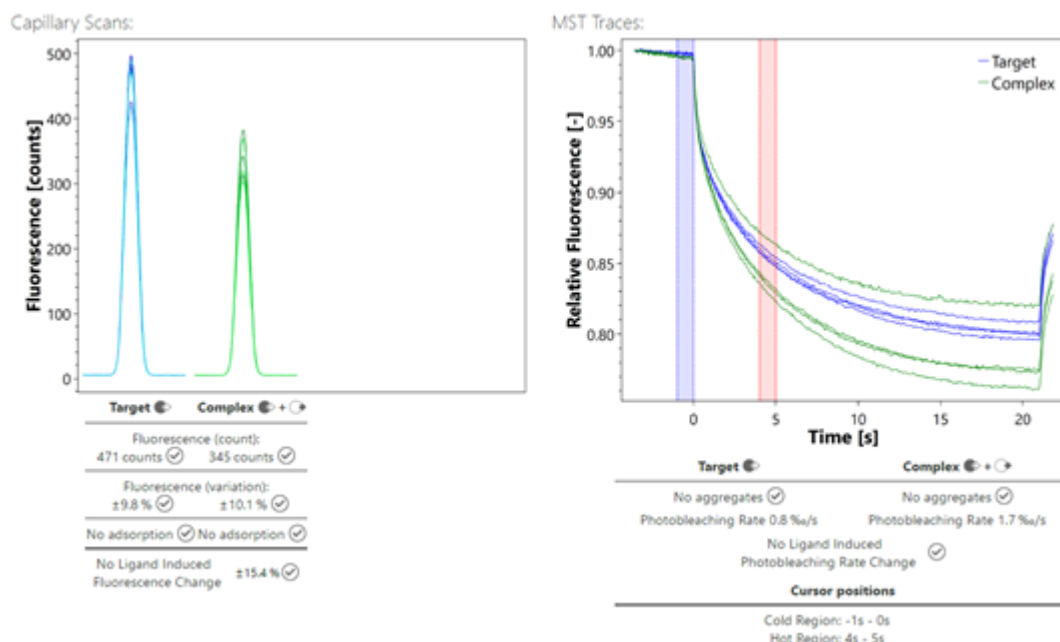
Obrázek 31. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M fenchonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu

GST při měření komplexu s piperitonem mělo maximum ve fluorescenčním spektru 403 AU, maximum pro komplex GST a piperiton bylo 335 AU, což znamená pokles pouze o 11,9 %, po MST byla změna fluorescence o  $\pm 6,4$  %, což byla nejmenší změna, která byla indukována MST. Došlo k výraznému oddělení a změně relativní fluorescence u čistého GST a u komplexu (obr. 32).



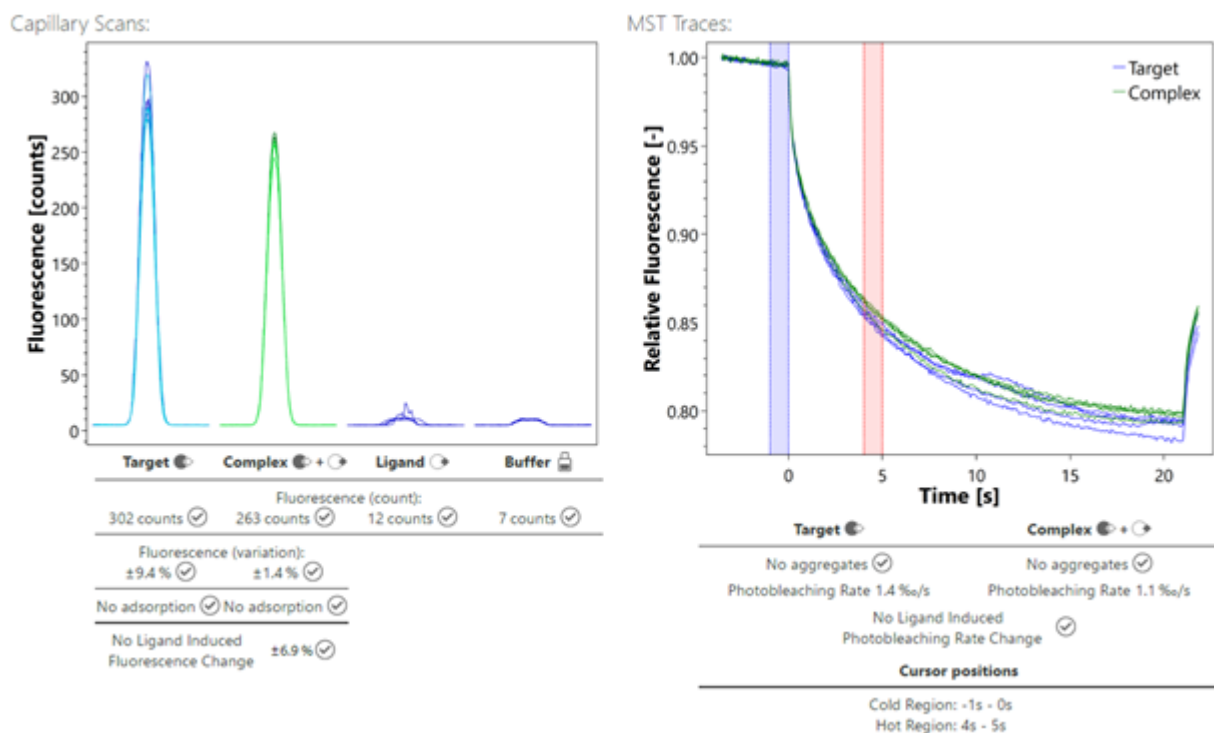
Obrazek 32. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M piperitonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu

Maximum pro GST bylo ve fluorescenčním spektru 471 AU, komplex GST s thujonem měl maximum 345 AU, což je pokles o 26,7 %, MST analýza změnila fluorescenci o  $\pm 6,4$  %. Opět došlo k viditelnému rozdělení GST a komplexu s ligandem, pouze u jednoho vzorku nedošlo k dostatečnému navázání komplexu (obr. 33).



Obrazek 33. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M thujonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu

Hodnota maxima ve fluorescenčním spektra pro GST byla 302 AU, maximum pro komplex s isomenthonem bylo 263 AU, což znamená pokles o 12,9 %, změna fluorescence po MST byla o  $\pm 6,9$  %. Nedošlo k výraznému rozdělení komplexu od čistého GST u relativní fluorescence (obr. 34).



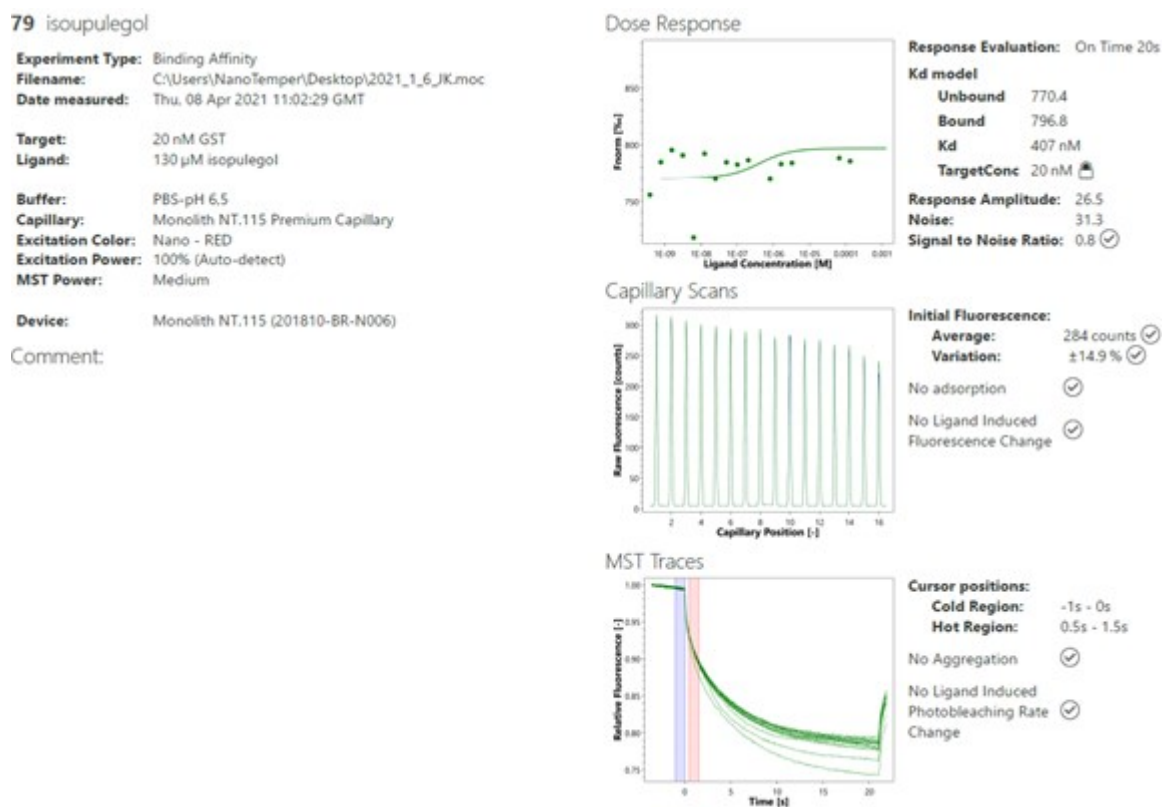
Obrázek 34. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a  $2 \cdot 10^{-6}$  M isomenthonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu

### 5.3.2 Stanovení vazebné afinity Glutathion-S-transferasy s terpeny

Podrobný popis pro provedení metody je uveden v kapitole 4.2.4.3. Vždy před provedením testu na vazebnou afinitu byl proveden „pretest“ a byla zkontrolována hodnota fluorescence čistého GST bez terpenů, ve všech případech byla hodnota ve fluorescenčním spektru v rozmezí 450-500 AU.

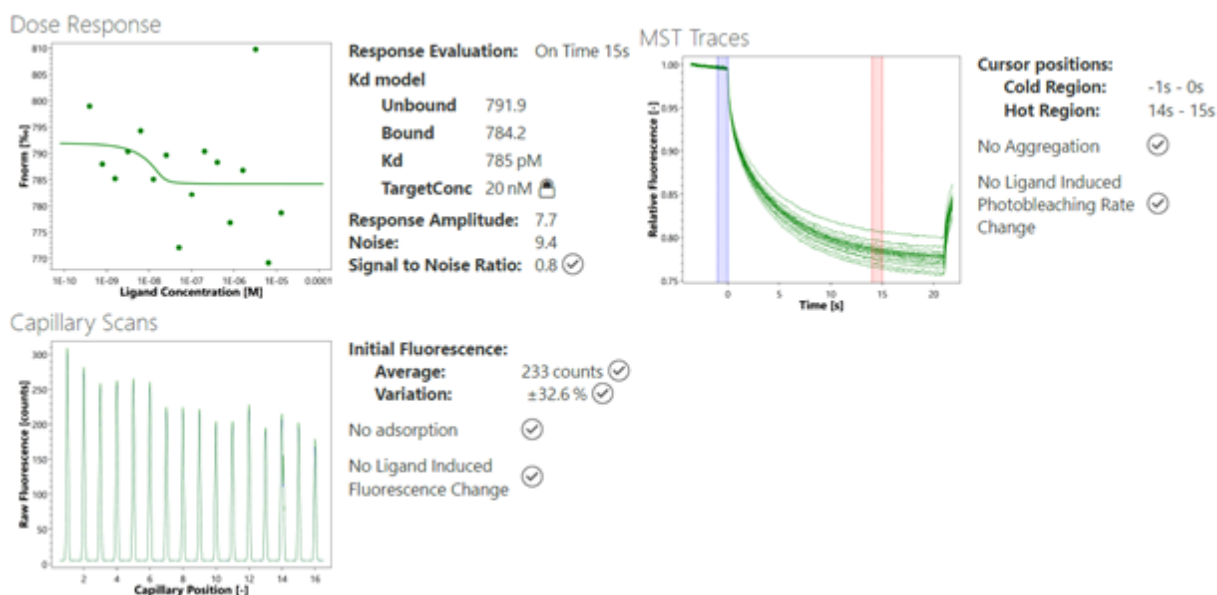
Po přidavku jednotlivých terpenů k GST vždy došlo ke změně ve fluorescenčním spektru, ovšem dle výsledků vychází, že samotná koncentrace terpenů přímo neovlivňuje intenzitu fluorescence, obecně lze říci, že dle naměřených dat dochází k potencování fluorescence u hodnot s nejvyšší koncentrací terpenů a s nižší koncentrací terpenů klesá i intenzita fluorescence. Nejvyšší průměrnou hodnotu fluorescence měly terpeny fenchon, piperiton a thujon, nejnižší naopak isomenthon.

V tomto fluorescenčním spektru, kde bylo měřeno GST s isopulegolem, byl zaznamenán pokles fluorescence o 14,9 %. Průměrná hodnota fluorescence byla 284 AU. Hodnota pro  $K_d$  byla programem stanovena na 407 nM (obr. 35).



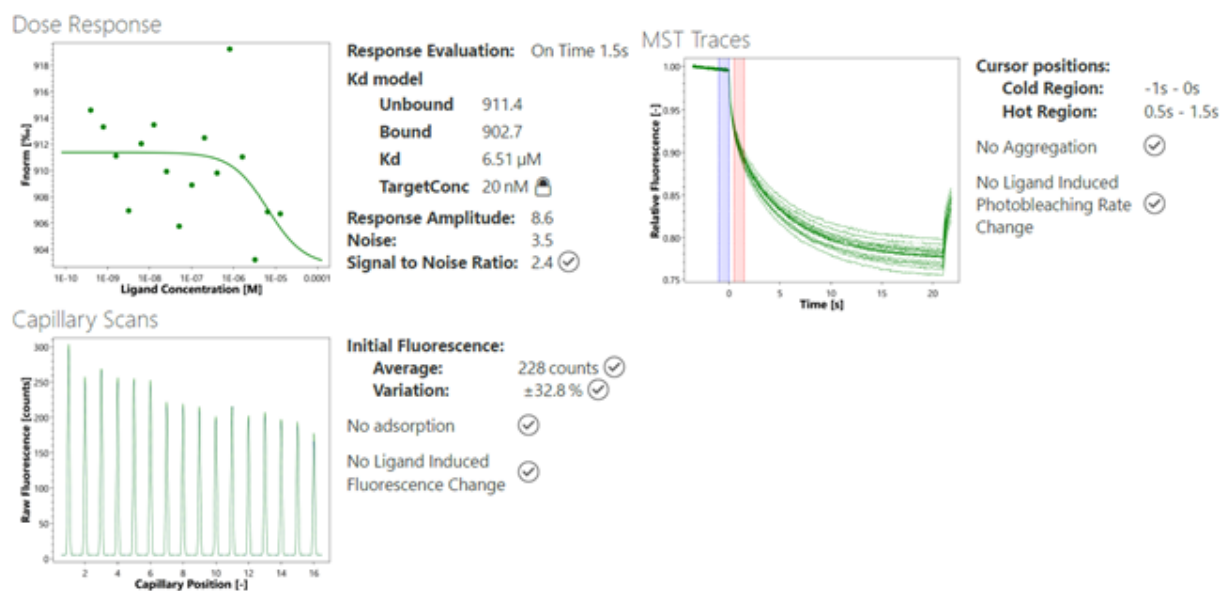
Obrázek 35. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi isopulegolu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenu - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

Komplex GST a (-)-karvonu zaznamenal ve fluorescenčním spektru pokles o 32,6 %, průměrem ve spektru bylo 233 AU. Hodnota  $K_d$  byla stanovena na 785 pM, což je nejnižší hodnota, ze všech použitých terpenů (obr. 36).



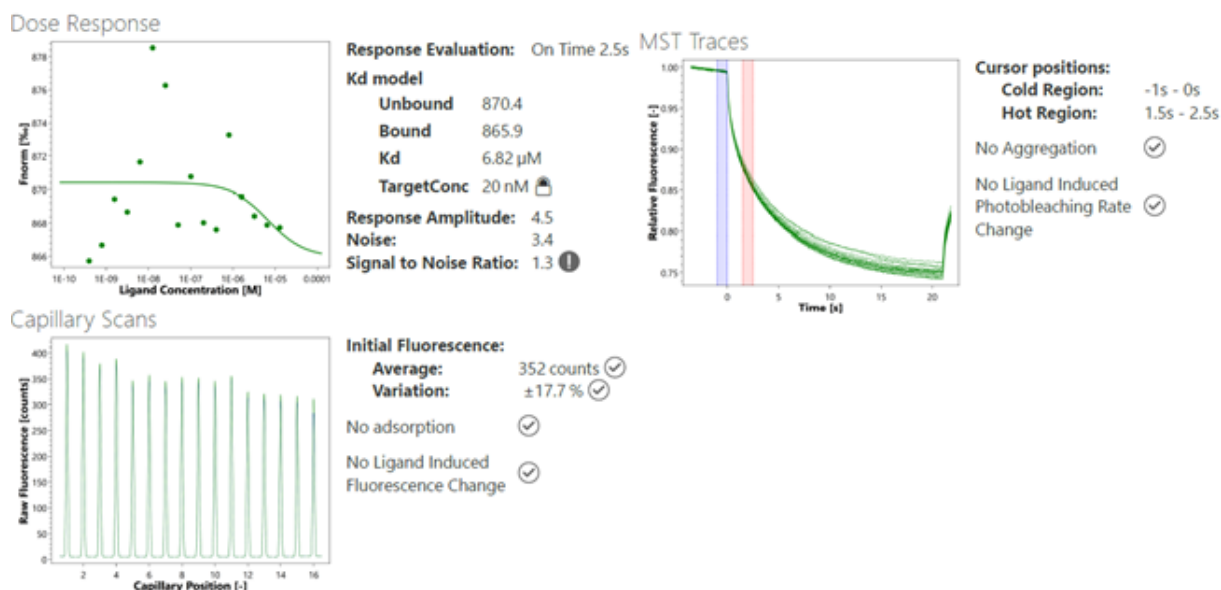
Obrázek 36. Výstup z Monolith NT. 115, reakce mezi GST a různými koncentracemi (-)-karvonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescenci na koncentraci terpenu - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

GST s (+)-karvonem mělo průměrnou hodnotu ve fluorescenčním spektru 228 AU a byl zaznamenán pokles o 32,8 %, což je hodnota, která se téměř shoduje s (-)-karvonem. Hodnota pro  $K_d$  byla stanovena na 6,51  $\mu\text{M}$  (obr. 37).



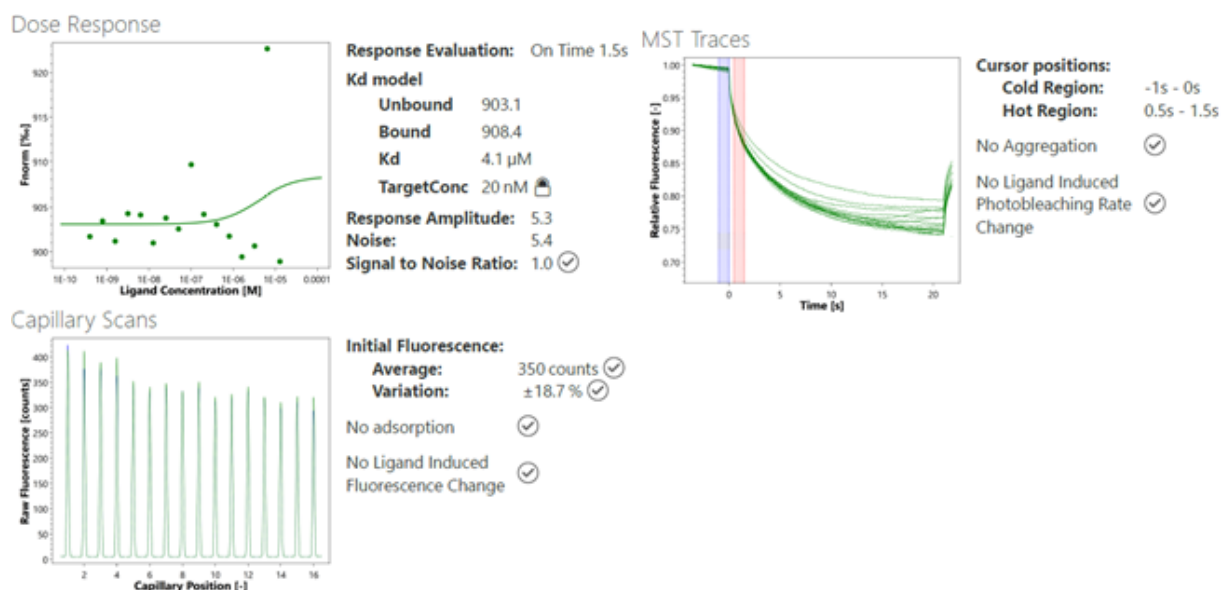
Obrázek 37. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi (+)-karvonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescenci na koncentraci terpenu - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

Průměrná hodnota fluorescence fenchonu s GST byla 352 AU, tato průměrná hodnota patří mezi nejvyšší mezi všemi použitými terpeny a celkový pokles byl o 17,7 %. Hodnota pro  $K_d$  byla automaticky stanovena na 6,82  $\mu\text{M}$  (obr. 38).



Obrázek 38. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi fenchonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescenci na koncentraci terpeny - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

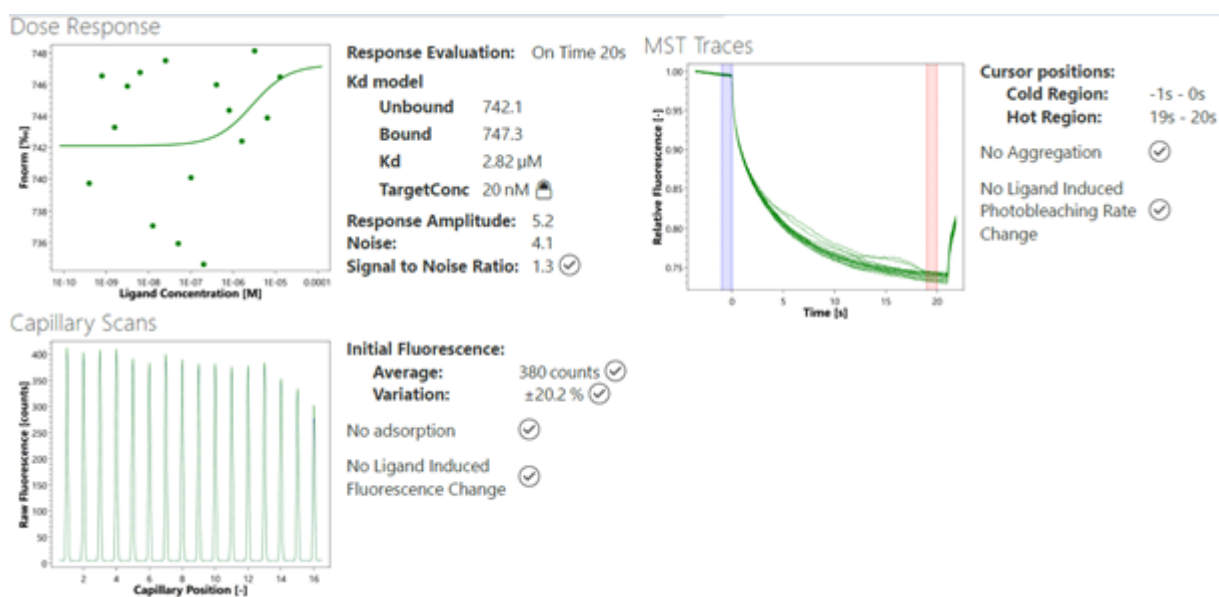
Komplex GST s různými koncentracemi piperitonu měl průměrnou hodnotu ve fluorescenčním spektru 350 AU, což je společně s fenchonem nejvyšší hodnota. Na základě změny koncentrace byl zaznamenán pokles o 18,7 %.  $K_d$  bylo stanoveno na 4,1  $\mu\text{M}$  (obr. 39).



Obrázek 39. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi piperitonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescenci na koncentraci terpeny - výstupem je hodnota  $K_d$ ;

graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

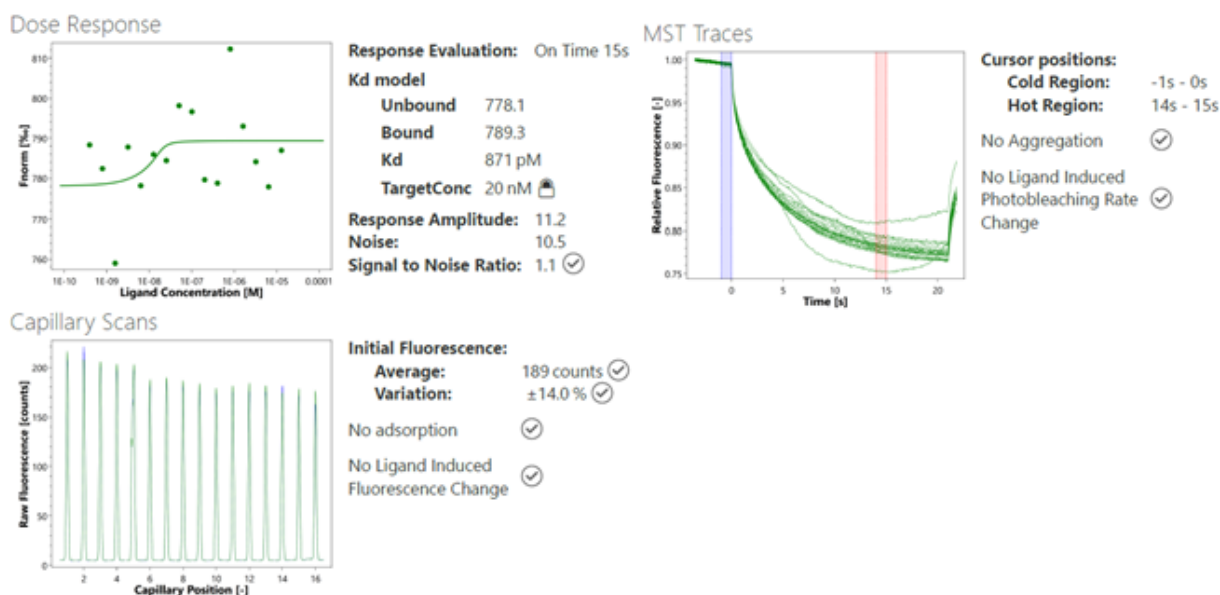
Průměrná hodnota fluorescence u komplexu GST a thujonu byla 380 AU a byl zaznamenán pokles fluorescence o 20,2 %. Změřená hodnota  $K_d$  má hodnotu 2,82  $\mu\text{M}$  (obr. 40).



Obrázek 40. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi thujonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescenci na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

Poslední stanovený komplex GST byl s isomenthonem, průměrná hodnota ve fluorescenčním spektru byla nejnižší ze všech stanovených terpenů a to 189 AU, byl zaznamenán pokles o 14 %. A  $K_d$  bylo stanoveno na 871 pM, což je také jedna z nejnižších hodnot, které byly stanoveny (obr. 41).





Obrázek 41. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi isomenthonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescenci na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu

U všech terpenů byla automatickým výpočtem stanovena disociační konstanta  $K_d$ , ale byly naměřeny velké rozdíly mezi hodnotami u jednotlivých terpenů, jednalo se o několik řádů od pM ((-)-karvon) až do  $\mu\text{M}$  (piperiton). Terpeny s naměřenými hodnotami  $K_d$  jsou uvedeny v tabulce 4. Veškerá měření byla bez adsorpcí a agregací.

Tabulka 5. Hodnoty  $K_d$  pro jednotlivé komplexy GST s terpeny

Komplex GST + terpen	$K_d$
Isopulegol	407 nM
(-)-karvon	785 pM
(+)-karvon	6,51 $\mu\text{M}$
fenchon	6,82 $\mu\text{M}$
piperiton	4,1 $\mu\text{M}$
thujon	2,82 $\mu\text{M}$
isomenthon	871 pM

## 6 Diskuze

Využití metody MST pro studium biomolekulárních interakcí je na vzestupu, jedním z důvodů je zajisté široké spektrum látek, které je možné analyzovat. Pomocí MST již byly analyzovány interakce nukleových kyselin (9), (11), reakce protein-protein, které patří mezi nejčastěji sledované interakce (8), (7), či interakce proteinů s ionty (10).

Cílem této diplomové práce bylo zavedení MST metody pro studium interakcí proteinů s nízkomolekulárními látkami a ověření vhodnosti této metody pro sledování interakce GST s terpeny ((-)-isopulegol, (+)-isomenthon, (-)-karvon, (+)-karvon, thujon, piperiton, (-)-fenchon). Dílčími cíli bylo sepsání literární rešerše o MS, stanovení aktivity GST a ovlivnění její aktivity vybranými terpeny, dále stanovení vlastností terpenů sketroskopickými metodami – MST a spektrofluorimetrií. Dalším úkolem bylo sledování interakce terpenů s HSA a ověření, zda terpeny neinteragují nebo nezhasíjí fluorescenční barvivo NHS, používané pro přípravu vzorku na MST. Na závěr byla pomocí metody MST provedena kontrola vazby pro GST s terpeny, studována afinita GST k jednotlivým terpenům a určena disociační konstanta pro vazbu GST s terpeny.

Zatím nebyly provedeny žádné studie týkající se analýzy komplexů GST s terpeny pomocí metody MST, ale studie afinity pro enzym GST s jinými substráty již byly provedeny např. Kun a kolektiv 2017 touto metodou studovali vazbu bakteriálního proteinu Vip3A (56). Naopak dosud nebyly provedeny žádné studie, při kterých byly měřeny interakce terpenů s proteiny nebo jinými biomolekulami metodou MST. Důvodem může být, že některé terpeny zhasí vnitřní fluorescenci HSA/BSA při spektrofluorimetrických metodách, což bylo dokázáno (57), navíc u BSA došlo i k posunu naměřeného fluorescenčního maxima, který byl přímo úměrný koncentraci použitého diterpenu (0–500  $\mu\text{M}$ ). V této práci všechny zvolené terpeny zhasely fluorescenci HSA. Průměrně se spektra po přidavku  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M terpenů snížila na hodnotu 88,3 %, po přidavku  $2,6 \cdot 10^{-5}$  M terpenů na hodnotu 61,8 % a při nejvyšší koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  M na 50,7 %. Z tohoto důvodu se pro analýzu GST a terpenů metodou MST vybrala maximální koncentrace terpenu  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M. Dále bylo v práci ověřeno, zda nedochází ze zhasení barviva NHS zvolenými terpeny, protože toto barvivo se používá pro značení studovaného enzymu. V tomto případě při koncentraci terpenů  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M nedošlo ke statisticky významné změně fluorescenčního spektra barviva NHS.

GST patří mezi detoxikační enzymy II. fáze biotransformace. Vliv terpenů na GST již byl zkoumaný ve větším množství studií. Ovšem tyto studie vykazují velmi často rozdílné výsledky. Inhibiční efekt terpenů na aktivitu GST byl popsán v článku Bártíková a kolektiv 2014 (58), naopak indukční efekt na GST ukazuje studie Alvarez-Gonzales a kolektiv 2014. (59). V této práci byl sledován vliv monoterpenů isopulegolu, isomenthonu, karvonu, thujonu, piperitonu a fenchonu. Při měření aktivity GST s přidavkem  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M terpenu nevykazovalo statisticky významnou změnu aktivity. Tato koncentrace byla zvolena na základně analýzy interakce mezi HSA a terpeny, při této koncentraci nedocházelo k výrazné inhibici, ale je možné, že je příliš nízká pro prokázání signifikantní inhibice.

Analýza komplexů GST s terpeny metodou MST má 2 velké části: kontrolu vazby a měření afinity. Při kontrole vazby dochází k ověření, zda je GST schopna vytvořit komplex s použitými terpeny a zda ovlivňují nějakým způsobem fluorescenci, při měření afinity dochází ke stanovení hodnoty  $K_d$ .

Při měření kontroly vazby vždy došlo ke snížení fluorescence – nejvíce u isopulegonu a (-)-karvonu a zároveň došlo ke změně fluorescence po MST analýze, což může být způsobeno minimální změnou teploty v měřeném gradientu. Dále došlo k potvrzení, že rozpouštědla DMSO a 0,1 M PBS pH 6,5 nevykazují fluorescenční pozadí ve spektru. PBS pufr s pH okolo 7 je považován za standardně používaný pufr v metodě MST, do kterého je možné přidávat detergent, aby nedocházelo k agregaci vzorků (7), což potvrzují i měření v této práci. Bez přidavku detergentů a centrifugace docházelo k nespecifickým interakcím, které způsobují agregace, agregace ovlivňují průběh „T-jumpu“, tedy jednoho z parametrů, na základě kterého jsou vyhodnoceny výsledky.

Při měření fluorescence komplexů značené GST s terpeny metodou MST docházelo k jejímu potencování, nejvyšší hodnoty intenzity fluorescence byly stanoveny u nejvyšší koncentrace terpenů a následně dochází k poklesu fluorescence ve směru klesající koncentrace terpenů, pokles je vždycky lineární, ale vždy do hodnoty 35 %. U některých komplexů nedošlo ani ke změně na statistické hladině významnosti pro  $\alpha = 0,05$  (isomenthon).

Při měření afinity komplexů GST s jednotlivými terpeny byly zjištěny významné rozdíly u hodnoty disociační konstanty  $K_d$ . Velmi zajímavý je rozdíl v naměřené hodnotě  $K_d$  pro 2 enantiomery karvonu, kdy (-)-karvon má hodnotu  $K_d = 785$  pM a (+)-karvon  $K_d = 6,51$   $\mu$ M. Důvodem může být konformace vazebného místa GST, kdy pro jeden z enantiomerů je snadnější přístup než pro druhý, a dochází tak k navázání s různou afinitou. Rozdíl  $K_d$  na

základě enantiomerů byl prokázán ve studii Wallinder a kolektiv 2018 (60). Fenchon, který je bicyklický terpen, vykazoval nejvyšší hodnotu  $K_d$ . Dále se zdá, že vyšší množství dvojných vazeb zvyšuje  $K_d$ , (+)-karvon a piperiton měly nejvyšší  $K_d$  hned po bicyklickém fenchonu. Mezi % inhibice a hodnotou  $K_d$  nebyla zaznamenána žádná přímá úměra.

Na základě literární rešerše, ze které vychází, že MST je jak rychlá, tak nenákladná metoda, která poskytuje přesné výsledky, a také z toho, že je možné analyzovat široké spektrum interakcí od nukleových kyselin, přes proteiny po interakce protein a inhibitor, byla metoda MST zvolena pro inhibiční studii GST s terpeny. Z dosažených výsledků je vidět, že použití metody MST je vhodné pro inhibiční studie s GST. V praktické části nebyl problém s navázáním barviva NHS na GST (dostatečná molekulová hmotnost GST), vždy došlo k obarvení a výsledná koncentrace vždy byla stejná, což bylo ověřeno pretestem u MST metody. Na druhou stranu interakce GST s terpeny vykazovala některé zvláštní hodnoty – kdy při nejvyšší koncentraci terpenů byla naměřena nejvyšší fluorescence a s klesající koncentrací jednotlivých terpenů klesala i naměřená fluorescence, rozdíl v poklesu ovšem nebyl vždy na polovinu, jak by se dalo předpokládat při dvojkovém ředění, ale pouze o několik procent, či široké rozpětí hodnot disociační konstanty  $K_d$ , v tomto ohledu by bylo dobré provést více opakovaných měření a následné hodnoty statisticky vyhodnotit.

## 7 Závěr

Hlavním cílem práce bylo zavedení MST metody pro studium interakcí proteinu s nízkomolekulárními látkami a ověření této metody pro sledování interakce GST se zvolenými terpeny.

Výsledky získané v experimentální části můžeme shrnout následovně:

- Zvolené terpeny v koncentraci  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M neprokázaly inhibiční vlastnosti na statistické hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) pro enzym glutathion-S-transferasu.
- Terpeny zhasí vnitřní fluorescence při interakci s lidským sérovým albuminem.
- U interakce terpenů s barvivem NHS nedocházelo k zhasení fluorescence.
- GST je vhodný enzym pro přípravu vzorků na MST.
- Při kontrole vazby GST s terpeny vždy došlo ke tvorbě komplexu s poklesem fluorescence. DMSO a PBS výrazněji neovlivňovaly fluorescenční pozadí.
- Při studiu afinity GST a terpenů byly zjištěny velké rozdíly v hodnotě  $K_d$ , ale u všech terpenů se podařilo tuto hodnotu změřit.
- MST metoda je vhodná pro studium dalších interakcí GST.

## 8 Seznam použitých zkratek

CDNB	1-chloro-2,4- dinitrobenzen
DMSO	dimethylsulfoxid
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HSA	<i>human serum albumin</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
MAPEG	<i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
MST	<i>microscale thermophoresis</i>
NHS	N-hydroxysukcinimid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná oblast

## 9 Seznam použité literatury

1. **Asmari M, Ratih R, Alhazmi HA, El Deeb S.** Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction. *Methods*. 2018, Sv. 15, 146, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.02.003, stránky 107-119.
2. **Philipp A. E. Schoen, Jens H. Walther, Salvatore Arcidiacono, Dimos Poulidakos, and Petros Koumoutsakos.** Nanoparticle Traffic on Helical Tracks: Thermophoretic Mass Transport through Carbon Nanotubes. *Nano Letters*. 2006, Sv. 6, 9, doi: 10.1021/nl060982r, stránky 1910-1917.
3. **Jiantao Leng, Zhengrong Guo, Hongwei Zhang, Tienchong Chang, Xingming Guo, and Huajian Gao.** Negative Thermophoresis in Concentric Carbon Nanotube Nanodevices. *Nano Letters*. 2016, Sv. 16, 10, doi: 10.1021/acs.nanolett.6b02815, stránky 6396-6402.
4. **Wienken, C., Baaske, P., Rothbauer, U. et al.** Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Commun.* 2010, Sv. 1, 100, doi: 10.1038/ncomms1093.
5. **Braun D, Libchaber A.** Trapping of DNA by thermophoretic depletion and convection. *Phys Rev Lett.* 28, 2002, Sv. 89, 18, doi: 10.1103/PhysRevLett.89.188103.
6. **Reineck P, Wienken CJ, Braun D.** Thermophoresis of single stranded DNA. *Electrophoresis*. 2010, Sv. 31, 2, doi: 10.1002/elps.200900505, stránky 279-286.
7. **Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D.** MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*. 2010, Sv. 1077, 10.1016/j.molstruc.2014.03.009 , stránky 101-113.
8. **Seidel, S. A. I., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazić, A., ... Duhr, S.** Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*. 2013, Sv. 59, 3, doi:10.1016/j.ymeth.2012.12.005 , stránky 301-315.
9. **Mueller, A. M., Breitsprecher, D., Duhr, S., Baaske, P., Schubert, T., & Längst, G.** MicroScale Thermophoresis: A Rapid and Precise Method to Quantify Protein–Nucleic Acid Interactions in Solution. *Functional Genomics*. 2017, stránky 151–164. doi:10.1007/978-1-49.

10. **Samarjit Patnaik, Wei Zheng, Jae H. Choi, Omid Motabar, Noel Southall, Wendy Westbroek, Wendy A. Lea, Arash Velayati, Ehud Goldin, Ellen Sidransky, William Leister, and Juan J. Marugan.** Structure–Activity Relationship, and Biological Evaluation of Noninhibitory Small Molecule Chaperones of Glucocerebrosidase. *Discovery*. 2012, Sv. 12, doi: 10.1021/jm300063b, stránky 5734-5748.

11. **Schubert, T., Pusch, M. C., Diermeier, S., Benes, V., Kremmer, E., Imhof, A., & Längst, G.** Df31 Protein and snoRNAs Maintain Accessible Higher-Order Structures of Chromatin. *Molecular Cell*. 2012, Sv. 48, 3, stránky 434-444, doi:10.1016/j.molcel.2012.08.021.

12. **Skálová, Lenka a kolektiv.** *Metabolismus Léčiv a jiných xenobiotik*. Hradec Králové : Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3733-4 (pdf).

13. **E, Croom.** Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. *Toxicology and Human Environments*. 2012, doi: 10.1016/b978-0-12-415813-9.00003-9 , stránky 31-88.

14. **Warholm, Marghareta, Guthenberg, Claes a Bengt, Mannervik.** Molecular and catalytic properties of glutathione transferase .mu. from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides. *Biochemistry*. 1983, Sv. 22, 15, doi: 10.1021/bi00284a011, stránky 3610-3617.

15. **Kodíček, Milan.** Biochemické pojmy : výkladový slovník. [Online] VŠCHT Praha, 2007. [Citace: 17. 2 2021.] [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=transferasy](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=transferasy).

16. **Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E.** Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*. 2010, Sv. 154, 2, doi: 10.5507/bp.2010.017, stránky 103-116.

17. **Atkinson, H. J., & Babbitt, P. C.** Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. *Biochemistry*. 2009, Sv. 48, doi: 10.1021/bi901180v, stránky 11108-11116.

18. **Laborde, E.** Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *nature*. 2010, Sv. 17, doi: 10.1038/cdd.2010.80, stránky 1373–1380.

19. **Youngjo Kim, Sun Joo Cha, Hyun-Jun Choi, Kiyoung Kim.** Omega Class Glutathione S-Transferase: Antioxidant Enzyme in Pathogenesis of Neurodegenerative



Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, doi: 10.1155/2017/5049532, str. 6.

20. **Anupam Chatterjee, Sanjay Gupta**. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Letters*. 2018, Sv. 433, doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.028., stránky 33-42.

21. **N., Armstrong R**. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 1997, Sv. 10, 1, stránky 2-18.

22. **Aaron, Oakley**. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*. 2011, Sv. 43:2, doi: 10.3109/03602532.2011.558093, stránky 138-151.

23. **Stanley Mukanganyama, Merhatibeb Bezabih, Metuno Robert, Boneventure T. Ngadjui, Gilbert F. W. Kapche, Francois Ngandeu & Berhanu Abegaz**. The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011, Sv. 26, 4, doi: 10.3109/14756366.2010.526769, stránky 460-467.

24. **2002-2021, UniProt Consortium**. UniProtKB - P09488 (GSTM1\_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 23. březen 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P09488#structure>.

25. **Gu, Y., Singh, S.V., Ji, X**. CRYSTAL STRUCTURE OF MGSTA1-1 IN COMPLEX WITH GSH. *RCSB PDB*. [Online] 1. 6 2000. [Citace: 23. březen 2021.] <https://www.rcsb.org/structure/1F3A>.

26. **Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA**. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme. *Biochem*. 2001, Sv. 360, 1, stránky 1-16.

27. **Ata, A., & Udenigwe, C**. Ata, A., & Udenigwe, C. (2008). The Discovery and Application of Inhibitors of Glutathione S-Transferase as Therapeutic Agents. *Current Bioactive Compounds*. 2008, Sv. 4, 1, doi: 10.2174/157340708784533384, stránky 41-50.

28. **Liu, X.-P., Goldring, C. E. P., Wang, H.-Y., Copple, I. M., Kitteringham, N. R., & Park, B**. Extract of Ginkgo biloba induces glutathione-S-transferase subunit-P1 in vitro. 2009, Sv. 16, 5, doi: 10.1016/j.phymed.2008.11.001, stránky 451-455.

29. **Williamson G, DuPont MS, Wanigatunga S, Heaney RK, Musk SRR, Fenwick GR, Rhodes MJC.** Induction of glutathione S'-transferase activity in hepG2 cells by extracts from fruits and vegetables. *Food Chem.* 1997, Sv. 60, 2, doi: 10.1016/s0308-8146(95)00255-3, stránky 157-160.

30. **Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R.** GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2005, Sv. 45, 1, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857 , stránky 51-88.

31. **GenScript. GenScript Make Research Easy.** [Online] 2002-2021. [Citace: 6. 5 2021.] [https://www.genscript.com/protein/Z02039-Glutathione\\_S\\_Transferase\\_GST\\_.html](https://www.genscript.com/protein/Z02039-Glutathione_S_Transferase_GST_.html).

32. **Neilson EH, Goodger JQ, Woodrow IE, Møller BL.** Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science.* 2013, Sv. 18, 5, doi: 10.1016/j.tplants.2013.01.001, stránky 250-258.

33. **Ashour Mohamed, Wink Michael, Gershenzon Jonathan.** Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition.* 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch5>.

34. **Otmar Froehlich, Takayuki Shibamoto.** Stability of pulegone and thujone in ethanolic solution. *J. Agric. Food Chem.* 1990, Sv. 38, 11, doi: 10.1021/jf00101a012, stránky 2057-2060.

35. **National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.** PubChem Compound Summary for CID 261491, Thujone. *PubChem.* [Online] 2004-2021. [Citace: 28. 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thujone>.

36. **Karin M. Höld, Nilantha S. Sirisoma, Tomoko Ikeda, Toshio Narahashi, and John E. Casida.**  $\alpha$ -Thujone (the active component of absinthe):  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *PNAS.* 2000, Sv. 97, 8, doi: 10.1073/pnas.070042397, stránky 3826-3831.

37. **Pelkonen, O., Abass, K., & Wiesner, J.** Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products. *Toxicological assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2013, Sv. 65, 1, doi: 10.1016/j.yrtph.2012.11.002 , stránky 100–107.

**38. Dettling A, Grass H, Schuff A, Skopp G, Strohbeck-Kuehne P, Haffner Th T.** Absinthe: attention performance and mood under the influence of thujone. *Journal of Studies on Alcohol*. 2015, Sv. 65, 5, doi: 10.15288/jsa.2004.65.573, stránky 573-581.

**39. achenmeier DW, Nathan-Maister D, Breaux TA, Sohnius EM, Schoeberl K, Kuballa T.** Chemical composition of vintage preban absinthe with special reference to thujone, fenchone, pinocamphone, methanol, copper, and antimony concentrations. *J Agric Food chem*. 14, 2008, Sv. 56, 9, doi: 10.1021/jf703568f, stránky 3073-3081.

**40. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.** PubChem. *PubChem Compound Summary for CID 7439, Carvone*. [Online] 2004-2021. [Citace: 29. 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvone>.

**41. Katerina Morcia, Giorgio Tumino, Roberta Ghizzoni, Valeria Terzi.** Carvone (Mentha spicata L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00035-3, stránky 309-316.

**42. Laska Matthias, Liesen Anne, Teubner Peter.** Enantioselectivity of odor perception in squirrel monkeys and humans. *REGULATORY AND INTEGRATIVE PHYSIOLOGY*. 1999, Sv. 277, 4, doi: 10.1152/ajpregu.1999.277.4.R1098.

**43. Alsanea, S., Liu. D.** BITC and S-Carvone Restrain High-Fat Diet-Induced Obesity and Ameliorate Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Pharmaceutical Research*. 2017, Sv. 34, doi: 10.1007/s11095-017-2230-3, stránky 2241-2249.

**44. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.** PubChem. *PubChem Compound Summary for CID 14525, Fenchone*. [Online] 2004-2021. [Citace: 29. 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenchone>.

**45. Surburg, Johannes Panten Horst.** Flavors and Fragrances, 1. General Aspects. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2015, doi: 10.1002/14356007.a11\_141.pub2.

**46. Keskin I, Gunal Y, Ayla S, Kolbasi B, Sakul A, Kilic U, Gok O, Koroglu K, Ozbek H.** Effects of Foeniculum vulgare essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing. *Biotechnic & Histochemistry*. 2017, Sv. 92, 4, doi: 10.1080/10520295.2017.1306882, stránky 274-282.

**47. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.** PubChem. *PubChem Compound Summary for CID 170833, (-)-Isopulegol*.

[Online] 2004-2021. [Citace: 30. 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-Isopulegol>.

**48. Andrade Próspero, D. F., Reis Filho, A. C., Piauilino, C. A., Lopes, E. M., de Sousa, D. P., & de Castro Almeida, F. R.** Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l -arginine. 2018, Sv. 293, doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.019, stránky 55-60.

**49. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.** PubChem. *PubChem Compound Summary for CID 61362, d-Piperitone*. [Online] 2004-2021. [Citace: 30. 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/d-Piperitone>.

**50. Pons, A., Lavigne, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D.** Identification and analysis of piperitone in red wines. *Food Chemistry*. 2016, Sv. 206, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.064 , stránky 191-196.

**51. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.** PubChem. *PubChem Compound Summary for CID 6432469, Isomenthone*. [Online] 2004-2021. [Citace: 31. 3 2021.] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2S\\_5S\\_-5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-one](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2S_5S_-5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-one).

**52. Singh, G.** *Chemistry of Terpenoids and Carotenoids*. místo neznámé : Discovery Publishing House p.41, 2007. 9788183562799.

**53. Riachi, L. G., & De Maria, C. A. B.** Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*. 1015, Sv. 176, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.028 , stránky 72-81.

**54. Lingxiang Ye, Yuesheng Zhang.** Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 22, 2001, 12, stránky 1987-1992.

**55. Lucie, Trnková.** *Interaction of proteins with low- molecular substances in vivo. effect of flycation, substances of plant origin, and combination of these factors on function and spectral properties of selected proteins*. [editor] Prof. MUDr. Jaroslav Dršata CSc. Hradec Králové : Karlova univerzita, Farmaceutická fakulta, Katedra biochemie, 2012.

**56. Kun Jiang, Xiaoyue Hou, Lu Han.** Fibroblast Growth Factor Receptor, a Novel Receptor. *Toxins*. 18, 2018, Sv. 12, 12, stránky 546, doi: 10.3390/toxins10120546.

**57. Berti, Frederico, Federico, Navarini, Luciano, Guercia, Elena Oreski.** Interaction of the Coffee Diterpenes Cafestol and 16-O-Methyl-Cafestol Palmitates with Serum Albumins. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*. 21, 2020, Sv. 5, str. doi: 10.3390/ijms21051823.

**58. Bártíková H., Hanušová V., Skálová L., Ambrož M., Boušová I.** Antioxidant, ProOxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Antioxidant*. 14, 2014, Sv. 22, stránky 2478-2494.

**59. Alvarez-Gonzales I., Madrigal-Bujaidar E., Castro-García S.** Antigenotoxic capacity of beta-caryophyllene in mouse, and evaluation of its antioxidant and GST induction. *The Journal of Toxicological Sciences*. 39, 2014, Sv. 6, stránky 849-859.

**60. Wallinder C, Sköld C, Sundholm S, Guimond MO, Yahiaoui S, Lindeberg G, Gallo-Payet N, Hallberg M, Alterman M.** High affinity rigidified AT2 receptor ligands with indane scaffolds. *Medchemcomm*. 18, 2019, Sv. 10, stránky 2146-2160. doi: 10.1039/c9md00402e. PMID: 32904210;.

**61. Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A.** Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today*. 2007, Sv. 1061, 7, stránky 23-24.

## 10 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1. Přístroj Monolith NT.115, převzato z (7) .....	11
Obrázek 2. A, schéma objektivu v MST; B, typický signál MST, převzato z (9).....	12
Obrázek 3. Výstup z MST vyjadřující závislost fluorescence na čase, jednotlivé křivky znázorňují změnu fluorescence na titraci proteinu ligandem. Část B vyjadřuje změnu fluorescence ku koncentraci ligandu, převzato z (9).....	13
Obrázek 4.. Krystalografická struktura GST, 2,68 Å, převzato z (24).....	18
Obrázek 5. Krystalografická struktura mGST, 1,90 Å, převzato z: (25).....	19
Obrázek 6. Chemická struktura thujonu, převzato z (35).....	22
Obrázek 7. Chemická struktura karvonu, převzato z (40).....	23
Obrázek 8. Chemická struktura fenchon, převzato z (44) .....	24
Obrázek 9. Chemická struktura isopulegolu, převzato z (47) .....	24
Obrázek 10. Chemická struktura piperitonu, převzato z (49) .....	25
Obrázek 11. Chemická struktura menthonu, převzato z (51).....	26
Obrázek 12. Nosič kapilár pro přístroj Monolith NT. 115 .....	35
Obrázek 13. Absorpční spektrum pro GST s terpeny v čase.....	38
Obrázek 14. Fluorescenční spektrum čistého HSA a HSA s isopulegolem v různých koncentracích. ....	39
Obrázek 15. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s (-)-karvonem v různých koncentracích .....	39
Obrázek 16. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s (+)-karvonem v různých koncentracích .....	40
Obrázek 17. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s fenchonem v různých koncentracích .....	40
Obrázek 18. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s piperitonem v různých koncentracích .....	41
Obrázek 19. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s thujonem v různých koncentracích .....	41
Obrázek 20. Fluorescenční spektrum HSA a HSA s isomenthonem v různých koncentracích .....	42
Obrázek 21. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s isopulegolem.....	43
Obrázek 22. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s (-)-karvonem.....	43
Obrázek 23. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s (+)-karvonem.....	44

Obrázek 24. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s fenchonem .....	44
Obrázek 25. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s piperitonem.....	45
Obrázek 26. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s thujonem .....	45
Obrázek 27. Fluorescenční spektrum RED-NHS a RED-NHS s isomenthonem.....	46
Obrázek 28. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M isopulegolem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu; Signal to Noise Ratio ukazuje rozptýl relativní fluorescence u GST a komplexu s terpenem .....	48
Obrázek 29. Výstup z Monolith NT. 115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M (-)-karvonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí- GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu.....	49
Obrázek 30. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M (+)-karvonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí- GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu.....	49
Obrázek 31. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M fenchonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu .....	50
Obrázek 32. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M piperitonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu.....	51
Obrázek 33. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M thujonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu.....	51
Obrázek 34. Výstup z Monolith NT.115, reakce mezi GST a $2 \cdot 10^{-6}$ M isomenthonem; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v pořadí-GST, komplex, směs ligandů, pufr; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u GST a komplexu.....	52
Obrázek 35. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi isopulegolu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenu - výstupem je hodnota $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu .....	53
Obrázek 36. Výstup z Monolith NT. 115, reakce mezi GST a různými koncentracemi (- )-karvonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenu - výstupem je hodnota $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků	

v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu ..... 54

Obrázek 38. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi (+)-karvonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu ..... 54

Obrázek 38. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi fenchonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu ..... 55

Obrázek 39. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi piperitonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu ..... 55

Obrázek 40. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi thujonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu ..... 56

Obrázek 41. Výstup z Monolith NT. 115- reakce mezi GST a různými koncentracemi isomenthonu; Dose response graf vyjadřuje míru závislosti na relativní fluorescence na koncentraci terpenů - výstupem je hodnota  $K_d$ ; graf Capillary scan ukazuje míru fluorescence vzorků v závislosti na koncentraci terpenů; MST Traces ukazuje rozdíl relativní fluorescence u jednotlivých koncentrací komplexu ..... 57



## 1 1 Seznam použitých tabulek

Tabulka 1. Dělení terpenů na základě počtu izoprenových jednotek, převzato z (33).	21
Tabulka 2. Dělení terpenů na základě chemických vlastností a příklady, převzato z (33) .....	21
Tabulka 3. Objem terpenů pro přípravu 1 ml $4 \cdot 10^{-5}$ M roztoku.....	29
Tabulka 4. Specifická aktivita GST a její inhibice studovanými terpeny .....	37
Tabulka 5. Hodnoty $K_d$ pro jednotlivé komplexy GST s terpeny .....	57