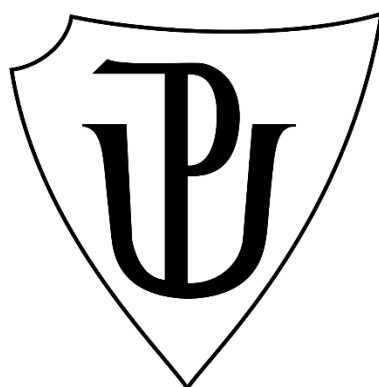


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Měření aktivity zinkové proteasy Zmp1 z *Mycobacterium tuberculosis* pomocí MALDI-TOF MS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Severinová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Šebela Marek, prof. Mgr. Dr.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych vyjádřit vděčnost svému školiteli prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu, vstřícnost, připomínky, pomoc a čas, který mi věnoval při vypracovávání bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Severinová
Název práce	Měření aktivity zinkové proteasy Zmp1 z <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pomocí MALDI-TOF MS
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Šebela Marek, prof. Mgr. Dr.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Zmp1 je enzym, jenž podporuje šíření *Mycobacterium tuberculosis* v těle hostitele a vznik granulomu chránícího infikované makrofágy před útoky imunitního systému. Tuberkulóza je závažné onemocnění, kterým se každoročně nakazí 7,5 milionu lidí. Léčbu komplikuje narůstající počet mykobakteriálních kmenů rezistentních vůči současným antituberkulotikům. V současné době je vyvíjena snaha syntetizovat nové látky zabraňující působení *M. tuberculosis*. Tato práce je zaměřena na indolové hydroxamáty inhibující aktivitu enzymu Zmp1. Účinnost jednotlivých látek na inhibici mykobakteriálního enzymu Zmp1 je zjištěna pomocí MALDI ToF hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova	MALDI ToF, enzymová aktivita, Zmp1, tuberkulóza, měření aktivity, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Severinová
Title	Measurement of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> zinc protease Zmp1 activity by MALDI-TOF MS
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Šebela Marek, prof. Mgr. Dr.
The year of presentation	2024

Abstract

Zmp1 is an enzyme that promotes the spread of *Mycobacterium tuberculosis* in the host body and the formation of a granuloma that protects infected macrophages from immune attacks. Tuberculosis is a serious disease that infects 7.5 million people each year. Treatment is complicated by the increasing number of mycobacterial strains resistant to current antituberculosis drugs. Efforts are currently underway to synthesise new agents to inhibit *M. tuberculosis*. This bachelor thesis focuses on indole-hydroxamates that inhibit the activity of the Zmp1 enzyme. The efficacy of each compound to inhibit the mycobacterial Zmp1 enzyme is analyzed by MALDI ToF mass spectrometry.

Keywords	MALDI ToF, enzyme activity, Zmp1, tuberculosis, measurement of activity, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Enzymy	2
2.2	Enzymová katalýza	4
2.3	Enzymová aktivita	5
2.4	Metody měření enzymové aktivity	7
2.4.1	Optické metody	7
2.4.2	Elektrochemické metody.....	9
2.4.3	Gelová elektroforéza	9
2.4.4	Kapilární elektroforéza.....	9
2.4.5	Kapalinová chromatografie.....	10
2.5	Využití hmotnostní spektrometrie	11
2.5.1	Kvantifikace proteinů.....	11
2.5.2	Ionizační techniky využívané v proteomice.....	13
2.5.3	Využití hmotnostní spektrometrie ke stanovení aktivity enzymů.....	13
2.6	Zmp1	16
2.6.1	Působení Zmp1	16
2.6.2	Struktura Zmp1	18
2.6.3	Inhibitory Zmp1	18
2.7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>, tuberkulóza	20
2.7.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
2.7.2	Robert Koch – objevitel původce tuberkulózy.....	23
2.7.3	Tuberkulóza.....	25
2.7.4	Vakcíny proti tuberkulóze.....	28
2.8	Léčiva proti tuberkulóze	29
2.8.1	Léčiva první linie	29
2.8.2	Léčiva druhé linie.....	30
2.8.3	Nedávno schválená léčiva	31
2.8.4	Vyvíjená léčiva.....	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	Materiál	34
3.1.1	Chemikálie	34
3.1.2	Přístroje	34
3.1.3	Inhibitory Zmp1	34

3.1.4	Použitý software.....	36
3.2	Metody.....	36
3.2.1	Stanovování aktivity Zmp1 pomocí MALDI-TOF MS	36
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	38
4.1	Stanovení aktivity Zmp1 v přítomnosti inhibitoru	38
4.1.1	Optimalizace aktivity enzymu.....	38
4.1.2	Stanovení aktivity Zmp1	41
5	ZÁVĚR	46
6	LITERATURA.....	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	52

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Zpracování literární rešerše na téma:

1. Enzymy
2. Enzymová katalýza
3. Enzymová aktivita, substráty a inhibitory
4. Metody měření enzymové aktivity
5. Využití hmotnostní spektrometrie
6. Využití MALDI
7. Proteasa Zmp1
8. Mykobaktérie, tuberkulóza
9. Léčiva proti tuberkulóze

Praktická část:

Měření aktivity Zmp1 pomocí MALDI hmotnostní spektrometrie v přítomnosti syntetických látek, které jsou předpokládanými inhibitory Zmp1.

1 ÚVOD

Tuberkulóza je infekční onemocnění, způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, kterou za původce této závažné choroby označil v roce 1882 Robert Koch (Lagerkvist, 2003; Pieters, 2008). Díky mykobakteriální buněčné stěně se jedná o velmi houževnatý patogen, schopný odolávat imunitnímu systému hostitele a přetrvávat v něm i několik desetiletí v podobě tzv. granulomu (Pieters, 2008; Abrahams a Besra, 2018; Kalscheuer et al., 2019; Miggiano et al., 2020). Zdraví jedinci vystavení *M. tuberculosis* jsou schopni onemocnění kontrolovat a nevyskytují se u nich žádné příznaky. Dojde-li však k narušení imunity, může se tuberkulóza plně rozvinout a způsobit smrt jedince (Pieters, 2008; Sia & Rengarajan, 2019; WHO, 2023).

Každoročně se celosvětově objeví více než 7,5 milionů nových případů tuberkulózy. Jedná se o velmi závažné onemocnění a až do příchodu pandemie koronaviru (COVID-19) bylo považováno za hlavní příčinu úmrtí v důsledku jediné choroby (WHO, 2023).

Nesprávně zvolená léčba vede ke vzniku rezistentních mykobakteriálních kmenů, které znesnadňují léčbu a vymýcení tohoto onemocnění (Joshi, 2011). Obzvláště nebezpečná je tuberkulóza způsobená bakteriemi odolnými vůči antituberkulotikům první a druhé linie (Bahuguna & Rawat, 2019).

Je proto nutné zaměřit se na hledání nových terapeutických míst *M. tuberculosis*, aby mohla být vyvinuta účinnější a méně zdraví škodlivá léčiva. Jednou z Achillových pat mykobakterií je enzym Zmp1, který je řazen do rodiny peptidas M13 se sekvenčním motivem katalytického místa HExxH (Petrera et al., 2012). Zmp1 podporuje šíření patogenu v těle hostitele a vznik granulomu chránícího infikované makrofágy před útoky imunitního systému (Guirado & Schlesinger, 2013; Vemula et al., 2016). Dalším obranným mechanismem *M. tuberculosis* s pomocí Zmp1 je inhibice kaspasy-1 přeměňující pro-IL-1 β na IL-1 β . Což má za následek zabránění vzniku zánětu a odstranění patogenu z těla hostitele (Master et al., 2008; Schroder & Tschopp, 2010).

V posledních deseti letech byla vyvinuta řada inhibitorů Zmp1 s různorodou strukturou (Mori et al., 2014; Subhedar et al., 2016; Subhedar et al., 2017; Mori et al., 2018; Paolino et al., 2018; Šlachťová et al., 2020, Dak et al., 2022).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Enzymy

Enzymy jsou katalyzátory chemických reakcí v biologických systémech. Slovo enzym použil v roce 1877 W. Kühne a znamená „v kvasinkách“. Z definice jsou enzymy proteinové povahy, ale jsou známy i molekuly RNA s katalytickou funkcí zvané ribozymy (Kodíček et al., 2018). Mnoho enzymů obsahuje neproteinovou složku (kofaktor či koenzym), bez které ztrácí katalytickou aktivitu. Neaktivní proteinová složka takového složeného enzymu se nazývá apoenzym. Proteinovou složku s navázaným koenzymem označujeme jako holoenzym. Kofaktorem mohou být kovové ionty nebo organické molekuly – koenzymy. Nelze-li bez poškození enzymu odstranit koenzym, jedná se o prostetickou skupinu (Palmer & Bonner, 2007).

V počátcích výzkumu byly enzymům přiřazovány triviální názvy, např. pepsin A (EC 3.4.23.1) nebo trypsin (EC 3.4.21.4). Později byly enzymy pojmenovávány podle substrátu nebo charakteru katalyzované reakce, ke kterým byla přidána koncovka -asa. V roce 1961 bylo zavedeno systematické názvosloví. Enzymům byl přiřazen čtyřmístný číselný kód EC. První číslice znázorňuje třídu enzymu, druhá podtřídu, třetí skupinu a poslední číslice označuje pořadí enzymu ve skupině. Třídy enzymů jsou uvedeny v Tab.1 (Kodíček et al., 2018).

Tab. 1: Třídy enzymů s uvedeným typem katalyzované reakce a příkladem enzymu. Vytvořeno podle Kodíček et al. (2018).

Třída enzymů	Typ katalyzované reakce	Příklad enzymu
Oxidoreduktasy	Oxidačně-redukční	alkohol:NAD ⁺ oxidoreduktasa Alkoholdehydrogenasa EC 1.1.1.1
Transferasy	Přenos funkčních skupin	peptidyl-tRNA:aminoacyl-tRNA N-peptidyltransferasa Peptidyltransferasa EC 2.3.2.12
Hydrolasy	Hydrolýza	4- α -D-glukanglukanohydrolasa α -amylasa EC 3.2.1.1
Lyasy	Eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb	2-oxo-acid karboxy-lyasa Pyruvatdekarboxylasa EC 4.1.1.1
Isomerasy	Izomerace	Alanin racemasa Alaninracemasa EC 5.1.1.1
Ligasy	Tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP	acetyl-CoA:hydrogenkarbonat ligasa AcCoA-karboxylasa EC 6.4.1.2
Translokasy	Aktivní transport látek	ferrocytochrome-c:oxygen oxidoreduktasa Cytochrom C oxidasa EC 7.1.1.9

2.2 Enzymová katalýza

Enzymy jsou katalyzátory zvyšující rychlost chemické reakce snížením aktivační energie. Při katalýze se nemění rovnovážná konstanta. Aktivační energie je snížena alternativním sledem reakcí, kdy každá z dílčích reakcí má nižší aktivační energii než reakce nekatalyzovaná (Kodíček et al., 2018).

Enzymová katalýza se vyznačuje vysokou účinností a specifitou průběhu. Enzymy vykazují specifitu k typu katalyzované reakce a k substrátu.

Německý chemik Emil Fischer zjistil, že enzymy tvoří se svými substráty komplex enzym-substrát. Formuloval myšlenku, že specifita, se kterou enzymy rozpoznávají substrát, se dá přirovnat k zámku a klíči (Murray et al., 2009). Substrát se váže na enzym v aktivním místě, které obsahuje vazebné skupiny, obvykle postranní řetězce aminokyselin (Kodíček et al., 2018). Hypotéza zámku a klíče předpokládá neměnnost aktivního místa, ale nedokáže vysvětlit dynamické změny při katalýze. Americký biochemik Daniel Koshland formuloval hypotézu indukovaného přizpůsobení, která byla potvrzena biofyzikálními studiemi (Murray et al., 2009).

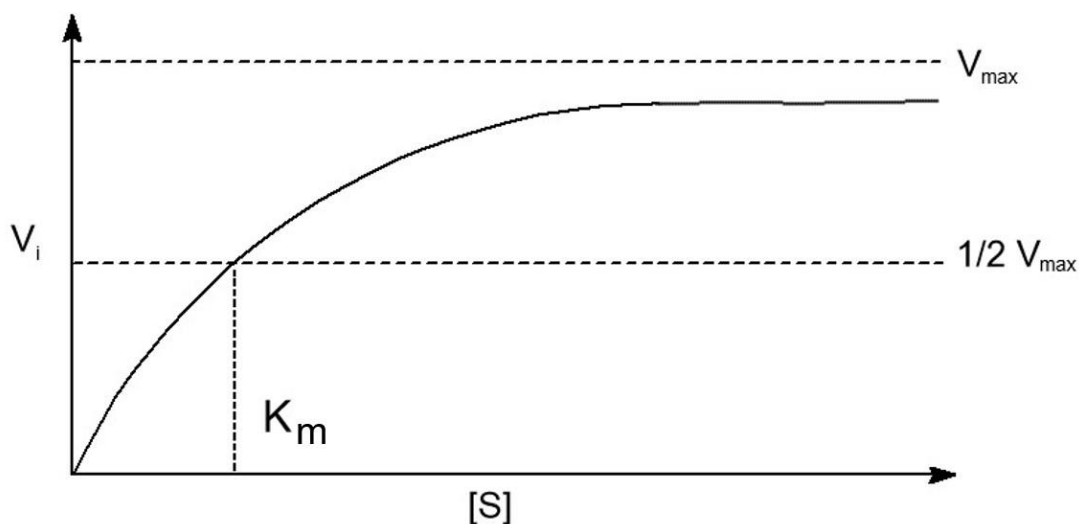
2.3 Enzymová aktivita

Katalytická aktivita vyjadřuje množství aktivního enzymu. Jednotkou je katal (kat) nebo také mezinárodní jednotka U („International Unit“). Vztah mezi jednotkami: $1\text{U} = 16,67 \cdot 10^{-9} \text{kat}$ (Kodíček et al., 2018).

Se vzrůstající koncentrací substrátu roste počáteční rychlost enzymově katalyzované reakce až do chvíle, kdy je enzym nasycen substrátem. Další zvyšování koncentrace substrátu rychlost reakce neovlivní a naměřená rychlost dosahuje své maximální hodnoty. Grafické vyjádření závislosti aktivity enzymu na koncentraci substrátu je znázorněno na Obr. 1. Matematicky lze závislost počáteční rychlosti vyjádřit pomocí rovnice Michaelise-Mentenové:

$$v_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Michaelisova konstanta K_m má hodnotu koncentrace substrátu, při níž je počáteční rychlost reakce v_i rovna polovině maximální rychlosti ($V_{max}/2$) (Murray et al., 2009).



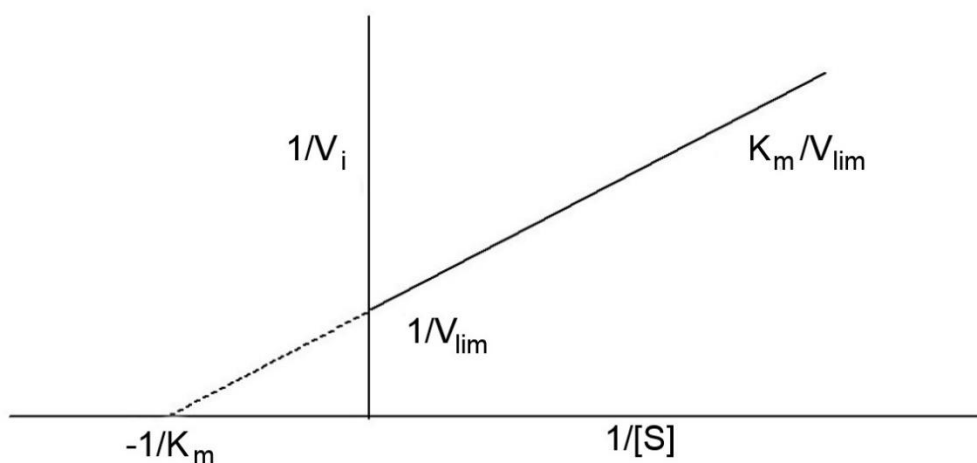
Obr. 1: Graf závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu – saturační křivka. Vytvořeno podle Murray et al. (2009).

Pro přímé odečtení hodnot V_{max} a následné vypočítání K_m je výhodné převést rovnici na lineární tvar:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Naměřené hodnoty vynesené do grafu tvoří přímku, která protíná osu x v bodě $1/V_{max}$ a směrnice přímky odpovídá K_m/V_{max} . Tento graf nazýváme Lineweaverův-Burkův (Obr. 2) (Murray et al., 2009).

Enzymová aktivita je ovlivňována řadou faktorů. Patří mezi ně teplota, tlak, pH, iontová síla a koncentrace substrátu, kofaktoru a inhibitoru (Koolman & Röhm, 2009). Rychlost enzymově katalyzované reakce roste se zvyšující se teplotou, avšak po dosažení určité teploty opět postupně klesá. Pokles rychlosti při vyšší teplotě je způsoben tepelnou denaturací enzymu. Optimální teplota pro působení enzymu je odvozena z rovnováhy mezi nárůstem a poklesem rychlosti reakce (Suzuki, 2015). Závislost aktivity na hodnotě pH, vyneseme-li ji do grafu, má zvonovitý tvar křivky. Jedná se o důsledek přítomnosti ionizovatelných aminokyselin ovlivňujících katalýzu (Koolman & Röhm, 2009).



Obr. 2: Lineweaverův-Burkův graf. Vytvořeno podle Murray et al. (2009).

2.4 Metody měření enzymové aktivity

K měření aktivity enzymu je možné použít několik alternativních metod. Výběr mezi nimi může být proveden na základě dostupnosti vhodného vybavení a činidel, úrovně požadované citlivosti, ceny nebo možnosti automatizace (Tipton, 2001).

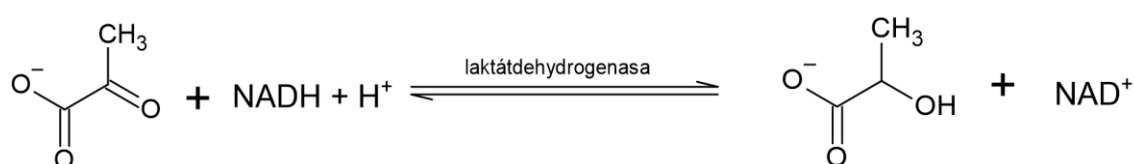
Měření enzymové aktivity slouží ke stanovení množství enzymu ve vzorku nebo k identifikaci enzymu a k prokázání jeho přítomnosti nebo nepřítomnosti ve vzorku (Bisswanger, 2012).

2.4.1 Optické metody

V biochemických a biologických laboratořích se rutinně používají optické metody. Výzkumníci v nich našli zalíbení, jelikož poskytují přesné a reprodukovatelné výsledky u velkého počtu vzorků, jsou velmi praktické a časově nenáročné. Princip spočívá ve změně optických vlastností vzorku při enzymaticky katalyzované přeměně substrátu na produkt (John, 2001).

2.4.1.1 Spektrofotometrie

U spektrofotometrických metod dochází ke změně intenzity světla po průchodu vzorkem v důsledku absorpce UV/VIS světla chromoforem. Pomocí spektrofotometrie lze testovat velkou řadu enzymů. Jedním z nejčastěji testovaných enzymů je (S)-laktát:NAD⁺ oxidoreduktasa (laktátdehydrogenasa, LD, EC 1.1.1.27), jejíž přítomnost v séru vypovídá o poškození tkáně. Metoda je založená na měření poklesu absorbance při 340 nm, který nastává při oxidaci NADH (Obr. 3) (John, 2001; Elbossaty, 2017).



Obr. 3: Přeměna pyruvátu na laktát doprovázená poklesem absorbance při 340 nm. Vytvořeno podle John (2001).

Celou řadu dehydrogenas je možné použít ve sdružených reakcích. Příkladem může být (S)-2-hydroxyglutarát:akceptor 2-oxidoreduktasa (hydroxyglutarátdehydrogenasa, HGDH, EC 1.1. 99.2), která je použita při stanovení L-aspartát: 2-oxoglutarát aminotransferasy (aspartátaminotransferasa, EC 2.6.1.1). V prvním kroku vzniká 2-oxalacetát, jež je redukován hydroxyglutarátdehydrogenasou na 2-hydroxyglutarát. Zároveň dojde k úbytku NADH, který se projeví poklesem absorbance při 340 nm (Yagi et al., 1979).

Pokud reakce neposkytuje měřitelnou změnu absorbance, používají se syntetické chromogenní substráty, jejichž absorpční vlastnosti se mění v důsledku enzymové reakce (Reymond et al., 2008).

Triacylglycerolacylhydrolasu (lipasa, E.C. 3.1.1.3) je možné stanovit pomocí žlutého chromogenního substrátu p-nitrofenolu, který vzniká přeměnou nitrofenolového derivátu s alifatickým acylovým řetězcem, např. p-nitrofenyl palmitátu (Hernández-Garceía et al., 2017) nebo p-nitrofenyl kaprylátu (Bendicho et al., 2001). P-nitrofenol je měřen spektrofotometricky při 410 nm (Reymond et al., 2008).

Monooxidasy přeměňují naftalen na naftol, který reaguje s diazoniovými solemi prostřednictvím aromatické substituce na barevný produkt snadno detekovatelný UV/Vis spektroskopii (Baskaran et al., 2023).

Dalším příkladem je Ellmanovo činidlo (kyselina dithio-bis(2-nitrobenzoová), DTNB) pomocí něhož se stanovuje aktivita acetylcholinacetylhydrolasy (acetylcholinesterasa, ACHE, EC 3.1.1.7) (Ellman et al., 1961, John, 2001).

2.4.1.2 Spektrofluorimetrie

Pokud reakce vede ke změně fluorescence jednoho ze substrátů je možné použití fluorimetrických testů. Při fluorescenci elektrony excitují do vyšších energetických hladin a následně dochází k vyzáření energie v podobě světla. Při návratu do základního stavu dochází k energetickým ztrátám způsobených vibracemi. Vyzářené světlo má nižší energii, ale zato vyšší vlnovou délku než světlo excitované. V přírodě je pouze malé množství sloučenin využitelných pro fluorescenční testy (John, 2001), proto se používají fluorogenní substráty, např. kumarin, fluorescein, rhodamin, bor-dipyrrometheny (BODIPY) (Reymond et al, 2008).

Pro stanovení aktivity acetylcholinesterasy byla vyvinuta spektrofluorimetrická metoda, jež je o dva řády citlivější než dříve zmíněná Ellmanova metoda. Využívá fluorogenní thiolovou sloučeninu („Calbiochem probe IV“), která je odvozena

od kumarinu. Sloučenina reaguje s látkami obsahující thiolovou funkční skupinu za vzniku fluorescenční sloučeniny (Mukhametgalieva et al., 2020).

2.4.1.3 Turbidimetrie

Při turbidimetrii je měřen rozptyl světla způsobený částicemi přítomnými v roztoku (John, 2001). Metoda je využitelná pro enzymy degradující nerozpustné polymery.

Uvést můžeme peptidoglycan N-acetylmuramoylhydrolasu (lysozym, EC 3.2.1.17), která štěpí β -(1 \rightarrow 4) glykosidovou vazbu mureinu obsaženého v buněčné stěně. Degradace polysacharidu vede k vyčerení roztoku a tím i ke změně rozptylu světla (Mörsky, 1983). Analogicky lze testovat i enzymy hydrolyzující syntetické plasty (Belisário-Ferrari et al., 2019).

2.4.2 Elektrochemické metody

Pro biochemické testy aktivity enzymů se nejčastěji používá Clarkova elektroda, která byla popsána v roce 1956. Skládá se z platinové katody, která má záporné napětí v rozmezí 0,6–0,9 V vzhledem k referenční elektrodě Ag/AgCl. Elektrody jsou spojeny přes vrstvu KCl. Celá elektroda je pokryta tenkou polyethylenovou nebo teflonovou membránou, která je propustná pro kyslík, ale nepropustná pro vodu a rozpuštěné látky. Kyslík v měřeném roztoku podléhá na katodě elektrolytické redukci za vzniku proudu. Produkovaný proud je úměrný obsahu kyslíku. Pomocí kyslíkové elektrody jsou běžně testovány oxidasy nebo hydrogen-peroxid:hydrogen-peroxid oxidoreduktasa (katalasa, CAT, EC 1.11.1.6) (del Río et al., 1977; Clark, 2001).

2.4.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza neslouží přímo ke stanovení aktivity enzymu, ale k detekci enzymu ve vzorku. Tímto způsobem lze vizualizovat působení aminoaldehyddehydrogenas (AMADH, EC 1.2.1.-) v rostlinných tkáních hrachu setého. Separace probíhá v nenedenaturujících podmínkách pomocí gelové elektroforézy. Aminoaldehyddehydrogenasu je možno vizualizovat díky schopnosti enzymu redukovat tetrazoliové soli. Reakcí vzniká fialově zbarvený formazán (Šebela et al., 2001).

2.4.4 Kapilární elektroforéza

Již více než 30 let se k enzymatické analýze využívá kapilární elektroforéza. Banke et al. (1991) ji použili při testování alkalických proteas. Jedná se o analytickou separační techniku, kdy se substráty a produkty dělí na základě jejich rozdílné

pohyblivosti v elektrickém poli. Mezi výhody této techniky se řadí vysoká účinnost separace, krátká doba analýzy a malá spotřeba vzorku a potřebných chemikálií. Rozlišují se dva typy kapilární elektroforézy: (i) prekapilární (offline), kdy se enzym, substrát, kofaktory a další nezbytné složky smíchají před injekcí do kapiláry, (ii) u in-kapilární (online) elektroforézy probíhá enzymatická reakce ve stejné kapiláře jako následná separace analytu. In-kapilární testy se označují také jako elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza („electrophoretically mediated Microanalysis“ - EMMA) (Banni & Nehmé, 2022). Kapilární elektroforéza byla použita např. pro stanovení aktivity trypsinu (Yang et al., 2010), α -D-glukosidglukohydrolasy (α -glukosidasa, EC 3.2.1.20) (Iqbal et al., 2013) nebo laktátdehydrogenasy (Zhao et al., 2012).

2.4.5 Kapalinová chromatografie

První práce využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii („High-performance liquid chromatography“, HPCL) se objevily koncem 70. letech minulého století (Lambeth & Muhonen, 1994). Kapalinová chromatografie je fyzikální separační technika, kdy se vzorek separuje na jednotlivé složky rozdělením mezi mobilní fázi (kapalina, např. hexan) a stacionární fázi (sorbenty naplněné uvnitř kolony, např. porézní částice oxidu křemičitého) (Dong, 2006). Pomocí HPCL byl studován vliv extraktů a výtažku z květin na amine:oxygenoxidoreduktasu (monoaminoxidasa, MAO, EC 1.4.3.4), která katalyzuje oxidační deaminaci aminů a neurotransmiterů serotoninu, dopaminu, norepinefrinu, tyraminu, tryptaminu a neurotoxinu MPTP (4-fenyl-1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) (Herraiz & Guillén, 2018).

2.5 Využití hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie našla široké uplatnění při analýze biologických vzorků, především proteinů. Slouží nejen k jejich identifikaci, ale i ke stanovení jejich množství ve vzorku.

2.5.1 Kvantifikace proteinů

Kvantifikace proteinů je ztížena řadou fyzikálně chemických vlastností proteolytických enzymů (např. velikost, náboj, hydrofobnost), které vedou k velkým rozdílům v odezvě hmotnostního analyzátoru. K získání správného množství proteinu ve vzorku je nutné porovnání mezi experimenty. Především se používají izotopicky značené peptidy, které jsou chemicky totožné se svojí nativní formou. Oba peptidy se při hmotnostní analýze chovají identicky. Kvantifikace je dosaženo porovnáním intenzit signálu značeného a neznačeného peptidu, jelikož hmotnostní analyzátor dokáže rozpoznat hmotnostní rozdíl obou peptidů. Izotopové značení může být do peptidu zavedeno metabolicky, chemicky, enzymaticky nebo jako externí standart pomocí obohacených syntetických peptidů (Bantscheff et al., 2007).

2.5.1.1 Metabolické značení

Při metabolickém značení je daný organismus kultivován v růstovém mediu bohatém na izotopicky značené aminokyseliny. Organismus během buněčného dělení a růstu zabudovává značené aminokyseliny do svého proteomu. Používaná je technika SILAC („stable isotope labelling of amino acids in cell culture“), kdy medium obsahuje ^{13}C nebo ^{15}N značený Arg a Lys. Po štěpení trypsinem obsahují peptidy alespoň jednu značenou aminokyselinu (Bantscheff et al., 2007; Bantscheff et al., 2012).

2.5.1.2 Enzymové značení

Značení již syntetizovaných proteinů a peptidů je uskutečněno chemicky nebo enzymaticky. Pomocí proteolytického štěpení v izotopicky značené vodě je na C-konec fragmentu začleněn izotop ^{18}O . Následkem toho dojde k posunu hmoty ze 1046,5 Da na 1048,5 Da (tedy o 2 Da) (Mirgorodskaya et al., 2000; Bantscheff et al., 2007).

2.5.1.3 Chemické značení

Chemická značka se váže na reaktivní postranní řetězce aminokyselin. Používá se převážně technika ICAT („isotope-coded affinity tag“), kdy je na postranní řetězec Cys

navázána značka obsahující atomy deuteria a biotin sloužící k následnému přečištění modifikovaného peptidu. Na N-konec peptidů a postranní řetězec Lys (na primární aminy) se zaměřují techniky ICPL („isotope-coded protein label“), TMTs („tandem mass tags“) a iTRAQ („isobaric tags for absolute and relative quantification“). Značky používané v těchto technikách jsou tzv. izobarické. Peptidy s rozdílným značením mají stejnou hmotnost. Proto lze takto modifikované peptidy rozlišit až po jejich fragmentaci uvnitř hmotnostního spektrometru (Bantscheff et al., 2007; Bantscheff et al., 2012).

2.5.1.4 „Label-free“ kvantifikace

Použití izotopicky značeného peptidu je však velmi složité, časově a finančně náročné, proto byla vyvinuta kvantifikace bez izotopicky značených standardů („label-free“). Je založena na dvou odlišných přístupech. V prvním je porovnávána intenzita signálu iontových prekurzorů měřená pomocí LC-MS/MS. Relativní kvantifikace je dosaženo porovnáním hodnoty intenzity jednotlivých peptidů s příslušnými signály v experimentech následujících. Druhý přístup vychází z předpokladu, že čím větší je množství konkrétního proteinu přítomno ve vzorku, tím více peptidových fragmentů daného proteinu změříme pomocí hmotnostní spektrometrie. Relativní kvalifikaci získáme porovnáním spekter mezi sadou experimentů (Bantscheff et al., 2007).

2.5.1.5 Absolutní kvantifikace

Právě zmíněné techniky vedou k relativní kvantifikaci proteinů. Nesdělí nám přesné množství analytu v biologickém vzorku. Pouze porovnávají množství analytu ve vzorcích. Přesné množství analytu získáme pomocí absolutní kvantifikace, jejíž nejjednodušší formou je přidání známého množství značeného peptidu k analyzovanému peptidu. Následuje porovnání hmotnostních spekter analytu a přidaného peptidu. Tato technika je známá jako AQUA („absolute quantification approach“). V současnosti jsou na trhu dostupné komerční peptidy pro techniku AQUA, ale jsou relativně drahé. Praktická nevýhoda v jejím použití spočívá v tom, že je potřeba správně odhadnout, kolik značeného standardu je potřeba přidat do vzorku. Současně je třeba omezit manipulaci se vzorkem před přidáním vnitřního standardu, jelikož může dojít k systematickým chybám, např. ztrátám vzorku (Bantscheff et al., 2007; Bantscheff et al., 2012).

2.5.2 Ionizační techniky využívané v proteomice

Hmotnostní spektrometr je zařízení sloužící k měření poměru hmotnosti iontu ku náboji (m/z). V iontovém zdroji jsou molekuly analytu převedeny na ionty v plynné fázi. Hmotnostní analyzátor dělí vzniklé ionty podle jejich m/z . Separované ionty jsou zaznamenány v detektoru. K měření proteinů se používají měkké ionizační techniky, při kterých dochází k minimální disociaci analyzovaných molekulárních iontů. Především se jedná o MALDI („matrix assisted laser desorption/ionization“) a ESI („electrospray ionization“) (Han et al., 2008).

2.5.2.1 ESI

ESI je měkká ionizační technika, při které je vzorek rozpuštěný v těkavém rozpouštědle rozprašován pomocí kapiláry. Vzniklý aerosol je vysoušen a v jednotlivých kapičkách roste hustota náboje do takové míry až nastane exploze, při které se uvolní ionty. Vzniklé ionty vstupují do hmotnostního analyzátoru. Hmotnostní spektrometrie využívající jako iontový zdroj elektrosprej (ESI) má nízkou toleranci vůči solím přítomným v reakční směsi. Nutné je proto spojení s jednou ze separačních technik, např. kapalinovou chromatografií (Fenn et al., 1989; Bungert et al., 2004).

2.5.2.2 MALDI

Vzorek pro MALDI analýzu se typicky připravuje smísením roztoku analytu a matrice. Běžně používanými matricemi jsou kyselina sinapová (SA), α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoová (DHB). Směs se následně umístí na ocelovou destičku a rozpouštědlo se nechá odpařit při pokojové teplotě. Uvnitř hmotnostního spektrometru je na vzorek směřován v pulzující laser. Matrice sublimuje a současně desorbuje a ionizuje molekuly analytu. Metoda přípravy vzorku by měla být, co nejjednodušší a co nejvíce reprodukovatelná. Je třeba vhodně zvolit matrici, koncentraci, rozpouštědlo, podmínky krystalizace a výkon laseru (Karas & Hillenkamp, 1988; Duncan et al., 2008).

2.5.3 Využití hmotnostní spektrometrie ke stanovení aktivity enzymů

Měření aktivity enzymů pomocí spektrofotometrických metod je velmi rozšířené. Analýza je rychlá a jednoduchá. Pro měření jsou potřeba substráty, které během přeměny mění své optické vlastnosti. Ve většině případů ale musíme sáhnout po umělých substrátech, které na rozdíl od těch nativních, mají chromoforickou nebo fluoroforickou

skupinu. Nevýhoda umělých substrátů spočívá v tom, že se při jejich použití vystavujeme riziku získání chybných výsledků (Bungert et al., 2004).

Hmotnostní spektrometrie je jednou z alternativních metod měření aktivity enzymů a screeningu inhibitorů. Je použitelná pro všechny enzymatické reakce, při kterých dochází ke změně hmotnosti při přeměně substrátu na produkt. Při jejím použití můžeme využít nativní substrát námi studovaného enzymu. Není nutné značení nebo derivatizace analyzované sloučeniny (Guidot et al., 2017).

MALDI se v posledních letech stala slibným nástrojem pro kvantifikaci nízkomolekulárních produktů enzymů. Na popularitě nabyla díky citlivosti (lze detekovat peptidy v řádech femtomolů), jednoduchosti a rychlosti analýzy. To je žádoucí při studiích s vysokým počtem vzorků, kdy je preferována co nejkratší a nejjednodušší příprava vzorku a jeho následné měření („mix-and-measure“). Oba tyto procesy mohou být automatizovány. Ve spojení s výkonnými hmotnostními analyzátoři TOF („time-of-flight“) se z MALDI stává vhodný nástroj pro studium enzymů sloužících jako cíl vyvíjeného léčiva (Guitot et al., 2014; Machálková et al., 2018).

MALDI byla zpočátku kritizována za svoji nereprodukovatelnost způsobenou nehomogenní distribucí analytu a matrice ve vzorku. Intenzita signálu analytu se liší nejen mezi jednotlivými vzorky, ale i v jednotlivých místech, kam dopadá laser. Problém lze vyřešit pečlivou přípravou vzorku (analyt je třeba homogenně smísit s matricí), použitím vnitřního standardu nebo normalizací mezi substrátem a produktem. (Bungert et al., 2004; Machálková et al., 2018).

Vnitřní standard by měl být chemicky identický s analyzovaným peptidem a mít stejnou ionizační účinnost, aby bylo možné porovnat intenzitu hmotnostního spektra obou peptidů. Pro přesnou kvantifikaci se využívají stabilní izotopicky značené peptidy, jelikož v MALDI MS analýze reagují identicky (Bungert et al., 2004).

Kromě použití izotopicky značeného vnitřního standardu jsou vyvíjeny jiné způsoby značení. Například použití peptidu lišícího se jednou aminokyselinou v sekvenci. Substrát SEVNLDAEFR je proteolyticky štěpen pomocí β -sekretasy (BACE1, EC 3.4.23.46) na dva pentapeptidy, SEVNL a DAEFR. Jako vnitřní standard byl použit strukturně podobný peptid DGEFR (Machálková et al., 2018). Peptidy obsahující Cys mohou být kvantifikovány pomocí benzochinonu a methyl-p-benzochinonu. Benzochinon je navázán na známé množství peptidu obsahujícího Cys, který plní funkci vnitřního standardu. Methyl-p-benzochinon je navázán na peptid obsažený ve vzorku (Ma et al., 2014). Na Cys zbytek cílí také technika DuMal („dual

maleimide tagging“), při které se na Cys váže N-methylmaleimid nebo N-ethylmaleimid. Princip kvantifikace je obdobný jako u předešlé techniky. Kterýkoli z derivátů navázaný na známé množství peptidu může sloužit jako vnitřní standard (Ouyang et al., 2018; Ouyang et al., 2019). Ling et al. (2019) ve své práci určili aktivitu trypsinu (EC 3.4.21.4) a chymotrypsinu (EC 3.4.21.1) pomocí pyrenové sondy navázané na štěpený peptid (Py-GGGGRG, resp. Py-GGGGGGYG). Postup byl použit i při screeningu inhibitorů trypsinu a k přesnému určení aktivity trypsinu v moči. Při zvolení vhodné peptidové sekvence lze pyrenovou sondu použít i pro další proteasy.

Relativní enzymatickou aktivitu je možné určit pomocí poměru substrátů a produktů. Tento postup pro stanovení aktivity enzymu a screeningu inhibitorů je výhodnější, protože nevyžaduje vnitřní standard. Z toho plyne úspora času potřebného k syntéze vhodného vnitřního standardu a finančních prostředků (Greis et al., 2006; Guitot et al., 2014).

2.6 Zmp1

Zmp1 patří do rodiny peptidas M13, které mají sekvenční motiv katalytického místa HExxH (Petrera et al., 2012). Kromě Zmp1 spadají do této skupiny např. neprilysin (EC 3.4.24.11) a endothelin-konvertující enzym 1 (ECE-1, EC 3.4.24.71) (Ferraris et al., 2011).

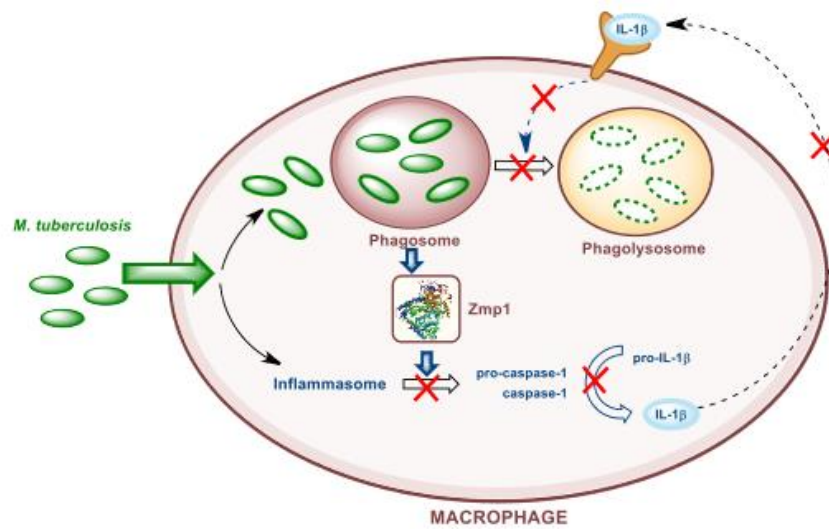
Proteolytické enzymy katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech. Původně se rozlišovaly proteinasy a peptidasy, dnes se doporučuje použití výrazu peptidasy v širším významu – obecně enzym štěpící peptidovou vazbu. Podle místa štěpení na peptidovém řetězci se peptidasy rozdělily na endopeptidasy a exopeptidasy. Endopeptidasy katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb uvnitř řetězce, kdežto exopeptidasy odštěpují koncové aminokyseliny. Rozlišujeme N-koncové a C-koncové exopeptidasy. Na základě struktury aktivního místa existuje pět charakteristických skupin peptidas: serinové, cysteinové, aspartátové, threoninové a metaloproteasy (Štosová et al., 2005).

2.6.1 Působení Zmp1

Patogeny tuberkulózy jsou roznášeny infikovanými jedinci do prostředí kašláním nebo kýčáním. Rozptýlené bakterie jsou vdechnuty okolními jedinci. Po průchodu dýchacími cestami se usadí v alveolách hostitele (Guirado & Schlesinger, 2013). Zmp1 uvolňuje chemotaktické cytokiny MCP-1, MIP-1 β a IL-8 z infikovaných makrofágů. Neinfikované buňky, jako jsou monocyty, dendritické buňky a lymfocyty, jsou přitahovány do místa nekrózy. Mohou se infikovat a tím dochází k šíření mykobakterií (Vemula et al., 2016). Dojde k nashromáždění buněk okolo napadených buněk a vznikne granulom, který chrání infikované makrofágy před dalšími útoky imunitního systému. Ve většině případech nedojde k propuknutí onemocnění, jelikož *M. tuberculosis* vyvinula mechanismy, díky kterým žije v rovnováze s imunitním systémem a zůstává latentní celá desetiletí. Homeostáza mezi mykobakterií a hostitelem je narušena, dojde-li k imunosupresivnímu stavu, jako je např. infekce HIV, diabetes, rakovina, podvýživa nebo stárnutí (Guirado & Schlesinger, 2013).

Vrozený imunitní systém využívá „pattern recognition“ receptory (PRR) k detekci patogenů. Mezi PRR se řadí „NOD-like“ receptory („nucleotide-binding oligomerization domain-like“, NLR), které se skládají do vysokomolekulárních komplexů zvaných inflamasom. Komplex je zodpovědný za aktivaci interleukin-1- β -konvertujícího enzymu (kaspasy-1, ICE, EC 3.4.22.36). Enzym je zodpovědný za přeměnu pro-IL-1 β na IL-1 β .

Dodochází k fúzi fagosomu a lysozomu, vzniká zánět a podpoří se odstranění bakterií z těla hostitele (Schroder & Tschopp, 2010). *M. tuberculosis* vyvinula způsob, jak inhibovat vznik fagolysosomu. Master et al. (2008) navrhli, že Zmp1 potlačuje vznik zánětu inhibicí kaspasy-1 a zrání fagolysosomu. Tím nedochází k odstranění patogenu z těla hostitele. Schéma potlačení vzniku zánětu inhibicí kaspasy-1 způsobené enzymem Zmp1 ze znázornění na Obr. 4.



Obr. 4: Potlačení vzniku zánětu inhibicí kaspasy-1 způsobené enzymem Zmp1. Převzato od Ferraris et al. (2011).

2.6.2 Struktura Zmp1

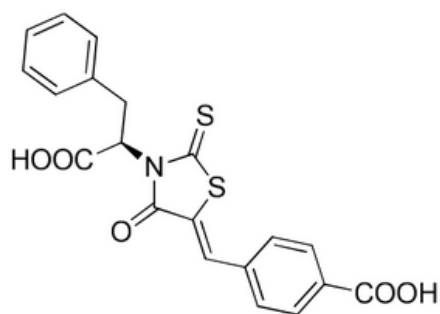
Oválný tvar enzymu Zmp1 je tvořen dvěma hlavními šroubovicovými doménami, mezi kterými se nachází katalytické místo enzymu se sekvenčním motivem $^{493}\text{HExxH}^{497}$. Hlavní osa má délku 78 Å a vedlejší osa 60 Å. Domény jsou spojeny smyčkami, mezi kterými je možný přístup k aktivnímu místu proteasy. Tetraedrická konformace zinečnatého iontu je udržována pomocí reziduí His⁴⁹³, His⁴⁹⁷, Glu⁵⁶⁰ a kyslíku patřícímu N-fosforylové skupině inhibitoru fosforamidonu jako ligandu ve struktuře proteinu. Kyslíkový atom Glu⁴⁹⁴ tvoří interakce s atomem kyslíku N-fosforylové skupiny fosforamidonu. Kyslík inhibitoru obsadil místo určené pro molekulu vody, která je zodpovědná za nukleofilní útok na peptidový substrát. Tato skutečnost má za následek inhibici katalytické aktivity Zmp1 (Ferraris et al., 2011).

Prověření peptidové knihovny ukázalo, že Zmp1 štěpí převážně oktapeptidy, ve kterých jsou zastoupeny hydrofobní aminokyseliny arginin, fenylalanin a izoleucin. Preferovaným motivem štěpení je PxxF, kde fenylalanin zaujímá P1 pozici a prolin P3 (Petrera et al., 2012).

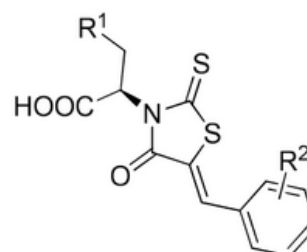
2.6.3 Inhibitory Zmp1

Od objasnění struktury proteasy Zmp1 bylo nalezeno mnoho sloučenin inhibujících její aktivitu. Jedním z nich je fosforamidon, který je inhibitorem metaloproteas, jako je např. neprilysin a endothelin-konvertující enzym 1. S nimi fosforamidon tvoří podobné interakce a sdílí podobnou polohu a orientaci jako se Zmp1 (Ferraris et al., 2011).

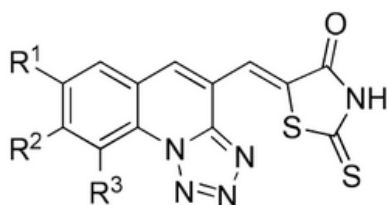
Mezi prvními vyvinutými inhibitory byly molekuly s rhodaninovým skeletem (Obr. 5) (Mori et al., 2014; Subhedar et al., 2016; Subhedar et al., 2017; Mori et al., 2018). Jinou skupinou jsou deriváty založené na hydroxamátech 8-hydroxychinolinonů. N-(benzyloxy)-8-hydroxychinolin-2-karboxamid (Obr. 6a) má největší inhibiční účinek vůči Zmp1, vyšší než fosforamidon (Paolino et al., 2018). Nejslibnějším inhibitorem z navržených látek s thazolidin-2,4-dionovým skeletem byla sloučenina N-(allyloxy)-2-(2,4-dioxo-5-pentylidenethiazolidin-3-yl)acetamid (Obr. 6b). Sloučenina napodobuje působení fosforamidonu se Zmp1, ale neinteraguje přímo s atomem zinku a jeho okolím, to má za následek nižší inhibiční vlastnosti (Šlachťová et al., 2020).



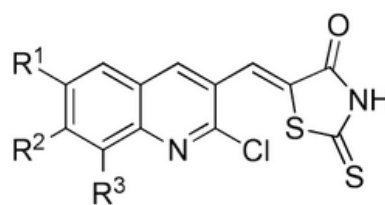
Mori et al., 2014



Mori et al., 2018

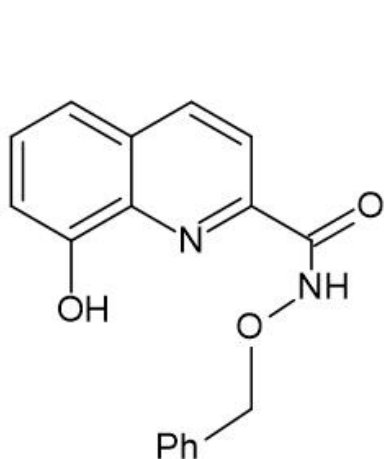


Subhedar et al., 2016

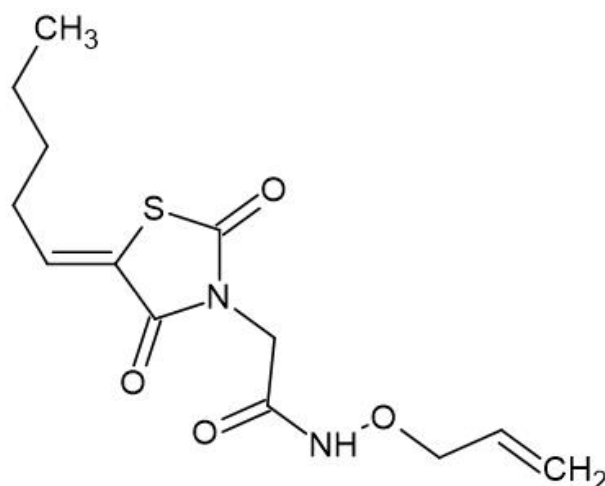


Subhedar et al., 2017

Obr. 5: Inhibitory Zmp1 založené na rhodaninovém skeletu, Vytvořeno podle Mori et al. (2014), Subhedar et al. (2016), Subhedar et al. (2017), Mori et al. (2018).



a) Paolino et al., 2018



b) Šlachtová et al., 2020

Obr 6: Inhibitory Zmp1 založené na hydroxamátech 8-hydroxychinolinonů (Paolino et al., 2018) a thazolidin-2,4-dionovém skeletu (Šlachtová et al., 2020).

2.7 *Mycobacterium tuberculosis*, tuberkulóza

2.7.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis se řadí do kmene *Actinobacteria*, do kterého spadají rody *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Actinomyces* a *Streptomyces*. Jedná se o časté obyvatelé půd a rostlin, až na výjimku jsou to neškodní komenzálové. Hrají nezastupitelnou úlohu při výrobě antibiotik a mléčných výrobků (Manigan et al., 2019).

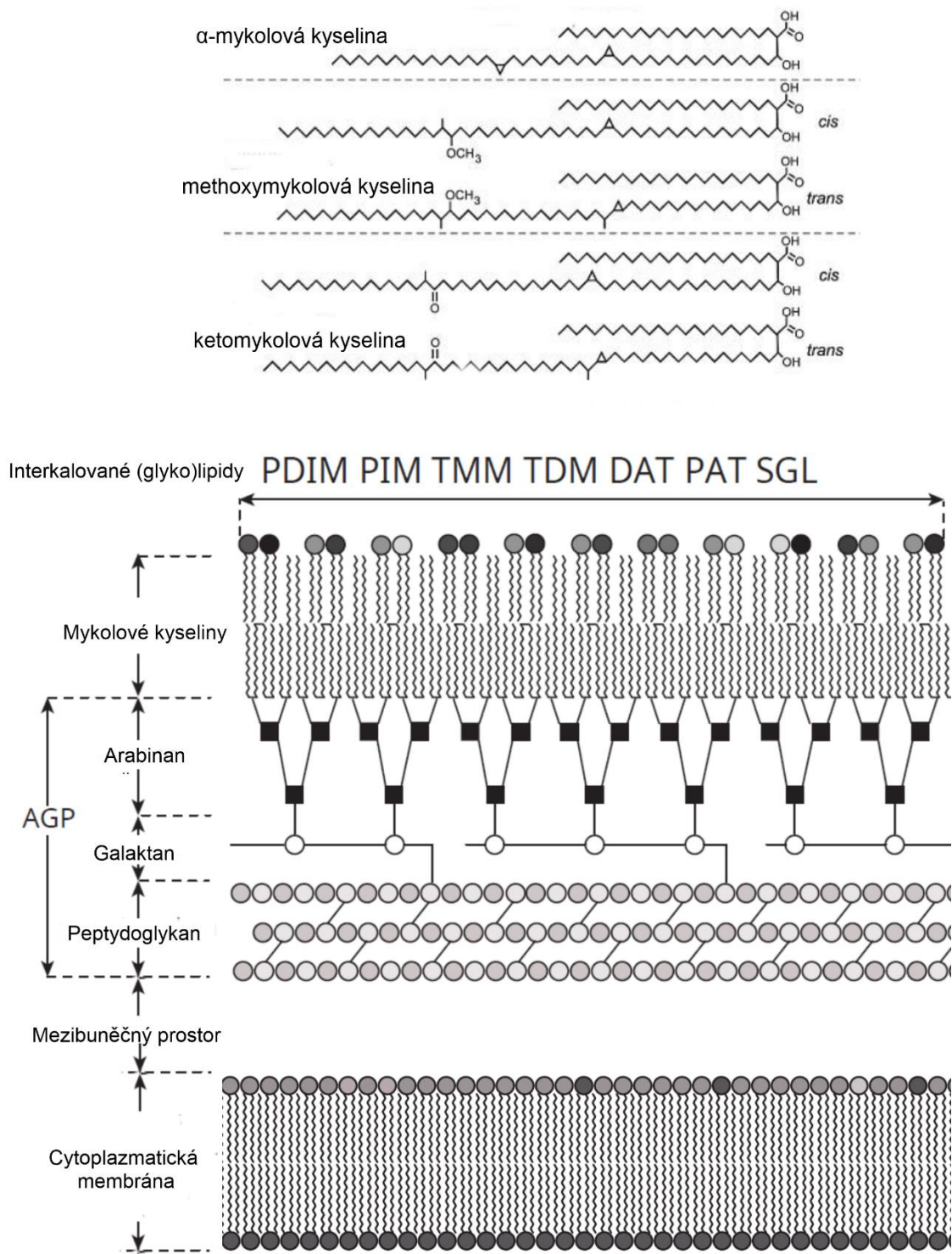
M. tuberculosis má tvar rovné nebo mírně zakřivené tyčinky. Délka se pohybuje od 1 do 4 μm a šířka činí 0,3 až 0,6 μm . Jsou nepohyblivé, nespórující a díky přítomnosti mykolových kyselin i odolné vůči kyselinám a silně hydrofobní. Jedná se o velmi pomalu rostoucí patogen s rychlostí dělení 12 až 24 hodin. Doba kultivace na agaru trvá až 21 dní. Na většině pevných médií jsou kolonie drsné, vyvýšené a silné, s hladkým nebo zvrásněným povrchem a s nepravidelným okrajem. Barvu mohou mít bělavou až žlutou (Goodfellow et al., 2012; Sakamoto, 2012).

Kmen patří mezi grampozitivní bakterie. Jedná se o fakultativní intracelulární patogen schopný infikovat a přetrvat v lidském organismu s plně funkčním imunitním systémem několik desetiletí (Kalscheuer et al., 2019) a to díky schopnosti potlačit eliminaci makrofágů obsahujících patogen a vytvoření granulomu, ve kterém patogen přežije v rovnováze s obranou hostitele a dostane se do tzv. dormativního stavu, ve kterém je rezistentní vůči obraně hostitele a terapii (Miggiano et al. 2020).

Buněčná stěna patogenu se skládá z peptidoglykanu kovalentně navázaného na arabinogalaktan, na který jsou připojeny mykolové kyseliny. Na povrchu jsou rozptýleny proteiny buněčné stěny, fosfatidylinositolmannosidy, lipidy obsahující ftiocerol, lipomannan a lipoarabinomannan. Je-li buněčná stěna nějakým způsobem narušena, volné lipidy, proteiny, lipoarabinomannan a fosfatidylinositolmannosidy jsou solubilizovány a komplex mykolová kyselina-arabinogalaktan-peptidoglykan zůstává jako nerozpustný zbytek. Lipidy, proteiny a lipoglykany navázané na mykolové kyseliny slouží jako signální molekuly v procesu onemocnění (Brennan, 2003).

Peptidoglykan je hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií, poskytující buňce tvar a tuhost. Je nezbytný pro růst a přežití buňky. Jedná se o střídavý polymer N-acetylglukosaminu a N-kyseliny acetylmuramové spojený přes $\beta(1\rightarrow4)$ vazby. Arabinogalaktan je složen z galaktosy a arabinosy (Abrahams a Besra, 2018).

Mykolové kyseliny se váží na neredukující konce řetězců arabinanu. Jedná se o jedinečné α -alkyl- β -hydroxy mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Obsahují meromykolátový řetězec C₄₂-C₆₂ a dlouhý nasycený α -řetězec C₂₄-C₂₆. Strukturální vzorec je znázorněn na Obr 7. Přispívají k propustnosti buněčné stěny a jsou nezbytné pro životaschopnost buněk a způsobují virulenci *M. tuberculosis*, proto mnoho léčiv cílí na enzymy zapojené do biosyntézy kyseliny mykolové (Abrahams a Besra, 2018).



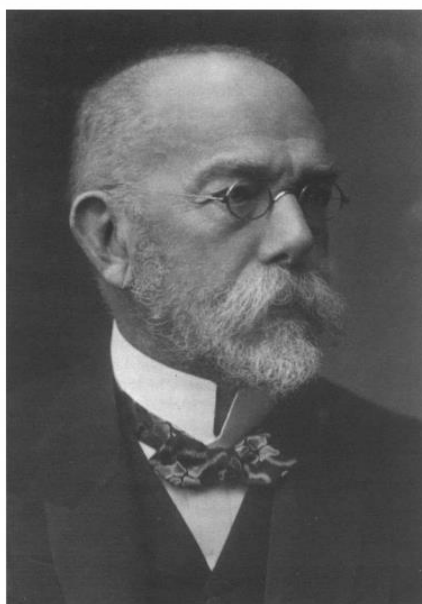
Obr. 7: Struktura buněčné stěny *M. tuberculosis*. Schematické znázornění mykobakteriální buněčné stěny zobrazující peptidoglykan, arabinogalaktan, mykolové kyseliny s navázanými acyllipidy (TMM, trehalosamonomykolát; TDM, trehalosa dimykolát; DAT, diacyltrehalosa; PAT, polyacyltrehalosa; PDIM, fthiocerol dimykcerosát; SGL, sulfoglykolipid). Vytvořeno podle Kalscheuer et al. (2019).

2.7.2 Robert Koch – objevitel původce tuberkulózy

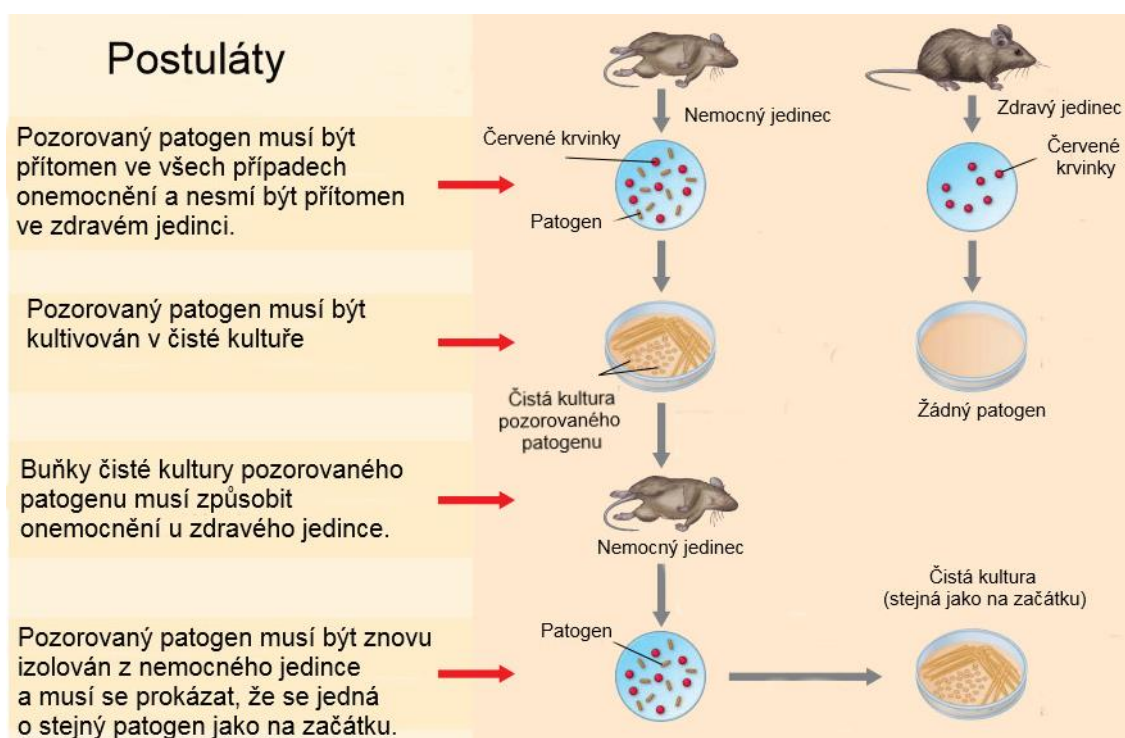
Robert Koch (Obr. 8) se narodil 11. prosince 1843 v Clausthalu. Vystudoval učitelství botaniky, fyziky a matematiky, později medicínu. Začínal jako vojenský chirurg. S pomocí pacienta se dostal na Poznaňsko, kde se začal věnovat bakteriologii. Bakterie pozoroval mikroskopem, který dostal darem od své ženy. V počátcích bakteriologie se vědci domnívali, že bakterie nemají jasný morfologický tvar. Koch si však povšiml morfologických změn tyčinek na spóry a naopak. Své výsledky fotografoval a publikoval ve vědeckém časopise. Pěstoval bakterie na pevných médiích, díky čemuž získal kolonii z jediné bakterie.

Ještě před Kochem se výzkumem tuberkulózy zabýval francouzský lékař a patolog Théophile Laënnec, který netušil, že se jedná o infekční onemocnění. Koncem 19. století byla za příčinu tuberkulózy považována chudoba, podvýživa a především dědičné dispozice. Experimentálně bylo zjištěno Antoinem Villeminem a později Juliem Cohnheimem, že tuberkulóza je infekční. Samotnou bakterii *M. tuberculosis* objevil Robert Koch. Bakterii pocházející z morčat vykultivoval na šikmém povrchu teplem koagulovaného telecího krevního séra. Přítomnost patogenu prokázal v plicích a dalších orgánech. Výsledky uveřejnil na přednášce v Berlíně v roce 1882. Na základě jeho vědecké práce byly formulovány tzv. Kochovy postuláty, znázorněné na Obr. 9. Koch sám se zabýval hledáním léku na tuberkulózu. V roce 1890 představil látku (glycerolový extrakt čisté bakteriální kultury), kterou údajně léčil zvířata i lidi. Substance byla nazvána tuberkulin. Později byla prokázána jeho toxicita a zánětlivé účinky a zároveň vyšlo najevo, že Kochovo tvrzení není dostatečně vědecky podloženo. Tento skandál mu značně poškodil vědeckou reputaci.

Během svého života se dále zabýval výzkumem dobytčího moru, malárie, anthraxu, podařilo se mu izolovat bakterii *Vibrio cholerae*, původce cholery. Za svoji práci v oblasti vědy získal řadu pruských vyznamenání a Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu v r. 1905. Koch zemřel 27. května 1910 při pobytu v Baden-Badenu (Lagerkvist, 2003).



Obr 8: Robert Koch. Převzato z Lagerkvist (2003).



Obr. 9: Kochovy postuláty – slovní znění a grafické znázornění. Vytvořeno podle Manigan et al. (2019).

2.7.3 Tuberkulóza

Staří Řekové nazývali tuberkulózu phthisis. Novodobý název zavedl v roce 1834 Johann Lukas Schönlein, který chtěl pro toto onemocnění zavést název podle charakteristických uzlíků (granulomů) různé velikosti (Homolka, 2016).

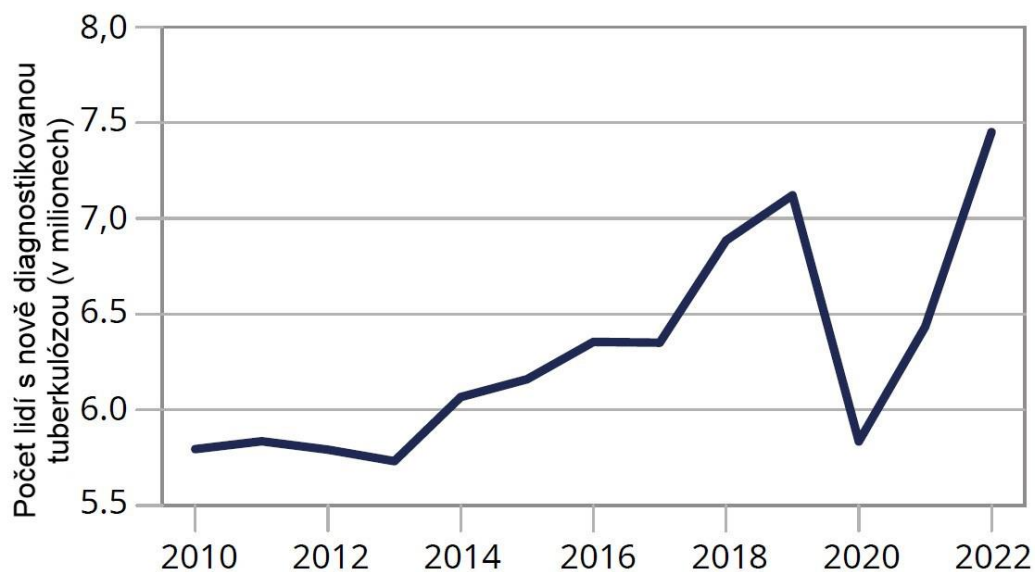
Tuberkulóza je způsobená bakterií *M. tuberculosis*. Tento intracelulární patogen je přenášen inhalací ve vzduchu rozptýlených kapiček obsahující živé bakterie. První obranou jsou buňky vrozeného imunitního systému, především makrofágy, dendritické buňky, monocyty a neutrofilové, které patogen ochotně fagocytují. Následně jsou fagocytované mykobakterie přeneseny do lysozomů a zničeny. *M. tuberculosis* vyvinul nesčetné množství strategií, aby znemožnil imunitní odpověď organismu. Díky nim je schopen přetrvat v hostiteli v podobě granulomu. Což je agregát obsahující infikované makrofágy obklopené různými typy imunitních buněk. Granulom představuje rovnováhu mezi potenciálně nebezpečným patogenem a imunitním systémem hostitele (Pieters, 2008).

Zatímco většina jedinců vystavených *M. tuberculosis* je schopna kontrolovat infekci ve formě asymptomatické latentní TB infekce (LTBI), odhadem u 5 až 10 % lidí se rozvine aktivní TB (ATB). Jedinci s ATB trpí přetrvávajícím kašlem doprovázeným tvorbou sputa, úbytkem hmotnosti, slabostí a nočním pocením (Sia a Rengarajan, 2019).

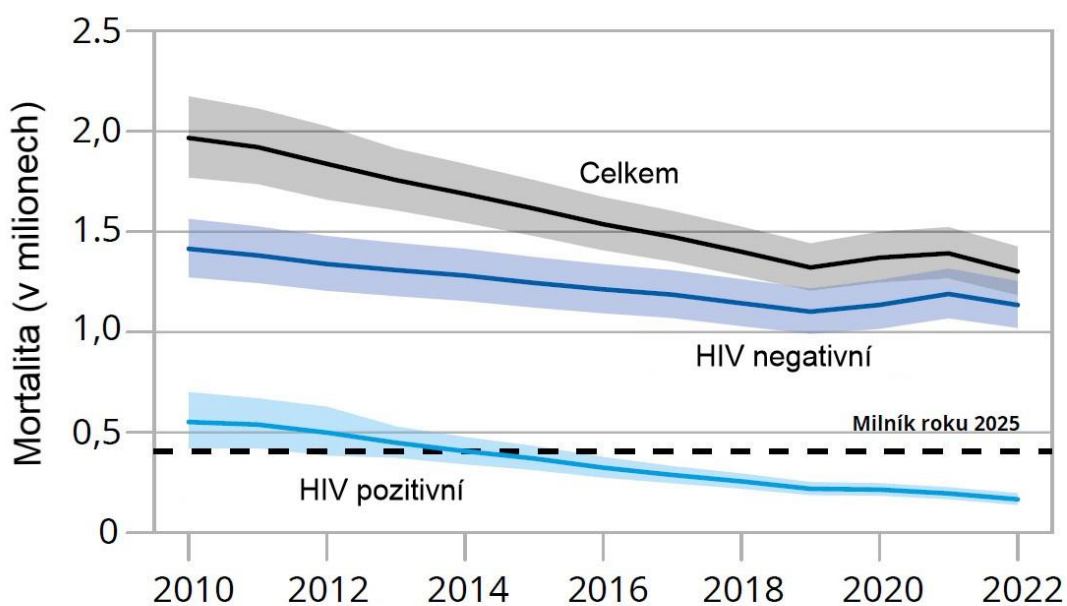
Aktivní TB se může rozvinout u jedinců s latentní formou, dojde-li k narušení rovnováhy mezi patogenem a imunitním systémem hostitele. Jakékoli zhoršení imunity může ohrozit život jedince infikovaného *M. tuberculosis*. Komplikace mohou nastat při koinfekci HIV, kouření, podvýživě, diabetes, hlístové infekci, chronickém onemocnění plic a rakovině. O vlivu onemocnění HIV na jedince s TB svědčí skutečnost, že v roce 2022 více než desetina všech úmrtí souvisejících s TB byla u HIV pozitivních jedinců (Pieters, 2008; WHO, 2023).

V roce 2022 onemocnělo na tuberkulózu po celém světě přibližně 7,5 milionů lidí. Jedná se o nejvyšší počet od doby, kdy WHO v roce 1995 zahájila celosvětové monitorování TB. Na zvýšení počtu případů se podepsala pandemie COVID-19, kdy v letech 2020 a 2021 nebyly některé případy zachyceny.

Celosvětově zemřelo na TB v roce 2022 přibližně 1,3 milionu lidí. Tento počet se vrací na úroveň statistik před pandemií COVID-19 (během níž došlo ke zvýšení případů úmrtí) (Obr. 11) (WHO, 2023).

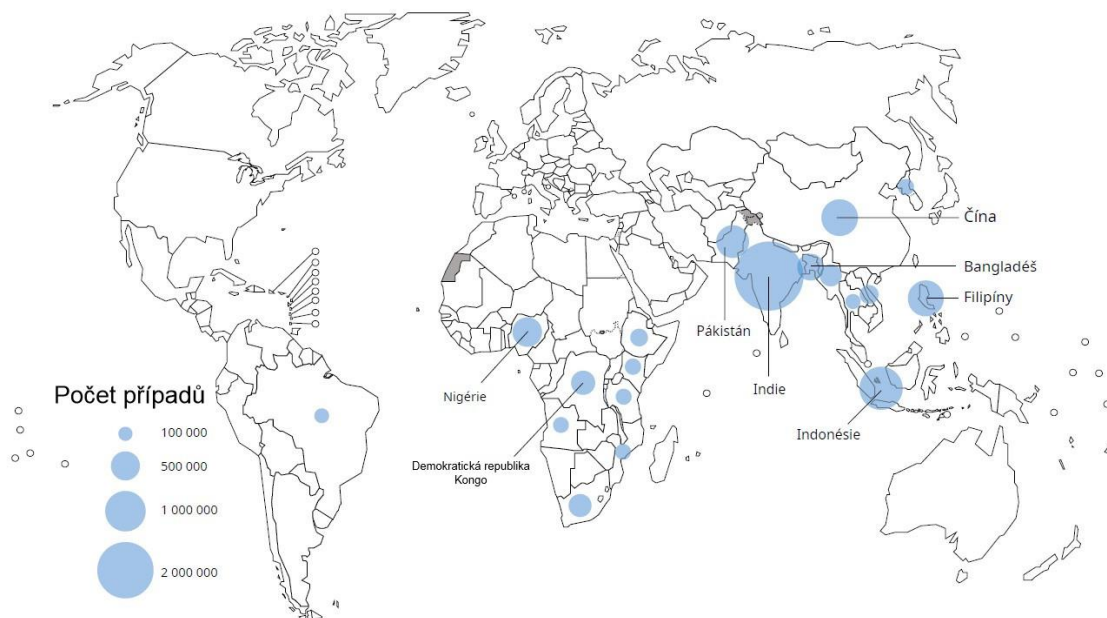


Obr. 10: Počet lidí s nově diagnostikovanou tuberkulózou mezi lety 2010 až 2022. Z grafu je patný pokles mezi lety 2019 a 2020, kdy byl svět zasažen pandemií COVID-19. Počet je uveden v milionech. Převzato z WHO (2023).



Obr. 11: Počet úmrtí na tuberkulózu mezi lety 2010 a 2022. Počet je uveden v milionech. Převzato z WHO (2023).

Výskyt TB se v jednotlivých částech světa liší. Nejvíce postižené jsou rozvojové země a země s nízkými příjmy, převážně v jihovýchodní Asii, Africe a v západním Tichomoří (Obr. 12). V roce 2021 se nejvíce nových případů objevilo v Indii (27 %), Indonésii (10 %), Číně (7,1 %), na Filipínách (7,0 %), v Pákistánu (5,7 %), Nigérii (4,5 %), Bangladéši (3,6 %) a Demokratické republice Kongo (3,0 %) (WHO, 2023).



Obr. 12: Mapa výskytu nových případů výskytu TB v roce 2021. Nejvíce zasažena je oblast v jihovýchodní Asii, Africe a v západním Tichomoří. Vyznačeny jsou země s nejméně 100 000 novými případy v roce 2021. Převzato z WHO (2023).

2.7.4 Vakcíny proti tuberkulóze

Jedinou v současnosti licencovanou vakcínou proti TB je bacil Calmette-Guérin (BCG), oslabený kmen *M. bovis*, jehož genomová sekvence je z 99,95 % podobná *M. tuberculosis*. Byla vyvinuta francouzským lékařem Albertem Calmettem (1863-1933) a veterinářkou Camille Guérinovou (1872-1961) v letech 1906 až 1919 (Ahmed et al., 2021). Vakcína byla poprvé použita k prevenci TB u novorozeněte v roce 1921. Následně bylo očkování zahájeno ve Španělsku, Norsku a Švédsku. Ačkoliv se BCG vakcinace ukázala jako bezpečná, vzbuzovala pochyby. Důvěra ve vakcínu byla silně pošramocena po tragédii v Lübecku v roce 1930, kdy z 250 očkovaných kojenců 73 zemřelo v prvním roce a dalších 135 bylo infikováno. Vyšetřování zahájené Německou vládou odhalilo pochybení při manipulaci se vzorky v laboratoři v Lübecku (došlo ke kontaminaci vakcíny virulentními tuberkulózními bacily) a BCG vakcína byla zproštěna jako příčina katastrofy (Luca & Mihaescu, 2013).

Na základě úspěšných zkoušek z 50. let 20. století se v Evropě zavedlo rutinní očkování BCG (Luca & Mihaescu, 2013). K vakcinaci se používají v různých částech světa rozdílné kmeny BCG. Existují důkazy naznačující, že ochrana proti TB se může lišit podle kmene BCG použitého k očkování. I přesto analýza mnoha studií ukázala, že vakcinace BCG poskytuje v průměru 50% ochranu před různými formami TB. Vakcína je nejspolehlivější u dětí, s věkem její účinnost slábne. U dospělých je její účinnost ovlivněna řadou faktorů, např. genetická rozmanitost, dávka a způsob podání, prostředí, stav výživy a užívané léky (Ahmed et al., 2021).

V současnosti je vyvíjeno několik vakcín proti TB v různých fázích klinického vývoje. Podle typu strategie účinku se dělí na proteinové podjednotkové, virově vektorové a celobuněčné vakcíny (Sia a Rengarajan, 2019).

V České republice jsou od roku 2010 očkováni pouze novorozenci, u kterých existuje riziko, že by mohli přijít do kontaktu s nemocným tuberkulózou. Situaci vyhodnocuje lékař novorozeneckého oddělení na základě dotazníku vyplněného zákonným zástupcem dítěte (Vyhláška č. 299/2010 Sb.).

2.8 Léčiva proti tuberkulóze

Při boji s tuberkulózou je klíčová správná léčba ze strany pacienta a lékaře, který musí předepsat správný postup léčby. Existují standartní diagnostické a léčebné protokoly založené na spolehlivých vědeckých poznatcích a dlouhodobém výzkumu. Je důležité, aby lékaři chápali základní principy chemoterapie TBC, jelikož nedodržení správné léčby vede k selektivnímu růstu mutantů rezistentních na léky (Joshi, 2011).

Předpokládá se, že rezistenci způsobují genetické mutace, ale přesná příčina není doposud známa. Rezistenci dělíme na „multidrug-resistant“ (MDR-TB), „extensively drug-resistant“ (XDR-TB) a „totally drug-resistant“ (TDR-TB). Vůči MDR-TB je neúčinný isoniazid a rifampicin. V roce 2006 se objevila XDR-TB, která je způsobena bakterií odolnou vůči isoniazidu, rifampicinu, fluorochinolonům a aminoglykosidům druhé linie. Pro její léčbu je potřeba použít léky třetí linie, které ale způsobují více vedlejších účinků než léky první nebo druhé linie. Nejzávažnější formou tuberkulózy je TDR-TB, která je způsobena bakteriemi rezistentními vůči všem lékům první a druhé linie. Hlášena byla v roce 2007, ale objevila se už v roce 2003 v Itálii (Bahuguna & Rawat, 2019).

2.8.1 Léčiva první linie

Nekomplikovaná léčba tuberkulózy zahrnuje čtyři léky: isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol. Léčba probíhá dlouhodobě, kombinují se při ní různá antituberkulotika a je prováděna pod dozorem ošetřujícího personálu (DOTS – directly observed treatment shortcourse). Léčiva rychle usmrcují aktivně rostoucí a semidormantní mykobakterie a zabraňují vzniku rezistence (Wallenfels et al., 2018). U nových případů probíhá léčba po dobu nejméně 6 měsíců. V prvních 2 měsících probíhá intenzivní fáze s použitím ethambutolu, isoniazidu, rifampicinu a pyrazinamidu. Následují 4 měsíce, kdy pacient užívá isoniazid a rifampicin (Joshi, 2011).

Prvním lékem proti tuberkulóze byl streptomycin izolovaný Albertem Schatzem v roce 1943. Aminoglykosidové antibiotikum se váže na podjednotku 30 S bakteriálního ribozomu. Dojde k inhibici proteosyntézy a následně ke smrti buňky (Santos, 2012).

Isoniazid vstupuje do těla pasivní difúzí jako proléčivo. Na aktivní sloučeninu se přemění působením mykobakteriálního enzymu hydrogen-peroxidoreduktasy (katalázy-peroxidasy, KatG, EC 1.11.1.21). Isoniazid se váže na NADH, tím dojde k inhibici acyl-[acyl-carrier protein]:NAD⁺ oxidoreduktasy (enoyl-ACP reduktasy,

EC 1.3.1.9), která se podílí na syntéze mykolových kyselin důležitých při stavbě buněčné stěny. Kromě toho isoniazid vytváří řadu vysoce reaktivních sloučenin, které inhibují syntézu proteinů a nukleových kyselin (Timmins & Deretic, 2006; Santos, 2012).

Ethambutol se stejně jako isoniazid podílí na poškození buněčné stěny. Zabraňuje syntéze arabinogalaktanu a lipoarabinomannanu (Goude et al., 2009).

Rifampicin způsobuje inhibici bakteriální nukleosid-trifosfát:RNA nukleotidyltransferasy (RNA polymerasy, EC 2.7.7.48). Dojde k přerušení transkripce a zastaví se bakteriální růst (Wehrli, 1983).

Pyrazinamid, derivát nikotinamidu, se užívá v prvních dvou měsících léčby, kterou celkově zkrátí na 6 měsíců. Jeho protituberkulózní potenciál byl rozpoznán v roce 1952, ale i po tak dlouhé době je jeho mechanismus účinku nejméně známý. Po vstupu do mykobakterie se pyrazinamid přemění na svoji aktivní formu kyselinu pyrazinovou (POA). POA poté opouští buňku, v kyselém pH vzniká nenabitá protonovaná kyselina (HPOA). HPOA snadno prochází přes membránu bakterie. Uvnitř buňky se nahromadí protony a dojde k okyselení cytoplazmy. Kyselé pH inhibuje životně důležité enzymy, syntézu proteinů a RNA a ovlivňuje membránový transport (Zhang et al., 2014).

2.8.2 Léčiva druhé linie

Léky druhé linie se používají při léčbě multirezistentní tuberkulózy. Bohužel jsou toxičtější a méně účinné než léčiva první linie (Santos, 2012).

Kanamycin a jeho derivát amikacin se vážou na bakteriální ribozomy a narušují prodlužování peptidového řetězce v mykobakteriích (Santos, 2012). Kanamycin je produktem druhu půdních bakterií *Streptomyces* (Ramachandran & Swaminathan, 2015).

Kapreomycin je izolován ze *Streptomyces capreolus*. Je chemicky podobný viomycinu (Ramachandran & Swaminathan, 2015). Inhibují syntézu prokaryotických proteinů navázáním na bakteriální ribozomy a tím narušují prodlužování peptidového řetězce v bakteriích (Santos, 2012). Poškozují ledviny, způsobují úbytek iontů v těle a působí negativně na sluchové ústrojí (Ramachandran & Swaminathan, 2015).

Ofloxacin a ciprofloxacin jsou řazeny mezi fluorochinony. Inhibují DNA topoisomerasu (DNA gyrasu, EC 5.6.2.2) a topoizomerázu IV, enzymy odpovědné za udržování struktury chromozomů (Santos, 2012). Fluorochinony mají nežádoucí účinky spojené s gastrointestinálním ústrojím a centrální nervovou soustavou. Mezi závažnější účinky patří delirium, psychóza a záchvaty (Ramachandran & Swaminathan, 2015).

Cykloserin je cyklický analog aminokyseliny D-alanin (Ramachandran & Swaminathan, 2015). Inhibuje enzymy alaninracemasu (Alr, EC 5.1.1.1) a D-alanin:D-alaninligasu (Ddl, EC 6.3.2.4) důležité při syntéze peptidoglykanu nutného pro výstavbu buněčné stěny (Prosser & Carvalho, 2013). U 20–30 % pacientů způsobuje nežádoucí účinky na centrální nervovou soustavu. Závažným projevem je těžká deprese, sebevražedné myšlenky, psychóza, záchvaty a encefalopatie (Ramachandran & Swaminathan, 2015).

Ethionamid a prothionamid jsou strukturně podobné isoniazidu (Ramachandran & Swaminathan, 2015). Aktivovaný lék narušuje biosyntézu buněčné stěny inhibicí syntézy kyseliny mykolové (Santos, 2012). Mohou vyvolat anorexii, kovovou chuť, nevolnost, zvracení, nepohodlí v horní části žaludku a průjem. Dlouhodobá léčba může způsobit hypotyreózu (Ramachandran & Swaminathan, 2015).

2.8.3 Nedávno schválená léčiva

Po 45 letech od schválení rifampicinu (1967) bylo v roce 2012 schváleno nové léčivo bedaquilin. Váže se na c podjednotku ATP fosfohydrolasy (ATP syntasy, EC 7.1.2.2) a inhibuje energetický mechanismus bakterií. Bedaquilin je vysoce selektivní pro mykobakteriální ATP syntasu. Je tedy nepravděpodobné, že bude působit toxicky na člověka (Bahuguna & Rawat, 2019).

Delamanid byl schválen Evropskou agenturou pro léčivé přípravky v dubnu 2014. Užívá se u dospělých pacientů s plicní MDR-TB, kdy nelze jinak sestavit účinný léčebný režim z důvodů rezistence nebo snášenlivosti. Delamanid vytváří reaktivní radikály inhibující syntézu mykolových kyselin, které jsou důležité při výstavbě buněčné stěny. Současně se usnadní průnik léčiva do mykobakterií. Do těla vstupuje jako proléčivo (Liu et al., 2018). Na základě předklinické studie se předpokládá, že bude dobře snášen a pravděpodobně nebude mít žádnou genotoxicitu ani karcinogenitu. Nedoporučuje se však užívat delamanid v kombinaci s bedaquilinem, protože oba jsou kardiotoxické (Bahuguna & Rawat, 2019).

Pretomanid je derivátem delamanidu. Oba řadíme do skupiny nitroimidazolových antituberkulotik a sdílejí stejný mechanismus účinku (Chang, 2018).

2.8.4 Vyvíjená léčiva

Řada dalších léků je v různé fázi klinického vývoje. Tab. 2 uvádí výběr antitubekulotik, které jsou v současnosti ve 2. a 3. fázi klinického vývoje.

Jednou ze tříd jsou fluorochinolony, kam náleží levofloxacin, moxifloxacin a gatifloxacin. Tato skupina antitubekulotik inhibuje DNA gyrasu a DNA topoizomerasu IV, tím dojde k zabránění replikace bakteriální DNA.

Další skupinou léčiv jsou oxazolidinony, kam patří linezolid, delpazolid, sutezolid a TBI-223. Navázáním na 30 S a 50 S podjednotku ribozomu v bakteriích způsobují narušení syntézy proteinů. Linezolid je slibný kandidát na léčbu rezistentní TBC, ale objevují se vedlejší účinky a vzniká rezistence.

Benzothiazinony, kam patří BTZ-043 a macozinon (PTBZ-169), inhibují enzym dekaprenylfosforyl- β -D-ribofuranosa-2'-epimerasu (DprE1, EC 1.1.98.3) tvořící arabinogalaktan, který je důležitou složkou buněčné stěny. Oba jsou považovány za bezpečné a vyvíjejí se další antituberkulární benzothiazinonové sloučeniny (Stephanie et al., 2021).

Klofazimin byl syntetizován už v roce 1957, ale nedosahoval potřebných výsledků. Postupně byl zastíněn účinnějšími antituberkulotiky té doby. Zájem o něj vzrostl poté, co byla provedena studie, ve které byl pozorován pozitivní účinek klofaziminu ve spojení s jinými léčivy při léčbě MDR-TB. Oxidací klofaziminu dojde ke snížení ATP a vznikají reaktivní formy kyslíku (Nugraha et al., 2021).

SQ109, příbuzný ethambutolu, cílí na transportér MmpL3 přenášející trehalosa monomykolát (TMM) z cytoplazmy do prostoru buněčné stěny. Kde dojde k zastavení produkce trehalosa dimykolátu (TDM). Konečným výsledkem je inhibice začlenění kyseliny mykolové do buněčného obalu (Tahlan et al., 2012).

Tab. 2: Léčiva, která jsou v současnosti ve 2. a 3. fázi klinického vývoje. Vytvořeno podle Bahuguna & Rawat (2019), Stephanie et al. (2021).

Název	Fáze výzkumu	Chemická třída	Mechanismus působení
Linezolid	2	oxazolidinon	Inhibuje proces syntézy proteinů, tím že se váže na A – místo 50 S jednotky ribozomu
Sutezolid	2	oxazolidinon	Inhibuje syntézu proteinů vazbou na 23 S rRNA velké podjednotky 50 S ribozomu
Klofazimin	3	riminofenazin	Vytváří reaktivní formy kyslíku
SQ109	2	ethylendiamin	Váže se na protein MmpL3 a inhibuje syntézu buněčné stěny
Telacebec (Q203)	2	imidazopyridinamid	Působí na respiračním řetězec mykobakterií
Levofloxacin	2	fluorochinolon	Inhibuje DNA gyrasu, která následně brání replikaci bakteriální DNA
Macozinon (PBTZ-169)	2	benzothiazinon	Inhibitor enzymu DprE1 (dekaprenylfosforyl- β -D-ribofuranosa-2'-epimerasa)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

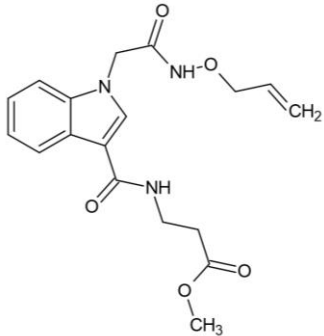
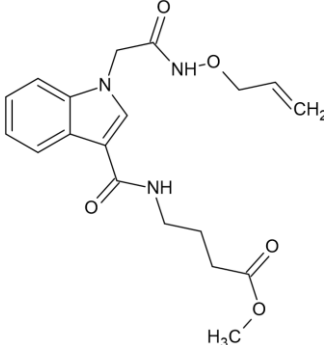
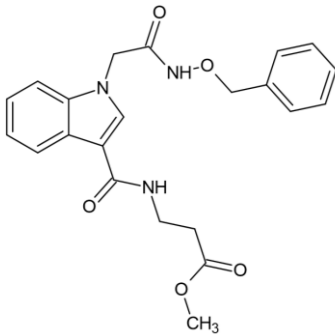
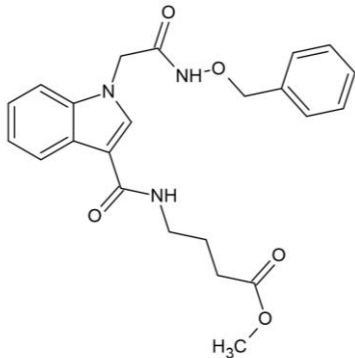
- Hydrogenuhličitan amonný – Sigma Aldrich, USA
- Kyselina α -kyano-4-hydroxysořicová (HCCA) – Bruker Daltonics, Německo
- Acetonitril – Sigma Aldrich, USA
- Kyselina trifluoroctová – Merck Millipore, Německo
- Angiotensin II – Sigma-Aldrich, USA
- Zmp1 *M. tuberculosis* Recombinant Protein – cat. No 90-361, ProSci, USA
- Aceton – Merck Millipore, Německo

3.1.2 Přístroje

- Analytické váhy – Radwag, Polsko
- Sada automatických pipet – Eppendorf, Německo
- Homogenizátor CHS Vortex – Chromservis, ČR
- Centrifuga Frontier 5306 mini – Ohaus, USA
- Termomixer comfort – Eppendorf, Německo
- Hmotnostní spektrometr Microflex LRF 20 – Bruker Daltonik, Německo
- MALDI destička MSP BigAnchor 96 – Bruker Daltonik, Německo

3.1.3 Inhibitory Zmp1

V této práci byly studovány nové inhibitory Zmp1 (Obr. 13), které byly dodány Katedrou organické chemie UPOL (doc. RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.). Obsahují indolový kruh spojený s hydroxamátovou skupinou přes methylenovou skupinu. Struktura může být modifikována různými benzylovými nebo allylovými skupinami.

Inhibitor	Struktura
<p style="text-align: center;">SL-VM-35b</p> <p style="text-align: center;">Chemický vzorec: $C_{18}H_{21}N_3O_5$</p> <p style="text-align: center;">Molekulová hmotnost: 359,3820</p>	
<p style="text-align: center;">SL-VM-35c</p> <p style="text-align: center;">Chemický vzorec: $C_{19}H_{23}N_3O_5$</p> <p style="text-align: center;">Molekulová hmotnost: 373,4090</p>	
<p style="text-align: center;">SL-VM-37</p> <p style="text-align: center;">Chemický vzorec: $C_{22}H_{23}N_3O_5$</p> <p style="text-align: center;">Molekulová hmotnost: 409,4420</p>	
<p style="text-align: center;">SL-VM-37b</p> <p style="text-align: center;">Chemický vzorec: $C_{23}H_{25}N_3O_5$</p> <p style="text-align: center;">Molekulová hmotnost: 423,4690</p>	

Obr. 13: Strukturní vzorce látek, které inhibují aktivitu Zmp1, použitých v bakalářské práci s uvedenou molekulovou hmotností. Vytvořeno v programu ChemSketch.

3.1.4 Použitý software

- FlexControl 3.4
- FlexAnalysis 3.4
- OriginPro 2017 (Academic)
- ACD/ChemSketch ACD/Labs 2020.1.2 (Version C15E41, Build 117352)
- Excel 365 MSO Microsoft Office (Version 2209, Build 16.0.15629.20196)

3.2 Metody

3.2.1 Stanovování aktivity Zmp1 pomocí MALDI-TOF MS

Lidský angiotensin II (1 mg) byl rozpouštěn v 1 ml vody. Tento roztok obsahuje 1000 pmol angiotensinu II v 1 μ l. Před použitím byl po rozmrazení 1 μ l roztoku ředěn vodou 250 \times a ředěný roztok pipetován do 0,5 ml zkumavek v alikvotech 24 μ l. K těmto alikvotům byl přidán 1 μ l 2M NH_4HCO_3 pro dosažení mírně bazické hodnoty pH. Matrice byla připravena rozpuštěním 6,7 mg kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) ve směsi acetonitril (700 μ l) a 2,5% trifluoroctová kyselina (300 μ l). Navážka inhibitoru uvedená v Tab.3 byla rozpuštěna v odpovídajícím množství acetonu, tak, aby vzniknul 10 mM roztok. Daný roztok byl následně zředěn acetonem 10 \times na koncentraci 1 mM. Enzym byl ze zásobního roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml rozdělen na alikvoty 20 μ l, které byly uchovávány při -80 °C. Po jejich rozmrazení byl enzym ředěn 50 mM NH_4HCO_3 , faktor ředění byl optimalizován (uvedeno ve výsledkové části).

Tab. 3: Navážené množství inhibitorů

Inhibitor	Množství navážky (mg)
<i>SL-VM-35b</i>	4,74
<i>SL-VM-35c</i>	3,79
<i>SL-VM-37</i>	4,04
<i>SL-VM-37b</i>	3,99

Po dobu měření byl enzym uchovávan v ledové lázni. V případě, že se jednalo o kontrolní vzorek, byl do reakční směsi pipetován 1 μ l acetonu. Jednalo-li se o vzorek s inhibitorem, byl k reakční směsi přidán 1 μ l 1 mM inhibitoru. Po uplynutí 3 min, kdy byl vzorek inkubován při 37 °C. Reakce byla zahájena přidáním 1 μ l enzymu Zmp1. Po dobu 20 min od přidání enzymu bylo ve 2 min intervalech odebráno 0,6 μ l reakční směsi a pipetováno na MALDI destičku MSP BigAnchor 96 (Bruker Daltonik). Odebraná množství byla neprodleně převrstvena matricí (HCCA), čímž došlo k ukončení reakce, a ponechána krystalizovat.

Měření probíhalo na hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 s ovládacím softwarem flexControl 3.4. Vybaveném dusíkovým laserem s frekvencí 60 Hz pracujícím při vlnové délce 337 nm. Vzorky na destičce byly 1000x ozářeny laserem s frekvencí pulzů 300 ns. Separace probíhala v hmotnostním analyzátoru TOF vybaveném reflektorem pracujícím v pozitivním módu s urychlujícím napětím (IS1) 17,5 kV, extrakčním napětím (IS2) 15,1 kV, napětím čočky 8,5 kV, napětím reflektoru 19 kV a napětím detektoru 1591 V.

K vyhodnocení byly použity softwary flexAnalysis 3.4, OriginPro 2017 (Academic) a Excel 365 MSO Microsoft Office. V programu flexAnalysis 3.4 byly označeny signály angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) a peptidu DRVY (m/z 552,3) vzniklého štěpením angiotensinu II pomocí Zmp1. Byly odečteny hodnoty intenzit těchto signálů.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Stanovení aktivity Zmp1 v přítomnosti inhibitoru

4.1.1 Optimalizace aktivity enzymu

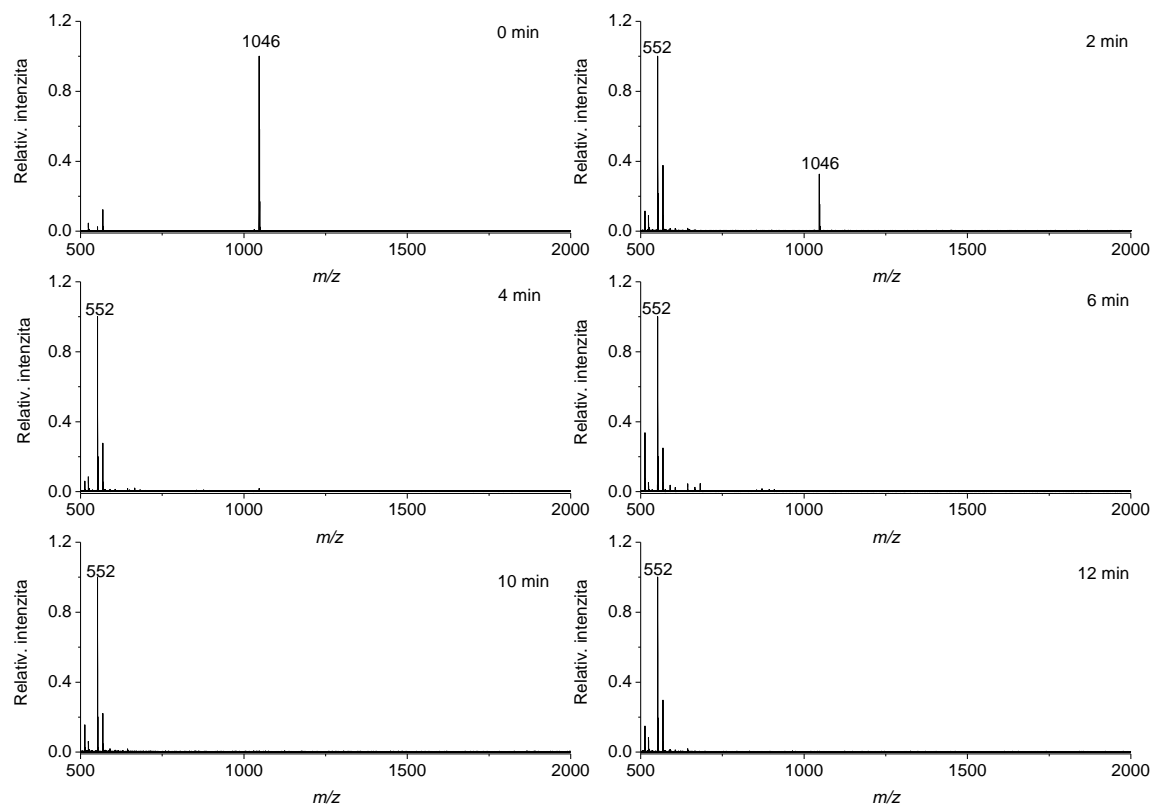
Zmp1 štěpí lidský angiotensin II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) na peptidy DRVY (m/z 552,3) a IHPF (m/z 513). Reakci sledujeme jako postupný pokles signálu angiotensinu II a postupný nárůst signálu peptidu DRVY v hmotnostním spektru. Rychlost úbytku signálu angiotensinu II, resp. nárůstu peptidu DRVY, vypovídá o aktivitě Zmp1. Pro účel experimentu bylo nutné zvolit optimální aktivitu enzymu, aby bylo možné reakci časově zaznamenat.

Pro určení optimální enzymové aktivity Zmp1 byl enzym ředěn 50 mM roztokem NH_4HCO_3 v poměru 1:4, 1:9 a 1:14. Naměřená hmotnostní spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru flexAnalysis 3.4 a OriginPro 2017 (Academic). V programu flexAnalysis 3.4 byly v rámci jednotlivých měření označeny signály angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) a peptidu DRVY (m/z 552,3) vzniklého štěpením angiotensinu II pomocí Zmp1. Současně byly odečteny hodnoty intenzit těchto signálů. Pomocí programu OriginPro 2017 (Academic) byly vytvořeny Obr. 14 a 15.

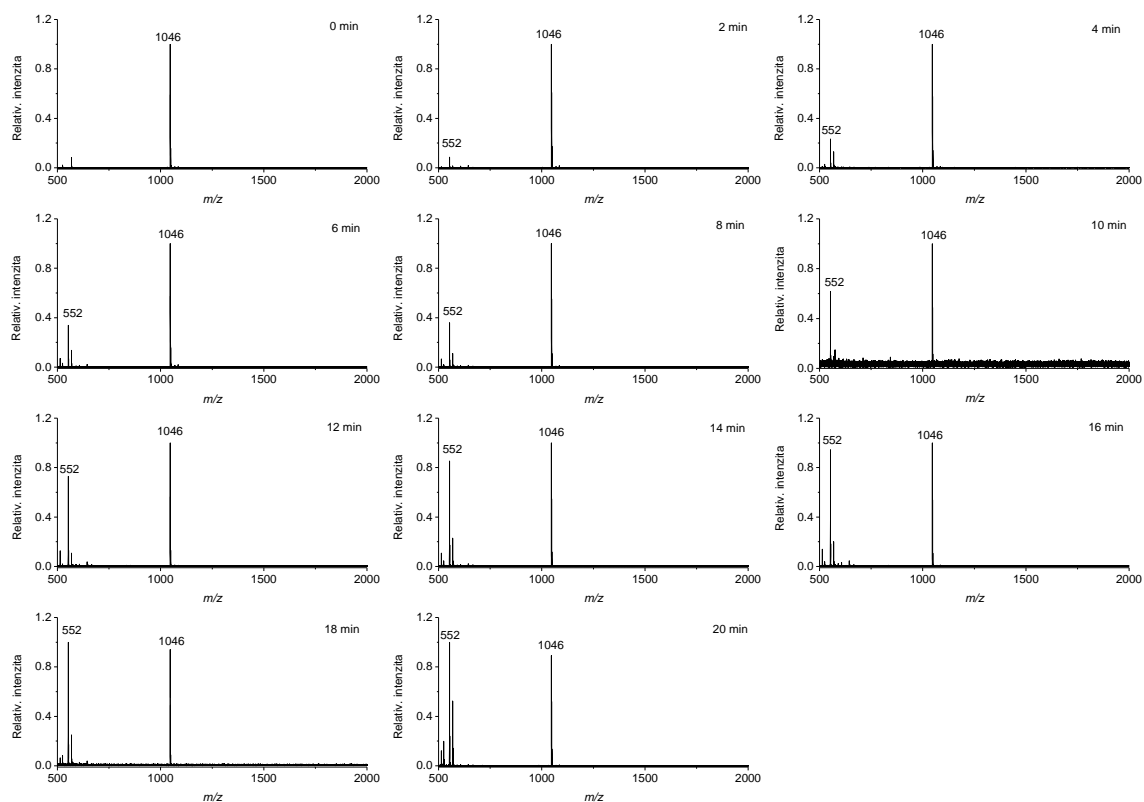
Na Obr. 14 je znázorněn postupný úbytek signálu angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) způsobený jeho štěpením enzymem Zmp1 a postupný nárůst signálu peptidu DRVY (m/z 552,3). Enzym byl v tomto případě ředěn 1:4. Je patrné, že substrát (angiotensin II) byl spotřebován již během prvních 4 minut měření. Jedná se tudíž o velmi krátkou dobu pro měření aktivity Zmp1.

Při ředění v poměru 1:14 prokazoval enzym malou aktivitu vůči substrátu. Z Obr. 15 je zřejmé, že k úbytku angiotensinu II docházelo pomalu a během měřených 20 min nedošlo k jeho hydrolýze enzymem.

Jako optimální volba se ukázalo ředění 1:9. Pro pozdější měření se vzorky inhibitorů, bylo použito ředění 1:6, protože enzym byl po optimalizaci vhodného koeficientu ředění uchováván při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a po opětovném rozmrazení ztratil část své aktivity.



Obr. 14: Postupný úbytek signálu angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) způsobený jeho štěpením enzymem Zmp1 a postupný nárůst signálu peptidu DRVY (m/z 552,3) – ředění enzymu 1:4. Vytvořeno v programu OriginPro 2017 (Academic).

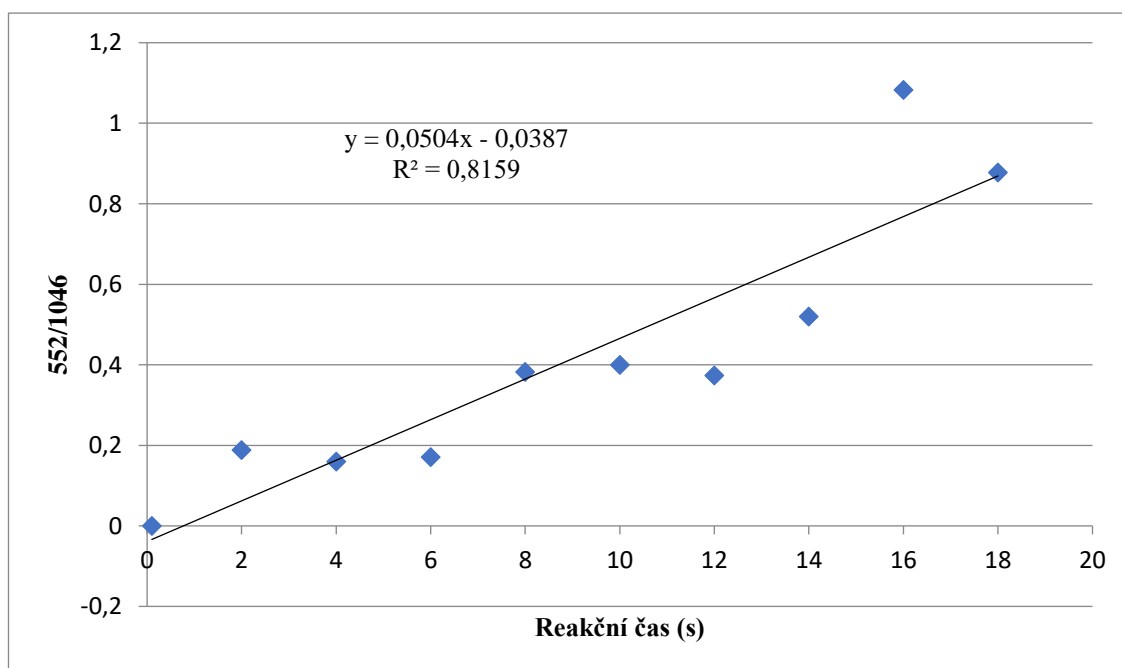


Obr. 15: Postupný úbytek signálu angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) způsobený jeho štěpením enzymem Zmp1 a postupný nárůst signálu peptidu DRVY (m/z 552,3) – ředění enzymu 1:14. Vytvořeno v programu OriginPro 2017 (Academic).

4.1.2 Stanovení aktivity Zmp1

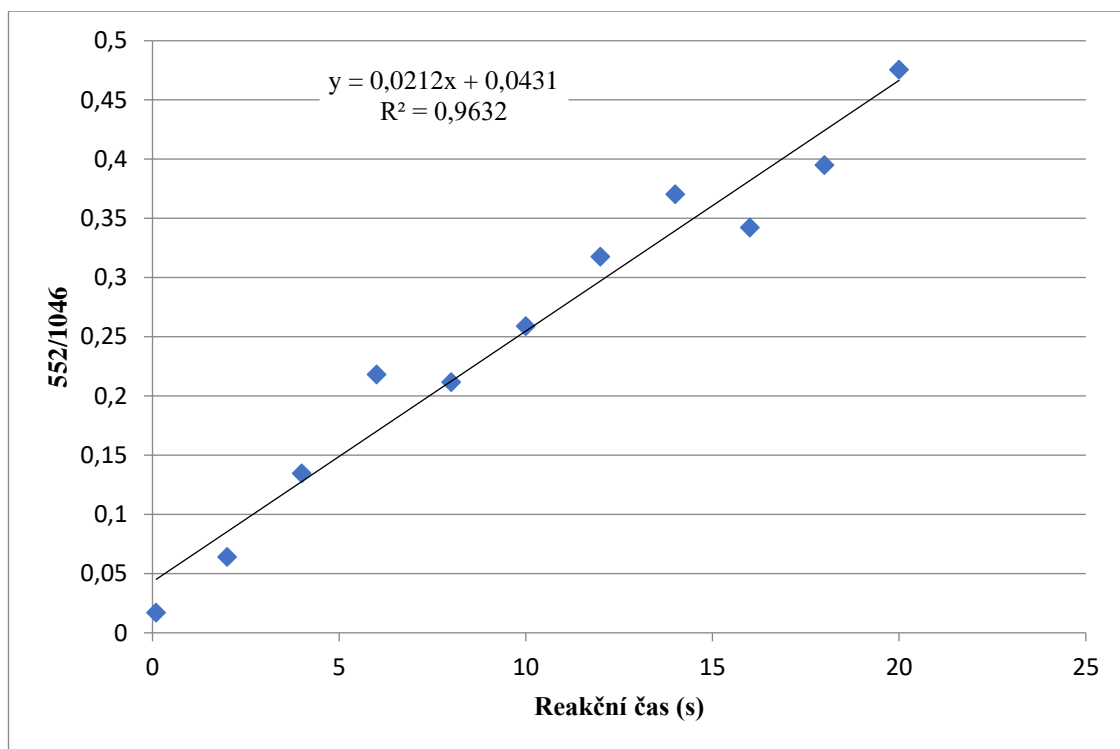
Aktivita Zmp1 v přítomnosti inhibitoru byla stanovena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Během enzymové reakce je sledován postupný úbytek signálu angiotensinu II a postupný vzrůst signálu peptidu DRVY. Naměřená hmotnostní spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru flexAnalysis 3.4. V programu byly v rámci jednotlivých měření označeny signály angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) a peptidu DRVY (m/z 552,3). Současně byly odečteny hodnoty intenzit těchto signálů, které byly dále zpracovány v programu MS Excel. Ze získaných hodnot byly určeny směrnice z rovnice lineární regrese inhibované a neinhibované reakce. Rovnice lineární regrese vyplývá z přímky ukazující změnu poměru intenzit signálů peptidu DRVY/angiotensinu II v čase.

Na Obr. 16 je znázorněn graf přímkové časové závislosti kontrolního vzorku na základě poměru intenzit signálů peptidu DRVY a angiotensinu II na reakčním čase.

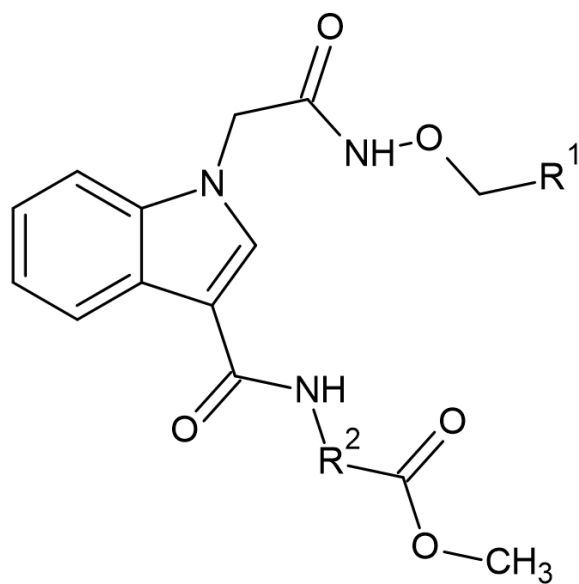


Obr. 16: Ukázka přímkové časové závislosti na základě poměru intenzit signálů peptidu DRVY (m/z 552,3) a angiotensinu II (m/z 1046,5) na reakčním čase bez přítomnosti inhibitoru a při $10\times$ ředěním enzymu

Obr. 17 reprezentuje graf přímkové časové závislosti vzorku v přítomnosti inhibitoru SL-VM-35b na základě poměru intenzit signálů peptidu DRVY a angiotensinu II na reakčním čase. Faktor ředění je v obou případech 10.



Obr. 17: Ukázka přímkové časové závislosti na základě poměru intenzit signálů peptidu DRVY (m/z 552,3) a angiotensinu II (m/z 1046,5) na reakčním čase v přítomnosti inhibitoru SL-VM-35b a při 10 \times ředěním enzymu



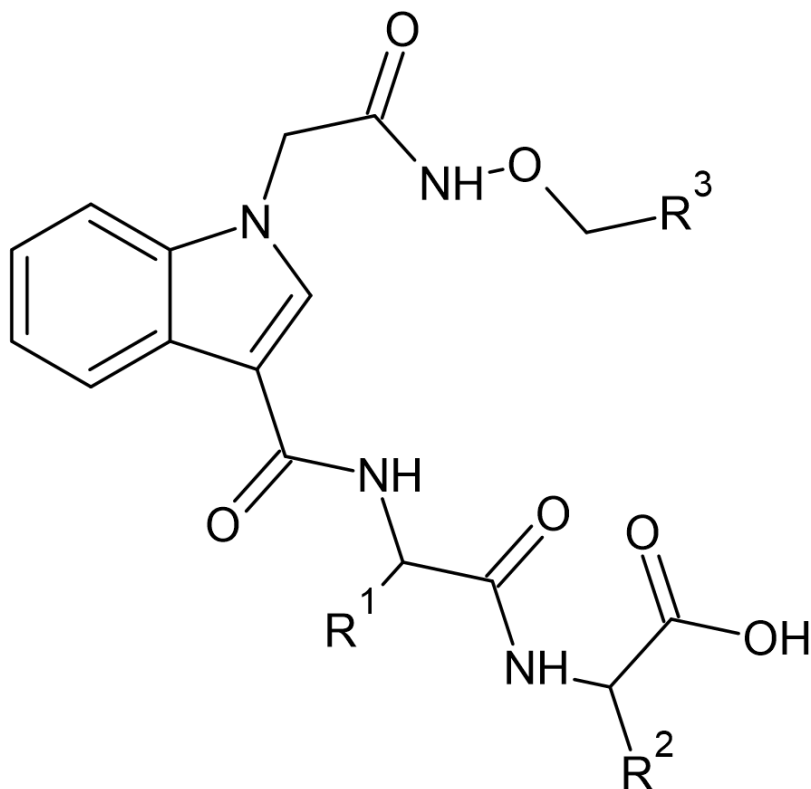
Obr. 18: Syntetizovaný hydroxamát s indolovým heterocyklem. R¹ představuje allylový nebo benzylový funkční zbytek. Vytvořeno v programu ChemSketch.

Měření bylo provedeno 6x pro SL-VM-35b a SL-VM-35c, 8x pro SL-VM-37 a SL-VM-37b. Z poměru sklonů rovnice lineární regrese inhibované a neinhibované reakce v jednotlivých měřeních byla vypočtena průměrná hodnota inhibičního účinku jednotlivých látek (Tab. 4). Látky SL-VM-35b a SL-VM-35c inhibují enzym z více než 50 %. Inhibitory SL-VM-37 a SL-VM-37b nemají na rychlost reakce žádný vliv. Z měření vyplývá, že přítomnost benzylové skupiny navázané na hydroxamátovou část molekuly (na Obr. 18 znázorněné pod označením R¹) negativně ovlivňuje inhibiční potenciál sloučeniny oproti přítomnosti allylové skupiny v téže pozici.

Tab. 4: Inhibiční aktivita zkoumaných inhibitorů Zmp1

Inhibitor	Procento inhibice (%)	Odchylka (%)
<i>SL-VM-35b</i>	62	5
<i>SL-VM-35c</i>	54	6
<i>SL-VM-37</i>	0	-
<i>SL-VM-37b</i>	0	-

Toto zjištění se koreluje s poznatky Dak et al. (2022), kteří testovali syntetické hydroxamáty s indolovým heterocyklem. Uvedené na Obr. 19. Odhalili, že všechny syntetizované inhibitory Zmpl s indolovým heterocyklem a navázanou allylovou skupinou v poloze R³ snižovali aktivitu enzymu přibližně o 50 %. Účinek inhibitoru 3d s navázaným allylem pozici R³ činil až 86 %.



Inhibitor	R ¹	R ²	R ³	Procento inhibice (%)	Odchylka (%)
3a	H	<i>i</i> Pr	Allyl	56	17
3b	H	<i>i</i> Bu	Allyl	47	11
3c	Me	<i>i</i> Pr	Allyl	50	13
3d	Me	<i>i</i> Bu	Allyl	86	6
3e	H	<i>i</i> Pr	Benzyl	69	5
3f	H	<i>i</i> Bu	Benzyl	57	4
3g	Me	<i>i</i> Pr	Benzyl	59	7
3h	Me	<i>i</i> Bu	Benzyl	56	2

Obr. 19: Syntetizovaný hydroxamát s indolovým heterocyklem, jehož inhibiční účinek byl testován Dak et al. (2022). R¹, R² a R³ představují substituenty uvedené v tabulce, která je součástí Obr. 19. Vytvořeno v programu ChemSketch.

Výzkumná skupina Dak et al. (2022) dále zkoumala také hydroxamáty s pyrolovým heterocyklem. Z této skupiny inhibitorů, projevil největší účinek na aktivitu enzymu (až 88 %) inhibitor s metylovou, isobutylovou a allylovou funkční skupinou. Jedná se o stejnou kombinaci funkčních skupin jako je u inhibitoru s indolovým heterocyklem *3d* na Obr. 19. Což představuje slibný potenciál těchto funkčních skupin a jejich možná využití pro hydroxamátovou kostru zkoumanou v této bakalářské práci.

Publikované studie zabývající se výzkumem vlivu inhibitorů na aktivitu proteasy Zmp1 využívají k dosažení výsledků, kromě MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Šlachťová et al., 2020; Dak et al., 2022) i fluorescenční spektroskopii. Petrera et al. (2012) zkoumali vliv Ilomastatu (inhibitor širokého spektra metaloproteas) pomocí fluorogenního substrátu, jež je štěpen enzymem Zmp1. Totožnou metodu použili i Mori et al. (2014, 2018) a Paolino et al. (2018). Avšak měření aktivity enzymů pomocí hmotnostní spektrometrie je výhodnější v tom smyslu, že není třeba umělý substrát, který může negativně ovlivnit získaná data (Bungert et al., 2004, Guidot et al., 2017). Další omezení při použití fluorescenční spektroskopie spočívá v potřebě pečlivého pufrování, které může silně ovlivňovat intenzitu fluorescence. Negativní vliv má i přítomnost rozpuštěného kyslíku a rovněž malé množství jodidu a oxidů dusíku (jedná se o účinné zhášecí fluorescence). Ultrafialové světlo použité k excitaci může způsobit fotochemické změny nebo snížení fluorescenčního záření molekuly. Ale zároveň se jedná o velmi citlivou a specifickou metodu, jelikož existuje možnost volby vlnové délky nejen u emitovaného záření, ale také u světla excitovaného (Bose et al., 2018).

Stanovení aktivity enzymu pomocí hmotnostní spektrometrie se běžně provádí porovnáním neznačeného peptidu se signály vnitřního standardu. V této práci je použit jednodušší přístup na základě poměru substrátu a produktu. Alternativně by se dal použít izotopicky značený vnitřní standard připravený hydrolyzou angiotensinu II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) ve vodě obsahující izotop ^{18}O . Štěpením vzniká peptid s hmotností o 2 Da vyšší (Mirgorodskaya et al., 2000). Případně by bylo možné využití strukturně podobného peptidu, jenž by se lišil v primární struktuře (jedna z aminokyselin by byla obměněna) (Machálková et al., 2018).

5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla zpracována literární rešerše zabývající se problematikou měření enzymové aktivity pomocí několika metod. Především měřením s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Druhá část literární rešerše se věnuje krystalové struktuře a inhibitorům mykobakteriální zinek dependentní metaloproteasy Zmp1. A jejímu vlivu na organismus při napadení *M. tuberculosis*. Dále je pozornost zaměřena na samotnou mykobakterii a onemocnění tuberkulózu, kterou způsobuje. Zmínka je věnována i celosvětovému výskytu tuberkulózy v roce 2022. Závěrečná kapitola informuje o již existujících léčebných postupech při léčbě tuberkulózy a již užívaných léčivech první a druhé linie. Uvedena jsou i nedávno schválená léčiva a léčiva, které jsou v současnosti podrobena klinického výzkumu.

V praktické části byl stanoven koeficient ředění pro optimalizaci aktivity enzymu Zmp1. Enzym štěpí lidský angiotensin II (DRVYIHPF; m/z 1046,5) na peptidy DRVY (m/z 552,3) a IHPF (m/z 513). Rychlost úbytku signálu angiotensinu II, resp. nárůstu peptidu DRVY, vypovídá o aktivitě Zmp1. Dále byl měřen vliv nově syntetizovaných heterocyklických hydroxamátů na aktivitu Zmp1 pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Sloučeniny SL-VM-35b a SL-VM-35c snižovali aktivitu Zmp1 přibližně o 60 %. Látky SL-VM-37 a SL-VM-37b neměli na enzymovou aktivitu žádný vliv.

6 LITERATURA

- Abrahams, K. A., & Besra, G. S. (2018). Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, 145(2), 116-133. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002377>
- Ahmed, A., Rakshit, S., Adiga, V., Dias, M., Dwarkanath, P., D'Souza, G., & Vyakarnam, A. (2021). A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological Reviews*, 301(1), 98-121. <https://doi.org/10.1111/imr.12968>
- Bahuguna, A., & Rawat, D. S. (2019). An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 263-292. <https://doi.org/10.1002/med.21602>
- Banke, N., Hansen, K., & Diers, I. (1991). Detection of enzyme activity in fractions collected from free solution capillary electrophoresis of complex samples. *Journal of Chromatography A*, 559(1-2), 325-335. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)80082-R](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)80082-R)
- Banni, G. A. H. D., & Nehmé, R. (2022). Capillary electrophoresis for enzyme-based studies: Applications to lipases and kinases. *Journal of Chromatography A*, 1661. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462687>
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., & Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), 1017-1031. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., & Kuster, B. (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4), 939-965. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6203-4>
- Baskaran, B., Gill, T. M., Furst, A. L., & Martín, O. (2023). An Improved Spectrophotometric Method for Toluene-4-Monooxygenase Activity. *Chemistry – A European Journal*, 29(19), 1590-1596. <https://doi.org/10.1002/chem.202203322>
- Belisário-Ferrari, M. R., Wei, R., Schneider, T., Honak, A., & Zimmermann, W. (2019). Fast Turbidimetric Assay for Analyzing the Enzymatic Hydrolysis of Polyethylene Terephthalate Model Substrates. *Biotechnology Journal*, 14(4). <https://doi.org/10.1002/biot.201800272>
- Bendicho, S., Trigueros, M. C., Hernández, T., & Martín, O. (2001). Validation and Comparison of Analytical Methods Based on the Release of p-Nitrophenol to Determine Lipase Activity in Milk. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1590-1596. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74592-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74592-4)
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bose, A., Thomas, I., & Abraham, E. (2018). Fluorescence spectroscopy and its applications: A Review. *Int. J. Adv. Pharm. Res*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.7439/ijapa.v8i1.4578>
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1-3), 91-97. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6)
- Bungert, D., Heinzle, E., & Tholey, A. (2004). Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. *Analytical Biochemistry*, 326(2), 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.11.013>
- Clark, J. B. (2001). Electrochemical assays: the oxygen electrode. In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (2nd ed., pp. 141 - 148). Oxford University Press.
- Chang, K. -C., Nuernberger, E., Sotgiu, G., & Leung, C. -C. (2018). New drugs and regimens for tuberculosis. *Respirology*, 23(11), 978-990. <https://doi.org/10.1111/resp.13345>
- Dak, M., Šlachtová, V., Šebela, M., Bazgier, V., Berka, K., Smiejkowska, N., Oorts, L., Cappoen, D., & Brulíková, L. (2022). Novel heterocyclic hydroxamates as inhibitors of the mycobacterial zinc metalloprotease ZMP1 to probe its mechanism of function. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 244, 114831. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114831>
- del Río, L. A., Ortega, M. G., López, A. L., & Gorgé, J. L. (1977). A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Analytical Biochemistry*, 80(2), 409-415. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90662-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90662-5)
- Dong, M. W. (2006). HPLC instrumentation and trends. *Modern HPLC for practicing scientists, USA*, 5-10.

- Duncan, M. W., Roder, H., & Hunsucker, S. W. (2008). Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 7(5), 355-370. <https://doi.org/10.1093/bfpg/eln041>
- Elbossaty, W. F. M. (2017). Lactate Dehydrogenase (LDH) as Prognostic Marker in Acute Leukemia Quantitative Method, 08(01). <https://doi.org/10.4172/2155-9864.1000375>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>
- Ferraris, D. M., Sbardella, D., Petrera, A., Marini, S., Amstutz, B., Coletta, M., Sander, P., & Rizzi, M. (2011). Crystal Structure of Mycobacterium tuberculosis Zinc-dependent Metalloprotease-1 (Zmp1), a Metalloprotease Involved in Pathogenicity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32475-32482. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fmicb.2016.01347>
- Goodfellow, M., Peter, K. Ā., Hans-Jürgen Busse, Trujillo, M. E., Ludwig, W., Suzuki, K. I., & Parte, A. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer New York.
- Goude, R., Amin, A. G., Chatterjee, D., & Parish, T. (2009). The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4138-4146. <https://doi.org/10.1128/AAC.00162-09>
- Greis, K. D., Zhou, S., Burt, T. M., Carr, A. N., Dolan, E., Easwaran, V., Evdokimov, A., Kawamoto, R., Roesgen, J., & Davis, G. F. (2006). MALDI-TOF MS as a label-free approach to rapid inhibitor screening. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(6), 815-822. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.02.019>
- Guirado, E., & Schlesinger, L. S. (2013). Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma – the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00098>
- Guitot, K., Scarabelli, S., Drujon, T., Bolbach, G., Amoura, M., Burlina, F., Jeltsch, A., Sagan, S., & Guianvarc'h, D. (2014). Label-free measurement of histone lysine methyltransferases activity by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 456, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.006>
- Guitot, K., Drujon, T., Burlina, F., Sagan, S., Beaupierre, S., Pamard, O., Dodd, R. H., Guillou, C., Bolbach, G., Sachon, E., & Guianvarc'h, D. (2017). A direct label-free MALDI-TOF mass spectrometry based assay for the characterization of inhibitors of protein lysine methyltransferases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(15), 3767-3777. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0319-5>
- Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 483-490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>
- Hernández-García, S., García-García, M. I., & García-Carmona, F. (2017). An improved method to measure lipase activity in aqueous media. *Analytical Biochemistry*, 530, 104-106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.05.012>
- Herraiz, T., & Guillén, H. (2018). Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions. *BioMed Research International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/4810394>
- Homolka J. (2016) *Tuberkulóza* (5. upravené vydání). Karolinum.
- Iqbal, S., Rehman, N. ur, Kortz, U., & Iqbal, J. (2013). Development of a fast and efficient CE enzyme assay for the characterization and inhibition studies of α -glucosidase inhibitors. *Journal of Separation Science*, 36(21-22), 3623-3628. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300758>
- John, R. A. (2001). Photometric assays. In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (2nd ed., pp. 49 - 78). Oxford University Press.
- Joshi, J. M. (2011). Tuberculosis chemotherapy in the 21 st century: Back to the basics. *Lung India*, 28(3). <https://doi.org/10.4103/0970-2113.83977>

- Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>
- Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs, W. R., Guerin, M. E., & Prados-Rosales, R. (2019). The Mycobacterium tuberculosis capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, 476(14), 1995-2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190324>
- Kodíček, M., Valentová, O., & Hynek, R. (2018). *Biochemie: chemický pohled na biologický svět* (2. přepracované vydání). Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Koolman, J., & Röhm, K. -H. (2012). *Barevný atlas biochemie* (překlad 4. vydání). Grada.
- Lagerkvist U. (2003). *Pioneers of microbiology and the Nobel prize*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore.
- Lambeth, D. O., & Muhonen, W. W. (1994). High-performance liquid chromatography-based assays of enzyme activities. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 656(1), 143-157. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00072-7](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00072-7)
- Ling, L., Xiao, C., Wang, S., Guo, L., & Guo, X. (2019). A pyrene linked peptide probe for quantitative analysis of protease activity via MALDI-TOF-MS. *Talanta*, 200, 236-241. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.055>
- Liu, Y., Matsumoto, M., Ishida, H., Ohguro, K., Yoshitake, M., Gupta, R., Geiter, L., & Hafkin, J. (2018). Delamanid: From discovery to its use for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *Tuberculosis*, 111, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.04.008>
- Luca, S., & Mihaescu, T. (2013). History of BCG Vaccine. *Maedica*, 8(1), 53–58.
- Ma, R., Hu, J., Cai, Z., & Ju, H. (2014). Dual Quinone Tagging for MALDI-TOF Mass Spectrometric Quantitation of Cysteine-Containing Peptide. *Analytical Chemistry*, 86(16), 8275-8280. <https://doi.org/10.1021/ac501703d>
- Machálková, M., Schejbal, J., Glatz, Z., & Preisler, J. (2018). A label-free MALDI TOF MS-based method for studying the kinetics and inhibitor screening of the Alzheimer's disease drug target β -secretase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(28), 7441-7448. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1354-6>
- Madigan M. T. Bender K. S. Buckley D. H. Sattley W. M. Stahl D. A. & Brock T. D. (2019). Brock biology of microorganisms (Fifteenth). Pearson ; Pearson Education limited.
- Master, S. S., Rampini, S. K., Davis, A. S., Keller, C., Ehlers, S., Springer, B., Timmins, G. S., Sander, P., & Deretic, V. (2008). Mycobacterium tuberculosis Prevents Inflammasome Activation, 3(4), 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.003>
- Miggiano, R., Rizzi, M., & Ferraris, D. M. (2020). Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis, Infection Prevention and Treatment. *Pathogens*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens9050385>
- Mirgorodskaya, O. A., Kozmin, Y. P., Titov, M. I., Körner, R., Sönksen, C. P., & Roepstorff, P. (2000). Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM, 14(14), 1226–1232. [https://doi.org/10.1002/10970231\(20000730\)14:14<1226::AID-RCM14>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/10970231(20000730)14:14<1226::AID-RCM14>3.0.CO;2-V)
- Mori, M., Moraca, F., Deodato, D., Ferraris, D. M., Selchow, P., Sander, P., Rizzi, M., & Botta, M. (2014). Discovery of the first potent and selective Mycobacterium tuberculosis Zmp1 inhibitor, 24(11), 2508-2511. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.004>
- Mori, M., Deodato, D., Kasula, M., Ferraris, D. M., Sanna, A., De Logu, A., Rizzi, M., & Botta, M. (2018). Design, synthesis, SAR and biological investigation of 3-(carboxymethyl)rhodanine and aminothiazole inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Zmp1, 28(4), 637-641. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.031>
- Mörsky, P., & Aine, E. (1983). Determination of lysozyme in tears by immunoturbidimetric and optimised kinetic bacteriolytic methods. *Clinica Chimica Acta*, 129(2), 201-209. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(83\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90217-6)
- Mukhametgalieva, A. R., Zueva, I. V., Aglyamova, A. R., Lushchekina, S. V., & Masson, P. (2020). A new sensitive spectrofluorimetric method for measurement of activity and kinetic study of cholinesterases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140270>

- Murray R.K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V. W., Weil P. A. (2009). Enzymes: Kinetic. In: *Harper's Illustrated Biochemistry*. (28th ed., pp. 69-83). The McGraw-Hill Companies.
- Nugraha, R. V., Yunivita, V., Santoso, P., Aarnoutse, R. E., & Ruslami, R. (2021). Clofazimine as a Treatment for Multidrug-Resistant Tuberculosis: A Review. *Scientia Pharmaceutica*, 89(2). <https://doi.org/10.3390/scipharm89020019>
- Ouyang, F., Zhao, Z., Gao, R., Shi, R., Wu, E., Lv, R., Xu, G., & Liu, J. (2018). Dual Maleimide Tagging for Relative and Absolute Quantitation of Cysteine-Containing Peptides by MALDI-TOF MS. *ChemBioChem*, 19(11), 1154-1161. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800031>
- Ouyang, F., Yu, T., Gu, C., Wang, G., Shi, R., Lv, R., Wu, E., Ma, C., Guo, R., Li, J., Zaczek, A., & Liu, J. (2019). Sensitive detection of caspase-3 enzymatic activities and inhibitor screening by mass spectrometry with dual maleimide labelling quantitation. *The Analyst*, 144(22), 6751-6759. <https://doi.org/10.1039/C9AN01458F>
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. (2nd ed.). Elsevier.
- Paolino, M., Brindisi, M., Vallone, A., Butini, S., Campiani, G., Nannicini, C., Giuliani, G., Anzini, M., Lamponi, S., Giorgi, G., Sbardella, D., Ferraris, D. M., Marini, S., Coletta, M., Palucci, I., Minerva, M., Delogu, G., Peponi, I., Goletti, D., et al. (2018). Development of Potent Inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis Virulence Factor Zmp1 and Evaluation of Their Effect on Mycobacterial Survival inside Macrophages. *ChemMedChem*, 13(5), 422-430. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700759>
- Petrera, A., Amstutz, B., Gioia, M., Hähnlein, J., Baici, A., Selchow, P., Ferraris, D. M., Rizzi, M., Sbardella, D., Marini, S., Coletta, M., & Sander, P. (2012). Functional characterization of the Mycobacterium tuberculosis zinc metallopeptidase Zmp1 and identification of potential substrates. *Bchm*, 393(7), 631-640. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0106>
- Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance, 3(6), 399-407. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.006>
- Prosser, G. A., & Carvalho, L. P. S. (2013). Kinetic mechanism and inhibition of Mycobacterium tuberculosis d -alanine: d -alanine ligase by the antibiotic d -cycloserine. *The FEBS Journal*, 280(4), 1150-1166. <https://doi.org/10.1111/febs.12108>
- Ramachandran, G., & Swaminathan, S. (2015). Safety and Tolerability Profile of Second-Line Anti-Tuberculosis Medications. *Drug Safety*, 38(3), 253-269. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0267-y>
- Reymond, J. -L., Fluxà, V. S., & Maillard, N. (2008). Enzyme assays. *Chem. Commun*, (1), 34-46. <https://doi.org/10.1039/B813732C>
- Sakamoto, K. (2012). The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Veterinary Pathology*, 49(3), 423-439. <https://doi.org/10.1177/0300985811429313>
- Santos, L. C. (2012). Review. *Open Journal of Medical Microbiology*, 02(01), 24-36. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2012.21004>
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Sia, J. K., Rengarajan, J., Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., Braunstein, M., & Rood, J. I. (2019). Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. *Microbiology Spectrum*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018>
- Stephanie, F., Saragih, M., & Tambunan, U. S. F. (2021). Recent Progress and Challenges for Drug-Resistant Tuberculosis Treatment. *Pharmaceutics*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050592>
- Subhedar, D. D., Shaikh, M. H., Nawale, L., Yeware, A., Sarkar, D., Khan, F. A. K., Sngshetti, J. N., & Shingate, B. B. (2016). Novel tetrazoloquinoline-rhodanine conjugates: Highly efficient synthesis and biological evaluation, 26(9), 2278-2283. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.045>
- Subhedar, D. D., Shaikh, M. H., Shingate, B. B., Nawale, L., Sarkar, D., Khedkar, V. M., Kalam Khan, F. A., & Sangshetti, J. N. (2017). Quinolidene-rhodanine conjugates: Facile synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 385-399. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.059>

- Suzuki, H. (2015). *How enzymes work: From structure to function*. Pan Stanford.
- Šebela, M., Luhová, L., Brauner, F., Galuszka, P., Radová, A., & Peč, P. (2001). Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(10), 831-839. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01304-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01304-3)
- Šlachťová, V., Šebela, M., Torfs, E., Oorts, L., Cappoen, D., Berka, K., Bazgier, V., & Brulíková, L. (2020). Novel thiazolidinedione-hydroxamates as inhibitors of Mycobacterium tuberculosis virulence factor Zmp1. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185(9), 1015-1027. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111812>
- Štosová T., Havliš J., Lenobl R., & Šebela M. (2005). Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku. *Chemické listy. Praha: Czech Chemical Society*, 99 (12), 896-905. ISSN 0009-2770.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D. B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., Barnes, S. W., Walker, J. R., Alland, D., Barry, C. E., & Boshoff, H. I. (2012). SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1797-1809. <https://doi.org/10.1128/AAC.05708-11>
- Timmins, G. S., & Deretic, V. (2006). Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1220-1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x>
- Tipton K. F. (2001). Principles of enzyme assay and kinetic studies. In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (2nd ed., pp. 1 - 48). Oxford University Press.
- Vemula, M. H., Mediseti, R., Ganji, R., Jakkala, K., Sankati, S., Chatti, K., & Banerjee, S. (2016). Mycobacterium tuberculosis Zinc Metalloprotease-1 Assists Mycobacterial Dissemination in Zebrafish. *Frontiers in Microbiology*, 7. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01347/abstract>
- Vyhláška č. 299/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů. (2010). <https://www.e-sbirka.cz/sb/2010/299?zalozka=text>
- Wallenfels, J., Vašáková, M., & Solovič, I. (2019). Current pharmacotherapy of tuberculosis. *Klinická farmakologie a farmacie*, 32(4), 10-14. <https://doi.org/10.36290/far.2018.032>
- Wehrl, W. (1983). Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 5(Supplement_3), S407-S411. https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement_3.S407
- WHO. (2023): *Global tuberculosis report*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 51 stran.
- Yagi, T., Kagamiyama, H., Ohtawara, S., Soda, K., & Nozaki, M. (1979). A new assay for l-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase. *Analytical Biochemistry*, 100(1), 20-24. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90104-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90104-0)
- Yang, L., Chen, C., Chen, Y., Shi, J., Liu, S., Guo, L., & Xu, H. (2010). High temporal resolution monitoring of enzyme reaction and inhibition using optically gated vacancy capillary electrophoresis and immobilized enzyme. *Analytica Chimica Acta*, 683(1), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.013>
- Zhao, W., Tian, M., Nie, R., Wang, Y., Guo, L., & Yang, L. (2012). Online Enzyme Discrimination and Determination of Substrate Enantiomers Based on Electrophoretically Mediated Microanalysis. *Analytical Chemistry*, 84(15), 6701-6706. <https://doi.org/10.1021/ac301125j>
- Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., Mitchison, D., Hatfull, G. F., & Jacobs Jr., W. R. (2014). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATB	aktivní tuberkulóza
AQUA	„absolute quantification approach“
BCG	bacil Calmette-Guérin
BODIPY	bor-dipyrrometheny
DAT	diacyltrehalosa
DHB	2,5-dihydroxybenzoová
DOTS	„directly observed treatment shortcourse“
DTNB	kyselina dithio-bis(2-nitrobenzoová)
DuMal	„dual maleimide tagging“
EMMA	„electrophoretically mediated Microanalysis“
ESI	ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“)
HCCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPOA	nenabitá protonovaná kyselina pyrazinová
ICAT	„isotope-coded affinity tag“
ICPL	„isotope-coded protein label“
IS	iontový zdroj
iTRAQ	„isobaric tags for absolute and relative quantification“
LTBI	latentní tuberkulóza
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice („matrix assisted laser desorption/ionization“)
MAO	monoaminoxidas
MDR-TB	„multidrug-resistant“
MPTP	4-fenyl-1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NOD-like“	„nucleotide-binding oligomerization domain-like“
PAT	polyacyltrehalosa
PDIM	ftthiocerol dimykocerosát
POA	kyselina pyrazinová
PRR	„pattern recognition“ receptory
SA	kyselina sinapová

SGL	sulfoglykolipid
SILAC	„stable isotope labelling of amino acids in cell culture“
TB	tuberkulóza
TDM	trehalosa dimykolát
TDR-TB	„totally drug-resistant“
TMM	trehalosa monomykolát
TMTs	„tandem mass tags“
ToF	analizátor doby letu („time-of-flight“)
XDR-TB	„extensively drug-resistant“