

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Vojtěch Synek

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Vývoj testu pro měření aktivity enzymu CA a jeho provádění v HTS

Diplomová práce

Bc. Vojtěch Synek

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Ing. Soňa Gurská, Ph.D.

Bibliografické údaje

Vojtěch Synek

Vývoj testu pro měření aktivity enzymu CA a jeho provádění v HTS

Diplomová práce

Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Ing. Soňa Gurská, Ph.D.

2020

Karboanhydráza, inhibitory CA, CA II, HTS

57 stran

Čeština

Souhrn

Karboanhydráza (CA) je enzym nacházející se ve většině živých organismů, kde plní funkci regulace pH. Katalyzuje reakci hydratace CO₂ na hydrogenuhličitan. Lidská forma α má 16 izoform a je přítomna ve všech tkáních těla. Některé izoformy jsou charakteristické pro různá onemocnění. To z enzymu dělá výborný terapeutický cíl. Inhibitory CA jsou používány pro léčbu glaukomu, obezity, epilepsií nebo rakoviny.

V této práci byla vyvíjena metoda pro stanovení aktivity enzymu α - CA II. Pro tento účel byla použita kolorimetrická a fluorescenční metoda. Pouze fluorescenční metoda byla zavedena do podmínek HTS. Metoda byla validována pomocí komerční knihovny LOPAC 1280 a poté pomocí fluorescenční metody bylo otestováno 5120 látek unikátní chemické knihovny ÚMTM na inhibitory α - CA II.

Bibliographical identification

Vojtěch Synek

Development of the assay for measurement of the CA activity and its implementation into HTS

Master's thesis

Department of cell biology and genetics, PřF UP Olomouc

Ing. Soňa Gurská, Ph.D.

2020

Carboanhydrase, CA inhibitors, CA II, HTS

57 pages

Czech

Summary

Carbonic anhydrase (CA) is an enzyme found in most of living organisms, where it regulates pH. CA catalyzes the hydration of CO₂ forming bicarbonate. Human α form has 16 isoforms and is present in all body tissues. Some isoforms are specific for various diseases. That makes the enzyme an excellent therapeutic target. CA inhibitors are used for treating glaucoma, obesity, seizures or cancer.

In this thesis a method for measuring activity of α - CA II was developed. Colorimetric and fluorescent method were used for this purpose. Only fluorescent method was implemented in the HTS environment. The method was validated by using commercial chemical library LOPAC 1280. Then the method was used to test 5120 compounds of unique chemical library of ÚMTM for α - CA II inhibitors.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Soni Gurské, Ph.D. a s pomocí citované literatury.

V Olomouci dne: Podpis:

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Soni Gurské, Ph.D. za její odborné rady, velkou trpělivost, čas a veškerou pomoc, kterou mi poskytla při zpracování mé diplomové práce. Rád bych také poděkoval rodině a svým blízkým, kteří mě při vytváření práce podporovali.

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	7
Seznam obrázků	8
Seznam tabulek.....	10
1. Úvod.....	11
2. Cíl práce.....	12
3. Literární přehled.....	13
3.1. Karboanhydrázy	13
3.1.1. Mechanismus reakce katalyzované CA	13
3.1.2. Typy CA	14
3.2. Inhibice CA a známé inhibitory.....	16
3.3. CA inhibitory jako léčiva.....	16
3.3.1. CA inhibitory jako antikonvulziva	17
3.3.2. CA inhibitory jako léčiva zeleného zákalu.....	18
3.3.3. CA inhibitory jako léčiva rakoviny	18
3.4. Objevování léčiv	20
3.4.1. Vysokokapacitní testování (High throughput screening- HTS)	21
3.4.2. Miniaturizace	22
3.4.3. Automatizace	22
3.4.4. Chemické knihovny	23
3.4.5. Z - faktor	24
4. Materiál a Metody.....	25
4.1. Použité chemikálie.....	25
4.2. Použité roztoky	25
4.3. Seznam použitých přístrojů	27
4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	28
4.4.1. Stanovení aktivity enzymu CA II pomocí kolorimetrické metody	28
4.4.1.1. Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu.....	28

4.4.2.	Stanovení aktivity enzymu CA II fluorescenční metodou.....	28
4.4.2.1.	Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu.....	28
4.4.2.2.	Stanovení vhodné koncentrace inhibitoru acetazolamidu jako pozitivní kontroly	29
4.4.2.3.	Zavedení fluorescenční metody pro stanovení aktivity enzymu CA II pro podmínky HTS	30
4.4.3.	Validace fluorescenční metody na komerční knihovně LOPAC 1280.....	30
4.4.3.1.	Test signálu.....	30
4.4.3.2.	Příprava testovací destičky	30
4.4.3.3.	Měření.....	31
4.4.3.4.	Vyhodnocení.....	31
4.4.4.	Hledání inhibitorů CA II pomocí fluorescenční metody	32
4.4.4.1.	Test signálu.....	32
4.4.4.2.	Příprava testovací destičky	32
4.4.4.3.	Měření.....	32
4.4.4.4.	Vyhodnocení.....	32
5.	Výsledky	33
5.1.	Stanovení aktivity enzymu CA II pomocí kolorimetrické metody.....	33
5.1.1.	Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu.....	33
5.2.	Stanovení aktivity enzymu CA II fluorescenční metodou.....	34
5.2.1.	Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu.....	34
5.2.2.	Stanovení vhodné koncentrace inhibitoru acetazolamidu jako pozitivní kontroly	35
5.2.3.	Zavedení fluorescenční metody na stanovení aktivity CA II pro podmínky HTS	36
5.2.4.	Validace fluorescenční metody na komerční knihovně LOPAC 1280.....	38
5.2.5.	Hledání inhibitorů CA II v chemické knihovně pomocí fluorescenční metody	41
6.	Diskuze	44
7.	Závěr	47
8.	Literatura.....	48

Seznam symbolů a zkratk

384 w lv MTP	384- jamková, nízkoobjemová mikrotitrační destička
BSA	Bovinní sérový albumin
CA	Karboanhydráza
DMSO	Dimethylsulfoxid
FR	Fenolová červeň
HEPES	4 - (2 - hydroxyethyl) – 1 - piperazineethanesulfonic acid
HTS	Vysokokapacitní testování
LOPAC	Knihovna farmaceuticky aktivních sloučenin
PI	Procento inhibice
RLU	Relative light units
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
uHTS	Ultra vysokokapacitní testování
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie

Seznam obrázků

Obr. 1 - Proces tvorby hydrogenuhličitanového iontu v aktivním místě CA.

Obr. 2 - Regenerace zásadité aktivní formy z neaktivní kyselé formy CA.

Obr. 3 - Přehled 16 izoform CA, subcelulární lokalizace a tkáň distribuce (Supuran, 2008).

Obr. 4 - Chemické struktury acetazolamidu, methazolamidu, ethoxzolamidu a dichlorphenamidu

Obr. 5 - Schéma systému regulujícího pH v hypoxických tumorech. BT = transportér hydrogenuhličitanu (Bicarbonate transporter).

Obr. 6 - Schéma průběhu objevování léčiv (Carnero, 2006)

Obr. 7 - Rozložení testovaných látek na 384- jamkové destičce (B = blank, H = high control/pozitivní kontrola – acetazolamid, L = low control/negativní kontrola – CAII, S = samples, testované látky)

Obr. 8 - Průběh reakce tvorby HCO_3^- katalyzované CA II, indikované FR. 1 = pouze pufr, 2 = CA II 1:0 (30 nmol/l), 3 = CA II 1:10 (3 nmol/l), 4 = CA II 1:100 (0,3 nmol/l). Měřeno spektrofotometrem EnVision, 557 nm.

Obr. 9 - Průběhy reakcí CO_2 a H_2O katalyzované CA II v koncentracích 30 nmol/l (CAII), 3 nmol/l (CAII 1:10) a 0,3 nmol/l (CAII 1:100) stanovené pomocí fluorescenční metody přístrojem FLIPR indikované pyraninem. Křivka B je reakce bez enzymu.

Obr. 10 - Průběhy reakcí CO_2 a H_2O katalyzované CA II o koncentraci 3 nmol/l za přítomnosti acetazolamidu (100 nmol/l, 62,5 nmol/l, 15,63 nmol/l, 3,91 nmol/l a 0,98 nmol/l). Křivka buffer-blank představuje reakci pouze s pufrům, křivka CAII představuje reakci katalyzovanou 3nmol/l neinhibovaným enzymem. Stanoveno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR, indikováno pyraninem.

Obr. 11 - Vzorový průběh reakce CO_2 a H_2O za působení CA II 1nmol/l, CA II 1nmol/l a inhibitoru (100 nmol/l) a pouze pufru. Stanoveno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR, indikované pyraninem.

Obr. 12 - Znázornění 3 vybraných časových intervalů reakce CO_2 a H_2O .

Obr. 13 - Hodnota procenta inhibice vypočítaná pro jednotlivé látky, příklad zobrazení výsledků v programu Dotmatics.

Obr. 14 - Distribuce látek (10 $\mu\text{mol/l}$) komerční knihovny LOPAC 1280 podle inhibiční aktivity vůči CAII testováno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Obr. 15 - Distribuce látek (0,1 $\mu\text{mol/l}$) komerční knihovny LOPAC 1280 podle inhibiční aktivity vůči CAII testováno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Obr. 16 - Vybrané křivky průběhu reakce CO_2 a H_2O katalyzované CAII (25 nmol/l).
Žlutá = pouze pufr, modrá = negativní kontrola, zelená = pozitivní kontrola, červená = aktivní látka, fialová = falešně pozitivní látka.

Seznam tabulek

Tab. 1 - Množství pipetované FR, ředění CA II a koncentrace CA II ve 4 jamkách pro stanovení vhodné koncentrace CA II pomocí kolorimetrické metody.

Tab. 2 - Množství pipetovaného pufru pro měření aktivity CA II, ředění enzymu CA II a koncentrace CA II ve 4 jamkách pro stanovení vhodné koncentrace CA II pomocí fluorescenční metody.

Tab. 3 - Množství pipetovaného pufru pro měření aktivity CA II, ředění enzymu CA II, koncentrace CA II v reakci a koncentrace acetazolamidu v reakci (AA) v 7 jamkách pro stanovení vhodné koncentrace inhibitoru pomocí fluorescenční metody.

Tab. 4 - Plochy pod křivkou reakcí CO₂ a H₂O katalyzovaných CA II v koncentracích 30 nmol/l (CAII), 3 nmol/l (CAII 1:10) a 0,3 nmol/l (CAII 1:100) stanovené pomocí fluorescenční metody přístrojem FLIPR indikované pyraninem.

Tab. 5 - Plochy pod křivkou reakcí CO₂ a H₂O katalyzovaných CA II (3 nmol/l) za přítomnosti inhibitoru acetazolamidu v 5 koncentracích. Stanoveno pomocí fluorescenční metody přístrojem FLIPR, indikované pyraninem.

Tab. 6 - Průměry ploch pod křivkou a jejich směrodatné odchylky pro interval reakce mezi 13. a 24. sekundou, kde byl přítomen CA II 1nmol/l, CA II 1nmol/l a inhibitor 100 nmol/l a pouze pufr bez CA II.

Tab. 7 - Z – faktory pro různé časové intervaly reakce CO₂ a H₂O katalyzované CAII.

Tab. 8 - Z – faktory intervalu reakce mezi 16 – 20 sekundou 8 destiček při testování komerční knihovny LOPAC fluorescenční metodou.

Tab. 9 - Potvrzené inhibitory CA a jejich procenta inhibice z komerční knihovny LOPAC 1280 o koncentraci 10 μmol/l testované fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Tab. 10 - Potvrzené inhibitory CA a jejich procenta inhibice z komerční knihovny LOPAC 1280 o koncentraci 0,1 μmol/l testované fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Tab. 11 - Aktivní látky chemické knihovny ÚMTM se známou inhibiční aktivitou vůči CA II, testované fluorescenční metodou.

Tab. 12 - Aktivní látky chemické knihovny ÚMTM s fluorescenčními vlastnostmi, vykazující falešnou pozitivitu vůči CA II, testované fluorescenční metodou.

Tab. 13 - Aktivní látky chemické knihovny ÚMTM s inhibičními účinky vůči CA II, které je třeba dále validovat, testované fluorescenční metodou.

1. Úvod

Většina organismů na světě produkuje aerobními metabolickými reakcemi velké množství CO₂. Tato molekula při neutrálním pH pomalu reaguje s vodou a tvoří nestabilní kyselinu uhličitou. Kyselina uhličitá okamžitě disociuje na dva důležité ionty ovlivňující pH homeostázu, hydrogenuhličitan a proton (Supuran et al., 2003).

CO₂, hydrogenuhličitan a protony jsou esenciální molekuly/ionty v mnoha důležitých fyziologických i patologických procesech u bakterií, archeí i eukaryot (Smith et al., 2000). Jelikož jsou tyto molekuly přeměňovány velmi pomalu, ale zároveň jsou potřebné k neustálému balancování homeostázy, vznikla potřeba tyto přeměny urychlit katalýzou. V alkalickém prostředí reaguje CO₂ s vodou velmi rychle. Ovšem alkalické prostředí je škodlivé pro většinu tkání, takže evolucí vznikla alternativa fungující v neutrálním pH. Reakce CO₂ a vody v neutrálním prostředí byla umožněna karboanhydrázami (CA) patřícími mezi metaloenzymy (Supuran, 2011).

CA jsou zapojeny do klíčových fyziologických procesů souvisejících s respirací, transportem CO₂/hydrogenuhličitanu, homeostázou pH a CO₂, sekrecí elektrolytů do různých tkání, glukoneogenezí, lipogenezí, močovinovým cyklem, kalcifikací a dalšími procesy (Supuran, 2008).

Některé izoenzymy CA, zapojené do zmíněných fyziologických procesů, jsou důležité terapeutické cíle. Inhibicí těchto CA se dají léčit poruchy jako glaukom, obezita, epilepsie osteoporóza nebo rakovina (Scozzafava et al., 2006).

CA byly charakterizovány nejen v savčích buňkách, ale i v prvocích (Krungrai et al., 2005), houbách (Morgensen et al., 2006) a bakteriích (Covarrubias et al., 2005). Tím pádem mohou být známé inhibitory CA použity jako potenciální léčiva nemocí způsobených právě těmito organismy (Supuran, 2008).

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na téma CA, mechanismus jejich katalytického účinku a charakterizace inhibitorů katalyzované reakce a popis vlastností vysokokapacitního testování pro identifikaci potenciálních nových inhibitorů.

Cílem experimentální části byl vývoj vhodné metody stanovení aktivity a inhibice aktivity CA, její zavedení a validace v HTS podmínkách a následné využití této metody pro identifikaci nových inhibitorů CA.

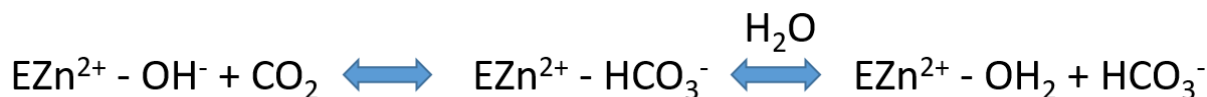
3. Literární přehled

3.1. Karboanhydrázy

3.1.1. Mechanismus reakce katalyzované CA

Reakce katalyzovaná CA je jednoduchá a běžná u všech živočišných druhů (Maren, 1984). Enzym se stará o vzájemnou konverzi mezi oxidem uhličitým a hydrogenuhličitanovým iontem a tím pádem je zapojen do fyziologických procesů spojených s respirací a transportem těchto dvou molekul mezi plicemi a metabolizující tkání (Supuran, 2008).

V savčích buňkách se nachází α -CA se zinečnatým iontem nezbytným pro katalýzu. Díky rentgenové krystalografii víme, že se zinečnatý iont nachází na spodu 15 Å hluboké štěrbině aktivního místa a je koordinován třemi histidinovými residui a molekulou vody (Stams et Christianson, 2000). Voda vázaná na zinečnatý iont je také vázána k hydroxylové části Threoninu 199. Threonin 199 je pak vázaný ke karboxylové části kyseliny glutamové 106. Tyto interakce posilují nukleofilitu vody, vázané na zinečnatý iont, a orientují substrát (CO_2) do správné pozice pro nukleofilní reakci (Lindskog et Silverman, 2000). Aktivní forma enzymu je zásaditá a má na zinečnatém iontu vázaný hydroxid. Ten předává elektrony CO_2 molekule, vázané v sousední hydrofobní kapse enzymu. Poté se tvoří hydrogenuhličitan koordinovaný k zinečnatému iontu. Hydrogenuhličitanový iont je následně uvolněn molekulou vody a vypuštěn do okolního prostředí. To zároveň vede k vytvoření kyselé formy enzymu s vodou vázanou na zinečnatý iont (obrázek 1). Pro regeneraci zásadité formy musí dojít k transferu protonu z aktivního místa do prostředí mimo enzym (obrázek 2) (Supuran, 2008).



Obr. 1 - Proces tvorby hydrogenuhličitanového iontu v aktivním místě CA.



Obr. 2 - Regenerace zásadité aktivní formy z neaktivní kyselé formy CA.

Limitující faktor celé katalýzy je reakce regenerace inaktivní formy CA na aktivní formu (Lindskog et Silverman, 2000). Ve velmi katalyticky aktivních formách (CA II, IV, V, VII a IX) je proces transferu protonu zajišťován histidiny okolo aktivního místa (Briganti et al., 1997).

Kromě hydratace CO₂ na hydrogenuhličitan, α-CA katalyzují reakce jako hydrataci kyanidu na kyselinu karbamovou, hydrataci kyanamidu na močovinu, hydrataci aldehydů na gem-dioly nebo hydrolyzu karboxylových a sulfonových kyselin. Není ovšem jasné, zda mají tyto ostatní reakce nějaký fyziologický význam (Supuran et al., 2004). Kromě hydratace má CA i esterázovou aktivitu (Tashian et al., 1964).

3.1.2. Typy CA

CA jsou skvělým příkladem konvergentní evoluce. Nezávisle na sobě vznikly alespoň pětkrát, jako pět geneticky odlišných enzymových rodin: α-, β-, γ-, δ- a ζ-CA (Supuran, 2011). Všechny patří mezi metaloenzymy. Typy α-, β- a δ-CA obsahují v aktivním místě zinečnatý iont, zatímco γ-CA obsahuje železnatý iont a ζ-CA obsahuje kademnatý iont (Krishnamurthy et al., 2008). α-CA se nacházejí v obratlovcích, řasách, prvocích a bakteriích. Typ β- je možné najít v bakteriích, řasách a houbách. γ-CA byla objevena v archeích a některých bakteriích (Smith et al., 2000) a δ- a ζ-CA jsou přítomny jen u mořských rozsivek (Xu et al., 2008).

V mnoha organismech jsou přítomny různé izoformy CA. Tyto izoformy se zásadně liší, jak v jejich katalytické aktivitě, tak v citlivosti k aktivátorům a inhibitorům (Supuran, 2011). Buňky vyšších obratlovců obsahují 16 izoform α-CA, které se nacházejí v různých buněčných organelách a jsou distribuovány v mnoha tkáních (obrázek 3). CA I – III, CA VII, VIII, X, XI a CA XIII jsou cytosolické formy. CA IV, IX, XII a XIV jsou vázány v membránách. CA V je mitochondriální forma se dvěma izoformami CA VA a CA VB (Supuran et Scozzafava, 2000). CA VI je poslední izoforma a je sekretována příušními žlázami do slin (Henkin, 1999). Existují tkáně, které obsahují více než jednu izoformu CA, ale také jsou tkáně, pro které je specifická pouze jedna izoforma (Hewett-Emmett, 2000).

Lidská CA II je 29 kDa monomerní metaloenzym s inkorporovaným zinkem a 259 residui (Silverman et Lindskog, 1988). Jedná se o nejefektivnější CA (Briganti et al., 1997) a patří k jedněm z nejefektivnějších enzymů vůbec ($k_{cat}/K_m = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) (Lindskog et Silverman, 2000). CA II je exprimována v mnoha tkáních včetně savčích červených krvinek (Dodgson, 1991). Autozomálně recesivní deficit tohoto proteinu u lidí vede k osteopetroze, renální tubulární acidóze, mentální a růstové retardaci a cerebrální kalcifikaci (Sly, 1991).

Isozyme	Subcellular localization	Tissue/organ localization
hCA I	Cytosol	Erythrocytes, GI tract
hCA II	Cytosol	Erythrocytes, eye, GI tract, bone osteoclasts, kidney, lung, testis, brain
hCA III	Cytosol	Skeletal muscle, adipocytes
hCA IV	Membrane-bound	Kidney, lung, pancreas, brain capillaries, colon, heart muscle
hCA VA	Mitochondria	Liver
hCA VB	Mitochondria	Heart and skeletal muscle, pancreas, kidney, spinal cord, GI tract
hCA VI	Secreted (saliva, milk)	Salivary and mammary glands
hCA VII	Cytosol	CNS
hCA VIII	Cytosol	CNS
hCA IX	Transmembrane	Tumours, GI mucosa
hCA X	Cytosol	CNS
hCA XI	Cytosol	CNS
hCA XII	Transmembrane	Renal, intestinal, reproductive epithelia, eye, tumours
hCA XIII	Cytosol	Kidney, brain, lung, gut, reproductive tract
hCA XIV	Transmembrane	Kidney, brain, liver
mCA XV	Membrane-bound	Kidney

Obr. 3 - Přehled 16 izoforem CA, subcelulární lokalizace a tkáň distribuce (Supuran, 2008).

3.2. Inhibice CA a známé inhibitory

Jsou známé tři hlavní skupiny CA inhibitorů: anionty vázající se s kovy, jednoduché anorganické anionty nebo nesubstituující sulfonamidy a jejich bioizostery. Inhibice CA je dobře prostudovaná. Inhibitory fungují tak, že buď substituují sebe za hydroxid vázající se na zinečnatý iont, nebo se přímo přidávají k zinečnatému iontu v aktivním místě (Supuran et al., 2004).

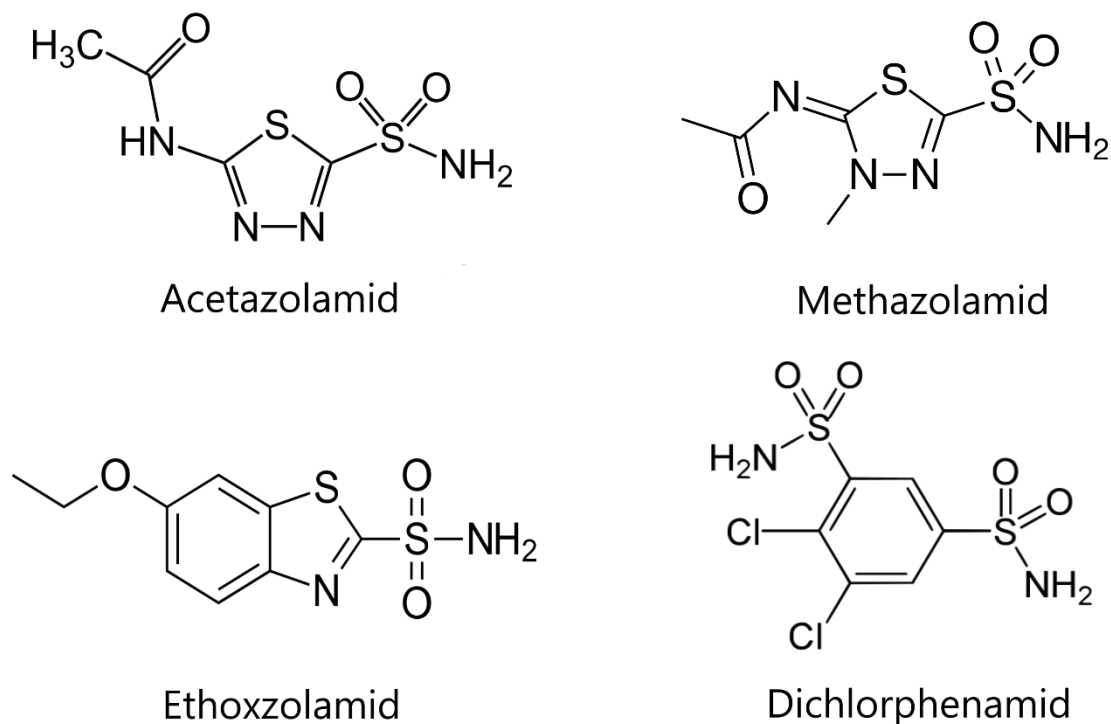
Nejlépe prozkoumanou skupinou CA inhibitorů jsou sulfonamidy (Supuran et al., 2003), sulfamáty (Winum et al., 2005) a sulfamidy (Winum et al., 2006). Sulfonamidy a jejich izostery mají využití v biomedicíně jako diuretika, antikonvulziva, léky proti zelenému zákalu, obezitě, různým rakovinám, bolesti nebo různým infekcím (Supuran, 2008). Fakt, že se CA nachází v patogenních organismech jako houbách či kvasinkách, dává těmto látkám možnost fungovat jako anti-infekční přípravky (Supuran, 2011). Sulfonamidy se vážou na zinečnatý iont CA pomocí atomu dusíku a využívají vodíkové můstky residuí threoninu 199 a glutamové kyseliny 106 k zakotvení molekuly inhibitoru k hydrofobním a hydrofilním částem aktivního místa (Stams et Christianson, 2000). Tyto interakce sulfonamidů s CA zajišťují vysokou afinitu k enzymu i při nanomolárních objemech inhibitoru (Abbate et al., 2003).

Anionty vázající se s kovy a jednoduché anorganické anionty jsou méně prozkoumanou skupinou a dostávají méně pozornosti než sulfonamidy (De Simone et Supuran, 2012). Obecně se vážou na CA s menší efektivitou než sulfonamidy (Maren, 1967). Příkladem aniontů komplexujících kovy je kyanid, thiokyanát, nebo sulfan (Bertini et al., 1978) a mezi jednoduché anionty patří například halogenidy, pseudohalogenidy, dusičnany nebo hydrogenuhličitan (Nishimori et al., 2009).

3.3. CA inhibitory jako léčiva

Klasickými CA inhibitory jsou již zmíněné sulfonamidy. Existuje nejméně 30 klinicky používaných sulfonamidů, sulfamátů či sulfamidů se signifikantními inhibičními vlastnostmi (Supuran, 2011). Mezi takové látky patří například acetazolamid, methazolamid, ethoxzolamid nebo dichlorphenamid. Jejich struktury jsou vyobrazeny na obrázku 4. Tyto látky jsou známé už několik desítek let. V 50. a 60. letech byly vyvíjeny jako diuretika a antiepileptika (Supuran, 2008). I když jejich využití jako diuretika nebylo nijak rozsáhlé, ukázalo se, že jejich inhibiční vlastnosti CA mohou být uplatněny v léčbě zeleného zákalu (Supuran et al., 2003). Dodnes jsou látky jako acetazolamid používány v oftalmologii.

Navíc bylo objeveno, že CA inhibitory zabírají i jako antikonvulziva, léky proti obezitě, rakovině, bolesti a některým infekcím. Nicméně vysoký počet izoform CA v lidském těle (16 CA, z toho 13 s katalytickou aktivitou), jejich rozmanitá lokalizace a nedostatek izoenzymové selektivity inhibitorů, činí hledání nových léčiv problematickým (Supuran et al., 2003).



Obr. 4 - Chemické struktury acetazolamidu, methazolamidu, ethoxzolamidu a dichlorphenamidu

3.3.1. CA inhibitory jako antikonvulziva

Záchvaty spojené s křečemi patří mezi nejčastější neurologické poruchy (Lothman et Collins, 1984). Jsou charakterizovány dysfunkcí v šedé hmotě mozku a objevují se kvůli abnormální, nadměrné, synchronní depolarizaci populace neuronů. Příčinami mohou být metabolické potíže, infekce, šok, toxiny nebo epilepsie (Angeles, 1981). Průvodním jevem záchvatů jsou prudké změny v koncentraci iontů a pH v extracelulárním prostoru neuronů (Xiong et Stringer, 2000). Obecně zásadité prostředí zvyšuje excitabilitu neuronů a umocňuje šíření záchvatu, zatímco kyselé prostředí dělá pravý opak (Bonnet et al., 1998). Vyrovňování pH v extra a intracelulárním prostoru je vykonáváno hlavně prostřednictvím CO₂ a HCO₃⁻. Tyto molekuly jsou vyvažovány právě CA (Aribi et Stringer, 2002).

CA se nacházejí v několika buněčných populacích v celé nervové soustavě a plní různé funkce (Cammer et Brion, 2000). Dlouhou dobu se věřilo, že v nervovém systému je exprimována pouze CA II (Filippi et al., 1978). Zjistilo se ovšem, že se zde exprimují i CA III, XII, CARP VIII a XI (carbonic anhydrase related protein)(Carter et al., 2000).

Acetazolamid je od roku 1953 schválen pro léčbu epilepsie. Primárně je používán v kombinované léčbě spolu s jinými antiepileptickými přípravky (Reiss et Oles, 1996). Bohužel acetazolamid neposkytuje dlouhodobé řešení pro léčbu epilepsie, jelikož si na něj tělo vybuduje toleranci (Cammer et Brion, 2000). Dalšími CA inhibitory používanými pro léčbu epilepsie jsou methazolamid, zonisamid a topiramát (Masereel et al., 2002).

3.3.2. CA inhibitory jako léčiva zeleného zákalu

Zelený zákal je chronické degenerativní oční onemocnění charakterizováno vysokým nitroočním tlakem, který způsobuje nevratné poškození zrakového nervu a může vést k trvalé slepotě (Bartlett et Jaanus, 2007). CA inhibitory představují nejvíc fyziologický způsob léčby tohoto onemocnění. Inhibicí enzymu CA se redukuje míra hydrogenuhličitanu a dosahuje se sekrece komorového moku, což redukuje nitrooční tlak o 25 – 30 % (Supuran, 2008).

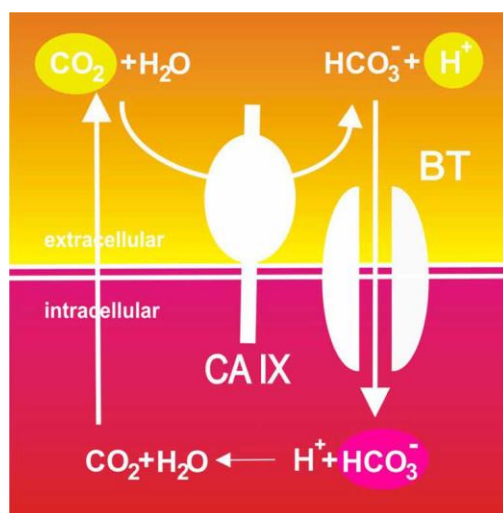
Nejpoužívanějšími léčivy jsou v této oblasti acetazolamid, methazolamid, ethoxzolamid a dichlorophenamid. Inhibují formy CA, zapojené do sekrece komorového moku, CA II a CA XII (Supuran, 2008). Nejideálnější z těchto látek pro léčbu zeleného zákalu je acetazolamid, protože nejvíce redukuje nitrooční tlak, není moc toxický a má ideální farmakokinetické vlastnosti (Bartlett et Jaanus, 2007). Jelikož se CA nacházejí i v jiných orgánech než v oku, tyto sulfonamidy mají inhibiční efekt i na jiné formy enzymu. To vede k nechtěným vedlejším efektům jako například k depresi, únavě, kovové chuti v ústech nebo třeba ke ztrátě váhy (Sugrue, 2000).

3.3.3. CA inhibitory jako léčiva rakoviny

Rakovina patří k hlavním zdravotním problémům v rozvinutých zemích. I přes to, že se významně pokročilo v konvenční terapii, stále je potřeba vyvíjet nové terapeutické postupy. V posledních 20 letech byly identifikovány nové nádorové linie a v nich se jeví CA jako dobrý terapeutický cíl (Denko, 2006). Ze všech 16 forem α -CA jsou s rakovinou spojovány jen některé izotypy. S tumory je asociovaná CA IX a CA XII. I když se CA XII běžně nachází i ve zdravých tkáních, je výrazně exprimovaná u karcinomu ledvin (Potter et Harris, 2003).

CA IX je overexprimována hlavně v hypoxických lidských tumorech (Robertson et al., 2004). Jedná se o tumory jícnu, plic, ledvin, tlustého střeva a konečníku, prsu, děložního čípku a močového měchýře (Harris, 2002). Hypoxie v tumorech spouští glykolýzu, což je kritický bod pro přežití hypoxického tumoru. Glykolýza nejenže generuje energii, ale také podporuje produkci nukleotidů, aminokyselin a lipidů, které jsou potřebné k tvorbě nových nádorových buněk (Vander Heiden et al., 2009). Na druhou stranu se glykolýzou produkuje nadbytek kyselých metabolických produktů, jako kyselina mléčná, protony a oxid uhličitý. Aby se buňky vyhnuly dlouhodobé intracelulární acidóze, aktivují systém regulující pH (Parks et al., 2011).

Systém regulující pH se skládá z části exportující laktát a protony a z části importující hydrogenuhličitan. Schéma systému regulujícího pH je vyobrazeno na obrázku 5. Cílem tohoto systému je okyselit extracelulární prostředí tumoru a zároveň mít mírně zásadité prostředí uvnitř nádorových buněk (Gerweck et Seetharaman, 1996). CA IX patří k části importující hydrogenuhličitan (Pastoreková et al., 2008). CA IX mění CO_2 a H_2O na zmíněný hydrogenuhličitan, který je poté importován hydrogenuhličitanovým transportérem do intracelulárního prostředí. Tento proces, a tím pádem i růst tumoru, může být narušen inhibicí CA IX pomocí sulfonamidových inhibitorů (Cecchi et al., 2005). Mezi takové látky patří již dříve zmíněný acetazolamid, methazolamid nebo ethoxzolamide (Vullo et al., 2003). Novou nadějnou látkou je indisulam (Supuran, 2003), který v roce 2018 prošel fází 2 klinické studie u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Assi et al., 2018). Dále byly zkoumány s dobrými výsledky i nově vytvořené halogenované sulfonamidy (Ilies et al., 2003).



Obr. 5 - Schéma systému regulujícího pH v hypoxických tumorech. BT = transportér hydrogenuhličitanu (Bicarbonate transporter) (Sedláková et al., 2014).

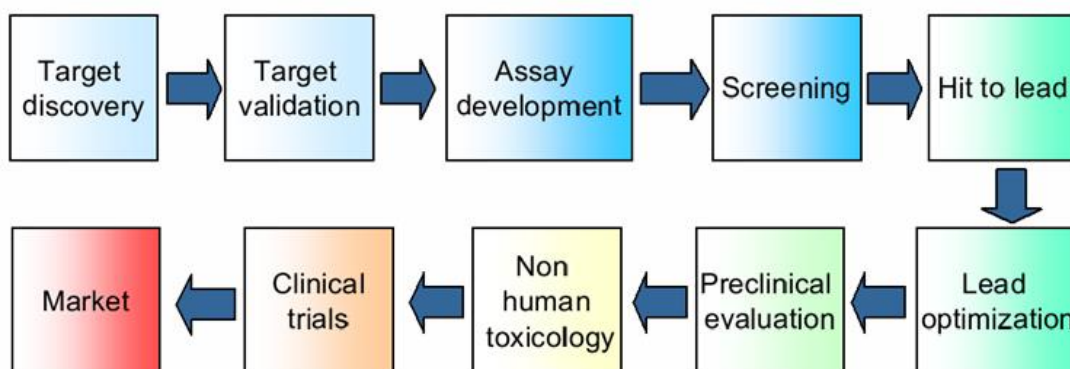
Všechny tyto dobře známé inhibitory jako acetazolamid nebo topiramát se dovedou vázat na více izoform, čímž mohou způsobovat nechtěné vedlejší účinky. Hledání nových inhibitorů nebo syntéza analogů již známých inhibitorů CA je cesta, jak najít látky vysoce selektivní vůči specifické izoformě CA (Buemi et al., 2015).

3.4. Objevování léčiv

Disciplína objevování léčiv je komplexní proces, jehož cílem je identifikovat nová léčiva (obrázek 6). V současnosti se na trh dostane jedna z přibližně milionu otestovaných látek. To vede k potřebě testovat chemické knihovny a vývoji vysokokapacitního testování.

Objevování léčiva začíná výběrem vhodného cíle. Takové cíle jsou většinou receptory, enzymy nebo iontové kanály. Po výběru cíle musí proběhnout jeho validace. Je potřeba mít jistotu, že ovlivňování vybraného cíle vede k efektivní léčbě nemoci. Ze začátku je proces validace cíle prováděn *in vitro* a na zvířecích modelech, ovšem konečná validace je dosažena v klinických studiích na lidech.

Po identifikaci cíle probíhá hledání látek, které ho ovlivňují. Tato fáze začíná navržením vhodného testu. Poté je daný cíl vystavován velkému počtu látek. Látky, které aktivně ovlivňují vybraný cíl, postupují do testování na zvířecích modelech. Po projití těmito testy je látka optimalizovaná, co se týče potence, selektivity, fyzicko-chemických a farmakokinetických vlastností a bezpečnostních opatření. Pak se až může zapojit do testování na lidech (Carnero, 2006).



Obr. 6 - Schéma průběhu objevování léčiv (Carnero, 2006)

3.4.1. Vysokokapacitní testování (High throughput screening- HTS)

Vysokokapacitní testování (HTS) je strategie využívaná při objevování nových léčiv ovlivňujících vybrané cíle či buněčné fenotypy. Skvělý HTS test je vysoce citlivý, vykazuje minimální variabilitu (mezi jednotlivými jamkami, destičkami i mezi testy), má vysoký poměr signálu vůči pozadí, není náročný na přípravu, je kompatibilní s DMSO a má kvalitní pozitivní kontroly (Shun et al., 2011).

HTS testy a chemické knihovny se vyvíjely kvůli potřebě testovat velké množství látek. Během posledních několika desetiletí se HTS vyvíjelo ve 3 fázích.

V 80. a 90. letech bylo HTS zaměřeno na knihovny malých molekul. V této době vznikly technologie, jako destičky s velkou hustotou jamek, homogenní eseje, automatické mikrolitrové dispenzery a celková automatizace.

Na konci 90. let se pozornost z knihoven malých molekul přesunula na knihovny obsahující jen léčiva a léčivům podobné látky. Vědci se také zaměřovali na vylepšování esejí a kontrolu jejich kvality. S tímto přístupem se snižovalo pokrytí testovaných látek z 10^{40} na 10^5 . Tím pádem pomocí kombinatorní chemie vznikaly knihovny látek s podobnými strukturami jako aktivní látka, hned jak je nalezena. Tím bylo dosaženo větší pokrytí důležitých struktur (Valler et Green, 2000).

S dostupností sekvence lidského genomu se na začátku 21. století objevilo množství nových cílů pro screening. Před přečtením lidského genomu existovalo zhruba 500 terapeuticky významných cílů. Po prozkoumání lidského genomu se toto číslo zvýšilo na 3000 (Terstappen et Reggiani, 2001). Díky nalezení tolika nových cílů se okamžitě začaly testovat miliony látek. To vedlo ke vzniku ultra HTS (uHTS) (Sittampalam et al., 1997). Tento proces dokázal otestovat ještě více látek v kratším čase. Eseje bylo možné provádět v 1536- jamkových destičkách a byly vytvořeny stroje, které dokázaly pracovat s objemy menšími než 2 μ l (Parker et al, 2000).

3.4.2. Miniaturizace

Současné objevování léčiv spoléhá na masivní testování chemických knihoven proti různým intra- i extracelulárním cílům. Zvýšení počtu testovatelných chemikálií i různých molekulárních cílů vedlo k miniaturizaci HTS testů. V začátcích HTS v 90. letech byly používány 96- jamkové mikrotitrační destičky. Během dalších deseti let se vyvinuly destičky s vyšší hustotou jamek. Začaly se používat 384- jamkové destičky s rozsahem 25 – 100 μ l objemu na jamku. Většina testů, jak biochemických, tak buněčných, může být bez problému adaptována pro 384- jamkové destičky. Tento formát je pro skladování či testování používán většinou farmaceutických a biotechnologických laboratoří (Fox, 2006).

Několik firem dokázalo adaptovat jejich metody pro práci s 1536- jamkovými destičkami (Klumpp et al., 2006). Normální pracovní objemy 1536- jamkových destiček se pohybují mezi 2,5 – 10 μ l. Některé firmy šly ještě dál a pokoušely se testovat na 3456- jamkových destičkách s pracovními objemy 1-2 μ l. Rutinní testování s 3456- jamkovými destičkami přináší některé logistické a technologické problémy (Brandish et al., 2006). Proto se hodně firem ubírá cestou testování s 384- a 1536- jamkovými destičkami (Houston et al., 2008).

Zajímavou alternativou se také staly 384- jamkové nízko objemové destičky (384w lv-MTP). Tyto destičky mají redukovaný objem jamky na 10 – 20 μ l. Výhodou 384w lv-MTP je možnost pracovat s menšími objemy na strojích a dispenzerech pro klasické 96/384- jamkové destičky a nemuset investovat do nových přístrojů (Macarron, 2006).

3.4.3. Automatizace

Současné HTS metody založené na práci s vícejamkovými destičkami vyžadují robotické systémy a systémy pro zacházení s malými objemy tekutin, citlivé detektory a software pro zpracování a kontrolu naměřených dat (Wu et Doberstein, 2006).

V HTS je kladen důraz na kvalitu pipetovacích systémů. Při práci s 384- jamkovými destičkami se setkáváme s potřebou pipetovat až nanolitrové objemy. Čas pipetování také hraje roli. Tekutiny se z jamek testovací destičky mohou vypařovat, což může ovlivnit výsledky experimentu. Často také pracujeme s enzymy, které podléhají degradaci. Proto jsou přesnost a rychlost důležité pro všechna tato testování (Stevens et al., 1998).

Sběr dat probíhá v citlivých detektorech. Detektory dokáží měřit fluorescenci, absorpenci či luminiscenci. Za zmínku stojí například přístroje EnVision nebo FLIPR (Hertzberg et Pope, 2000).

3.4.4. Chemické knihovny

Se znalostmi biologie na molekulární úrovni a technikami umožňujícími izolovat jakoukoliv složku biologických systémů je možné hledat biologicky aktivní sloučeniny testováním přirozených i syntetických ligandů proti různým biologickým cílům (Jung et Beck-Sickinger, 1992). Jelikož šance najít takový ligand se zvyšuje s množstvím otestovaných látek, nejlepší přístup je testovat velké knihovny látek (Pavia et al., 1993).

V posledních deseti letech značně pokročila metodika sestavování knihoven, z nichž byly nejužitečnější kombinatorní knihovny a DNA kódované knihovny (Virshup et al., 2013). Kombinatorní knihovny jsou vytvářeny pomocí kombinatorní chemie. Kombinatorní chemie je jedním z přístupů syntézy velkého množství různých látek. Kombinatorní chemie je založena na efektivní paralelní syntéze, ve které je generováno větší množství chemických látek než je počet kroků syntézy. Navíc po nalezení aktivní látky je možné pomocí kombinatorní chemie rychle prozkoumat aktivitu různých struktur dané látky (Terrett, 1998).

Principem DNA kódovaných knihoven je kovalentní označení látek knihovny jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou DNA. DNA slouží jako barkód (Wilson et Szostak, 1999). Takto je možné všechny označené molekuly spojit do jednoho poolu, aby interagoval s cílovým proteinem. Molekuly, které s proteinem nějak interagovaly, jsou zpětně identifikovány pomocí DNA barkódu (Halpin et Harbury, 2004).

Spousta firem nabízí komerční knihovny s předpřipravenými sety látek. Knihovny obsahují tzv. „zlaté standardy“, precizně charakterizované látky se známou aktivitou. Jednou z takových knihoven je LOPAC 1280 (Library of Pharmacologically Active Compounds). Jedná se o knihovnu 1280 dobře charakterizovaných malých molekul, které reprezentují různé mechanismy účinku a cílí na rozmanité receptory (Raftery et al., 2014). Jde hlavně o látky účinné v oblasti buněčné signalizace a neurotransmise. Ve velké míře se jedná o látky, které jsou v současnosti na trhu nebo v klinických studiích. Všechny látky knihovny jsou již rozpuštěny v DMSO, takže jejich příprava nezabere žádný čas. Knihovna se dá koupit v klasické a „small scale“ variantě.

Klasická varianta obsahuje látky o objemu 250 μl a koncentraci 10 mmol/l. „Small scale“ varianta obsahuje látky o objemu 25 μl a stejné koncentraci (Sigma – Aldrich, 2020).

3.4.5. Z - faktor

Ve většině HTS programů je každá látka testována maximálně v singletech nebo duplikátech. Z toho důvodu je tedy pro identifikaci aktivních látek potřeba, aby testy byly dostatečně přesné a citlivé. Všechna měření jsou ovlivněna, ať přístroji nebo lidským faktorem, jistou mírou variability. Logicky, čím menší variabilita mezi měřeními, tím je vyšší šance, že byla aktivní látka určena správně (Iversen et al., 2006).

Z - faktor je nejběžněji používaným parametrem ke sledování kvality a výkonu testu (Zhang et al., 1999). Existují i další statistické hodnoty pro měření kvality testů, nicméně výhoda Z - faktoru tkví v jeho jednoduchosti a vypovídající hodnotě (Iversen et al., 2006). Z - faktor je využíván při vývoji testu, kde se sleduje efekt změn podmínek testu. Zároveň také Z - faktor monitoruje výkon testu při screeningových kampaních, jako kontrola kvality jednotlivých destiček (Gubler, 2006).

Z - faktor bere v potaz dynamický rozsah signálu testu, variace spojené s měřením vzorků a variace spojené s měřením kontrol. Je vypočítán podle schématu,

$$Z = 1 - \frac{(3\sigma_s + 3\sigma_c)}{|\mu_s - \mu_c|}$$

kde σ_s a σ_c jsou směrodatné odchylky vzorků a kontrol a μ_s a μ_c jsou průměry vzorků a kontrol.

Například pokud se $(3\sigma_s + 3\sigma_c)$ přibližuje 0 a $|\mu_s - \mu_c|$ nekonečnu, Z – faktor se přibližuje 1, své maximální a ideální hodnotě. Čím vyšší Z – faktor je, tím jsou data naměřená danou esejí kvalitnější. Vynikající testy mají Z – faktor od 0,5 do 1. Test se Z – faktorem pod 0,5 je potřeba optimalizovat (Zhang et al., 1999).

4. Materiál a Metody

4.1. Použité chemikálie

Acetazolamid (Sigma-Aldrich, USA)

Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)

CA II (ÚOCHB, AV ČR)

Deionizovaná voda

DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

Fenolová červeň (Sigma-Aldrich, USA)

HEPES (Sigma-Aldrich, USA)

Na₂SO₄ (Lach-Ner, ČR)

Pyranine (Sigma-Aldrich, USA)

Tris (Sigma-Aldrich, USA)

4.2. Použité roztoky

Acetazolamid 10 mmol/l

Pro přípravu 10 ml roztoku bylo rozpuštěno 0,022 g acetazolamidu v DMSO. 10 ml bylo rozděleno po 1 ml do mikrozkušavek a uchováváno v -20 °C. Před experimentem byl naředěný na koncentraci 10 μmol/l.

BSA 10%

Pro přípravu 10% BSA byl rozpuštěn 1 g BSA v 10 ml destilované H₂O. Uchováno v lednici.

CA II

Enzym CA II byl purifikovaný na ÚOCHB AV (dr. Brynda). Byly dodány 2 šarže, 1 šarže o koncentraci 0,89 μmol/l, 2. šarže o koncentraci 27,35 μmol/l. Aktivita byla sledovaná u neředěného enzymu, enzymu ředěného 1:10 (1 μl enzymu přidáný k 10 μl Tris pufru) a 1:100 (1 μl enzymu 1:10 přidáný k 10 μl Tris pufru).

HEPES 0,5 mol/l, pH = 7,5

Pro přípravu 0,5 l roztoku bylo rozpuštěno 59,575 g HEPES v destilované H₂O a pH upravené na hodnotu 7,5 pomocí HCl. Uchováváno v lednici.

Na₂SO₄ 0,1 mol/l

Pro přípravu 0,5 l roztoku bylo rozpuštěno 7,1 g Na₂SO₄ v destilované H₂O. Uchováváno v lednici.

Pufr pro měření aktivity CA II

K přípravě 100 ml pufru bylo přidáno 10 ml HEPES (0,5 mol/l), 40 ml Na₂SO₄ (0,1 mol/l), 0,4 ml pyraninu (1 mmol/l), 0,6 ml BSA 10% a 49 ml deionizované H₂O.

Pufr pro měření aktivity CA II obsahující CA II

K 80 ml pufru pro měření aktivity CA II bylo přidáno 145,6 µl CA II (2. šarže - 27,35 µmol/l). Pufr byl vyroben těsně před experimentem a ponechán na ledu.

Pyranin 1 mmol/l

Pro přípravu 5 ml roztoku bylo rozpuštěno 0,0026 g pyraninu v destilované a deionizované vodě a uskladněno v -20 °C. Takto připravený roztok byl stabilní maximálně 2 měsíce.

Tris 50 mmol/l, pH = 7,8

Pro přípravu 0,5 l roztoku bylo rozpuštěno 3,0275 g Tris v destilované a deionizované H₂O. Hodnota pH byla upravena na 7,8 pomocí H₂SO₄.

Voda sycena CO₂

Do 100ml láhky byla přidána deionizovaná voda. Voda se začala sytit CO₂ alespoň hodinu před začátkem experimentu a byla sycena CO₂ během celého experimentu.

4.3. Seznam použitých přístrojů

Analytické váhy (Scaltech, USA)

Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo)

Echo 550 (LabCyte, USA)

EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA)

FLIPR Tetra High-Throughput Cellular Screening System (Molecular Devices, USA)

FlowBox HeraSafe (Thermo Fisher Scientific, USA)

Míchačka MR Hei – Tec (Heidolph Instruments GmbH, Německo)

Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific, USA)

pH metr Ultra Basic (P-LAB, ČR)

PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent Technologies, USA)

Tundra Store Automated Low Temperature Freezer (HighResBiosolutions, USA)

Váha pětímístná XA (RadWag, ČR)

Vortex IKA Genius 3 (P-LAB, ČR)

4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1. Stanovení aktivity enzymu CA II pomocí kolorimetrické metody

4.4.1.1. Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu

Pro předběžné testy byl do 4 jamek 384- jamkové průhledné destičky pipetován pracovní roztok fenolové červeně (FR) a enzymu CA II (1. šarže - 0,89 $\mu\text{mol/l}$), CA II 1:10 a CA II 1:100 podle tabulky 1. Destička byla vložena do přístroje EnVision a pomocí jeho pipetovacího zařízení bylo do jamek postupně pipetováno 15 μl vody sycené CO_2 . Po pipetování vody se začala měřit absorbance dané jamky. Absorbance byla měřena 38 sekund každé 2 sekundy při 557 nm. Po změření jedné jamky přístroj pokračoval v pipetování jamkou následující. Celý experiment měl 3 technická opakování.

Tab. 1 - Množství pipetované FR, ředění CA II a koncentrace CA II ve 4 jamkách pro stanovení vhodné koncentrace CA II pomocí kolorimetrické metody.

Jamka	Množství roztoku FR [μl]	Ředění CA II (0,89 $\mu\text{mol/l}$) [1 μl]	Koncentrace CA II v reakci [nmol/l]
1	15	/	/
2	14	1:0	30
3	14	1:10	3
4	14	1:100	0,3

4.4.2. Stanovení aktivity enzymu CA II fluorescenční metodou

4.4.2.1. Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu

Pro předběžné testy byly použity 4 jamky 384 Black ViewPlate. Do jamek byl pipetován pufr pro měření aktivity CA II a CA II (1. šarže – 0,89 $\mu\text{mol/l}$) CA II 1:10 a CA II 1:100 podle tabulky 2. Destička byla vložena do přístroje FLIPR a pomocí jeho pipetovacího systému bylo do jamek pipetováno 15 μl vody sycené CO_2 . Přístrojem FLIPR byla měřena fluorescence všech jamek najednou 10 sekund před pipetováním a 60 sekund po pipetování vody každou sekundu za použití excitačního filtru 470 – 495 nm a emisního filtru 515 – 575 nm. Experiment byl opakován 3x.

Tab. 2 - Množství pipetovaného pufru pro měření aktivity CA II, ředění enzymu CA II a koncentrace CA II ve 4 jamkách pro stanovení vhodné koncentrace CA II pomocí fluorescenční metody.

Jamka	Množství pufru pro měření aktivity CA II [μ l]	Ředění enzymu CA II (0,89 μ mol/l) [1 μ l]	Koncentrace CA II v reakci [nmol/l]
1	15	/	/
2	14	1:0	30
3	14	1:10	3
4	14	1:100	0,3

4.4.2.2. Stanovení vhodné koncentrace inhibitoru acetazolamidu jako pozitivní kontroly

Pro stanovení vhodné koncentrace inhibitoru bylo použito 7 jamek destičky 384 Black ViewPlate. Pomocí přístroje Echo550 byl do jamek 3 až 7 pipetován acetazolamid tak, aby výsledná koncentrace v 30 μ l reakce byla 100 nmol/l, 62,5 nmol/l, 15,63 nmol/l, 3,91 nmol/l a 0,98 nmol/l. Do všech 6 jamek byl pipetován pufr pro měření aktivity CA II a do jamek 2 až 6 byla pipetována CA II ředěná 1:10 (1. šarže – 0,89 μ mol/l) Tris pufrem podle tabulky 3. Destička byla vložena do přístroje FLIPR a pomocí jeho pipetovacího systému bylo do jamek pipetováno 15 μ l vody syčené CO₂. Přístrojem FLIPR byla měřena fluorescence všech jamek najednou 10 sekund před pipetováním a 60 sekund po pipetování vody každou sekundu za použití excitačního filtru 470 – 495 nm a emisního filtru 515 – 575 nm.

Tab. 3 - Množství pipetovaného pufru pro měření aktivity CA II, ředění enzymu CA II, koncentrace CA II v reakci a koncentrace acetazolamidu v reakci v 7 jamkách pro stanovení vhodné koncentrace inhibitoru pomocí fluorescenční metody.

Jamka	Množství pufru pro měření aktivity CA II [μ l]	Ředění enzymu CA II (0,89 μ mol/l) [1 μ l]	Koncentrace CA II v reakci [nmol/l]	Koncentrace acetazolamidu v reakci [nmol/l]
1	15	/	/	/
2	14	1:10	3	/
3	14	1:10	3	100
4	14	1:10	3	62,50
5	14	1:10	3	15,63
6	14	1:10	3	3,91
7	14	1:10	3	0,98

4.4.2.3. Zavedení fluorescenční metody pro stanovení aktivity enzymu CA II pro podmínky HTS

Do všech jamek destičky 384 Black ViewPlate bylo pipetováno 15 μ l pufru pro měření aktivity CA II pomocí přístroje MultiDrop. První třetina jamek obsahovala enzym CA II (1 nmol/l). Druhá třetina jamek obsahovala enzym CA II (1 nmol/l) a acetazolamid (100 nmol/l). Poslední třetina jamek obsahovala pouze pufr pro měření aktivity CA II. Destička byla vložena do přístroje FLIPR a pomocí jeho pipetovacího systému bylo do jamek pipetováno 15 μ l vody syčené CO₂. Přístrojem FLIPR byla měřena fluorescence všech jamek najednou 10 sekund před pipetováním a 60 sekund po pipetování vody každou sekundu za použití excitačního filtru 470 – 495 nm a emisního filtru 515 – 575 nm. Byly vypočítány Z – faktory pro různé časové intervaly reakce a jejich hodnoty byly porovnané. Pipetovací stanice MultiDrop a FLIPR použité v tomto experimentu budou použity pro podmínky HTS.

4.4.3. Validace fluorescenční metody na komerční knihovně LOPAC 1280

4.4.3.1. Test signálu

Před začátkem experimentu bylo do 3 jamek jiné 384- jamkové destičky pipetováno 15 μ l pufru pro měření aktivity CA II. Fluorescence pyraninu v jamkách byla měřena pomocí přístroje FLIPR za použití excitačního filtru 470 – 495 nm a emisního filtru 515 – 575 nm. Signál by neměl být vyšší než 50 000 RLU (relative light units). Požadovaný signál jsme docílili úpravou gate-u a délkou expozice.

4.4.3.2. Příprava testovací destičky

Pro validaci metody byla použita komerční knihovna LOPAC 1280. Na otestování všech látek z LOPAC knihovny ve dvou koncentracích jsme použili 8 destiček 384 Black ViewPlate. Pozitivní kontrola acetazolamid (30 nl, 0,1 mmol/l) byla pipetována do pozic A2 – H2 a A23 – H23 pomocí přístroje Echo550. Do sloupců 3 – 22 prvních čtyř destiček bylo pomocí Echo550 přeneseno 30 nl látek o koncentraci 10 mmol/l a do druhých čtyř destiček bylo přeneseno 30 nl látek o koncentraci 0,1 mmol/l. Do sloupců 1 a 24 bylo pomocí přístroje MultiDrop pipetováno 15 μ l pufru pro CA II. Sloupce 1 a 24 a jamky I2 – P2 a I23 – P23 sloužily jako negativní kontroly. Do sloupců 2 – 23 bylo pipetováno 15 μ l pufru pro měření

aktivity CA II obsahující CA II. Takto připravená destička (obrázek 7) byla promíchána a centrifugována (1500 rpm, 1 min, laboratorní teplota).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24																				
A	H	H	S	1,1	S	1,17	S	3,3	S	4,9	S	6,5	S	8,1	S	9,7	S	11,3	S	12,9	S	14,5	S	16,1	S	17,7	S	19,3	S	20,9	S	22,5	S	24,1	S	25,7	S	27,3	S	28,9	S	30,5	H	H
B	H	H	S	2,1	S	1,8	S	3,4	S	5,0	S	6,6	S	8,2	S	9,8	S	11,4	S	13,0	S	14,6	S	16,2	S	17,8	S	19,4	S	21,0	S	22,6	S	24,2	S	25,8	S	27,4	S	29,0	S	30,6	H	H
C	H	H	S	3,1	S	1,9	S	3,5	S	5,1	S	6,7	S	8,3	S	9,9	S	11,5	S	13,1	S	14,7	S	16,3	S	17,9	S	19,5	S	21,1	S	22,7	S	24,3	S	25,9	S	27,5	S	29,1	S	30,7	H	H
D	H	H	S	4,1	S	2,0	S	3,6	S	5,2	S	6,8	S	8,4	S	10,0	S	11,6	S	13,2	S	14,8	S	16,4	S	18,0	S	19,6	S	21,2	S	22,8	S	24,4	S	26,0	S	27,6	S	29,2	S	30,8	H	H
E	H	H	S	5,1	S	2,1	S	3,7	S	5,3	S	6,9	S	8,5	S	10,1	S	11,7	S	13,3	S	14,9	S	16,5	S	18,1	S	19,7	S	21,3	S	22,9	S	24,5	S	26,1	S	27,7	S	29,3	S	30,9	H	H
F	H	H	S	6,1	S	2,2	S	3,8	S	5,4	S	7,0	S	8,6	S	10,2	S	11,8	S	13,4	S	15,0	S	16,6	S	18,2	S	19,8	S	21,4	S	23,0	S	24,6	S	26,2	S	27,8	S	29,4	S	31,0	H	H
G	H	H	S	7,1	S	2,3	S	3,9	S	5,5	S	7,1	S	8,7	S	10,3	S	11,9	S	13,5	S	15,1	S	16,7	S	18,3	S	19,9	S	21,5	S	23,1	S	24,7	S	26,3	S	27,9	S	29,5	S	31,1	H	H
H	H	H	S	8,1	S	2,4	S	4,0	S	5,6	S	7,2	S	8,8	S	10,4	S	12,0	S	13,6	S	15,2	S	16,8	S	18,4	S	20,0	S	21,6	S	23,2	S	24,8	S	26,4	S	28,0	S	29,6	S	31,2	H	H
I	B	L	S	9,1	S	2,5	S	4,1	S	5,7	S	7,3	S	8,9	S	10,5	S	12,1	S	13,7	S	15,3	S	16,9	S	18,5	S	20,1	S	21,7	S	23,3	S	24,9	S	26,5	S	28,1	S	29,7	S	31,3	L	B
J	B	L	S	10,1	S	2,6	S	4,2	S	5,8	S	7,4	S	9,0	S	10,6	S	12,2	S	13,8	S	15,4	S	17,0	S	18,6	S	20,2	S	21,8	S	23,4	S	25,0	S	26,6	S	28,2	S	29,8	S	31,4	L	B
K	B	L	S	11,1	S	2,7	S	4,3	S	5,9	S	7,5	S	9,1	S	10,7	S	12,3	S	13,9	S	15,5	S	17,1	S	18,7	S	20,3	S	21,9	S	23,5	S	25,1	S	26,7	S	28,3	S	29,9	S	31,5	L	B
L	B	L	S	12,1	S	2,8	S	4,4	S	6,0	S	7,6	S	9,2	S	10,8	S	12,4	S	14,0	S	15,6	S	17,2	S	18,8	S	20,4	S	22,0	S	23,6	S	25,2	S	26,8	S	28,4	S	30,0	S	31,6	L	B
M	B	L	S	13,1	S	2,9	S	4,5	S	6,1	S	7,7	S	9,3	S	10,9	S	12,5	S	14,1	S	15,7	S	17,3	S	18,9	S	20,5	S	22,1	S	23,7	S	25,3	S	26,9	S	28,5	S	30,1	S	31,7	L	B
N	B	L	S	14,1	S	3,0	S	4,6	S	6,2	S	7,8	S	9,4	S	11,0	S	12,6	S	14,2	S	15,8	S	17,4	S	19,0	S	20,6	S	22,2	S	23,8	S	25,4	S	27,0	S	28,6	S	30,2	S	31,8	L	B
O	B	L	S	15,1	S	3,1	S	4,7	S	6,3	S	7,9	S	9,5	S	11,1	S	12,7	S	14,3	S	15,9	S	17,5	S	19,1	S	20,7	S	22,3	S	23,9	S	25,5	S	27,1	S	28,7	S	30,3	S	31,9	L	B
P	B	L	S	16,1	S	3,2	S	4,8	S	6,4	S	8,0	S	9,6	S	11,2	S	12,8	S	14,4	S	16,0	S	17,6	S	19,2	S	20,8	S	22,4	S	24,0	S	25,6	S	27,2	S	28,8	S	30,4	S	32,0	L	B

Obr. 7 - Rozložení testovaných látek na 384-jamkové destičce (B = blank, H = high control/pozitivní kontrola – acetazolamid, L = low control/negativní kontrola – CAII, S = samples, testované látky)

4.4.3.3. Měření

Destička 384 ViewPlate byla vložena do přístroje FLIPR. Byl použit excitační filtr 470 – 495 nm a emisní filtr 515 – 575 nm. Začala se měřit absorbance všech jamek současně každou sekundu po 70 sekund. Po 10 sekundách od začátku měření bylo pomocí pipetovací hlavičky s 384 špičkami do všech jamek destičky pipetováno 15 µl deionizované vody sycené CO₂.

4.4.3.4. Vyhodnocení

Data byla vyhodnocena a validována v programu Dotmatics. Podle změn pH v každé jamce přístroj FLIPR zaznamenával změnu fluorescence každou sekundu po 70 sekund. Byla analyzována plocha pod křivkou mezi 16. a 20. sekundou reakce. Pro každou látku bylo vypočítané procento inhibice (PI) a na základě této hodnoty byly vybrány aktivní látky, tj. látky, které způsobily aspoň 50% inhibici reakce.

4.4.4. Hledání inhibitorů CA II pomocí fluorescenční metody

4.4.4.1. Test signálu

Před začátkem experimentu bylo do 3 jamek jiné 384- jamkové destičky pipetováno 15 μ l pufru pro měření aktivity CA II. Fluorescence pyraninu v jamkách byla měřena pomocí přístroje FLIPR za použití excitačního filtru 470 – 495 nm a emisního filtru 515 – 575 nm. Signál by neměl být vyšší než 50 000 FIU/RLU. Požadovaného signálu bylo docíleno úpravou gate-u a délkou expozice.

4.4.4.2. Příprava testovací destičky

Pro experiment byla použita destička 384 Black ViewPlate. Pozitivní kontrola acetazolamid (30 nl, 0,1 mmol/l) byla pipetována do pozic A2 – H2 a A23 – H23 pomocí přístroje Echo550. Do sloupců 3 – 22 bylo ze zdrojových destiček s látkami (10 mmol/l) pomocí přístroje Echo550 přeneseno 30 nl každé látky. Do sloupců 1 a 24 bylo pomocí přístroje MultiDrop pipetováno 15 μ l pufru pro CA II. Sloupce 1 a 24 a jamky I2 – P2 a I23 – P23 sloužily jako negativní kontroly. Do sloupců 2 – 23 bylo pipetováno 15 μ l pufru pro měření aktivity CA II obsahující CA II. Takto připravená destička byla centrifugována (1500 rpm, 1 min, laboratorní teplota). Celkem bylo otestováno 5120 nových látek o koncentraci 10 μ mol/l.

4.4.4.3. Měření

Destička 384 ViewPlate byla vložena do přístroje FLIPR. Byl použit excitační filtr 470 – 495 nm a emisní filtr 515 – 575 nm. Začala se měřit absorbance všech jamek současně každou sekundu po 70 sekund. Po 10 sekundách od začátku měření bylo pomocí pipetovací hlavičky s 384 špičkami do všech jamek destičky pipetováno 15 μ l deionizované vody sycené CO₂.

4.4.4.4. Vyhodnocení

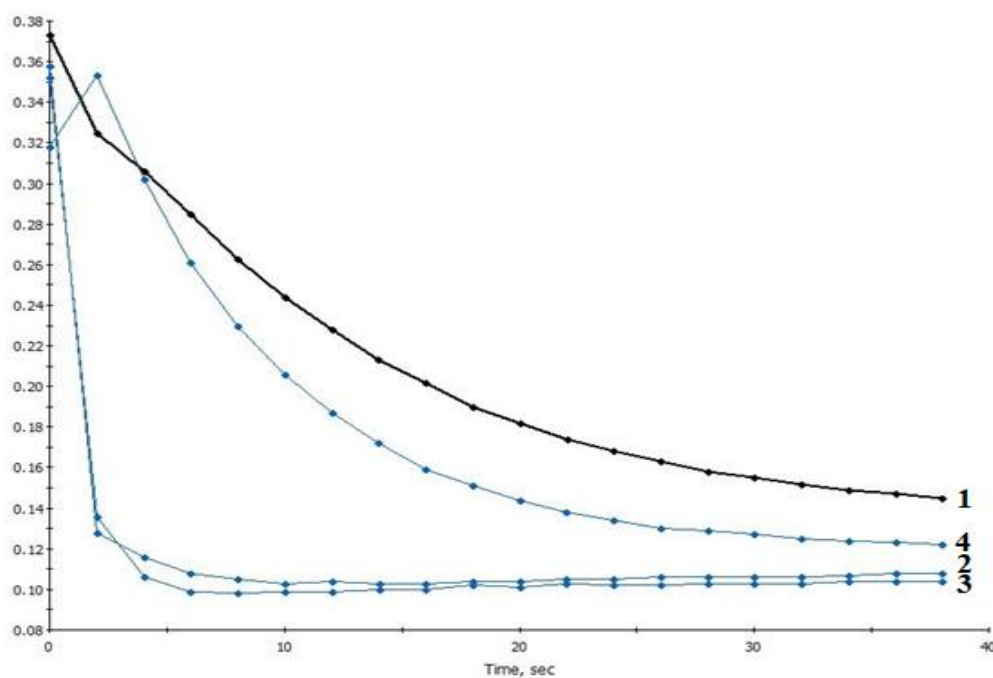
Data byla vyhodnocena a validována v programu Dotmatics. Podle změn pH v každé jamce přístroj FLIPR zaznamenával fluorescenci každou sekundu po 70 sekund. Pro každou látku bylo vypočítané PI a na základě této hodnoty byly vybrány aktivní látky, tj. látky, které způsobily aspoň 50% inhibici reakce.

5. Výsledky

5.1. Stanovení aktivity enzymu CA II pomocí kolorimetrické metody

5.1.1. Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu

Pomocí spektrofotometru EnVision byla sledována změna pH indikována FR způsobena tvorbou hydrogenuhličitanu z H_2O a CO_2 . V prvním pokusu byl sledován vliv 3 různých koncentrací enzymu CA II. Obrázek 8 zaznamenává průběh reakce při 557 nm. Křivka 1 zobrazuje průběh reakce bez přítomnosti enzymu CA II. Změna pH probíhá pomalu. Křivky 2 a 3 klesají prudce, což představuje rychlý pokles pH vlivem přítomnosti neředěné CA II (30 nmol/l) a CA II ředěné 1:10 (3 nmol/l). Rychlost změny pH vlivem CA II ředěné 1:100 (0,3 nmol/l) zaznamenaný křivkou 4 připomíná nekatalyzovanou reakci. Měření 4 jamek touto metodou trvalo téměř 3 minuty. Změření celé destičky by trvalo více než 4 hodiny.

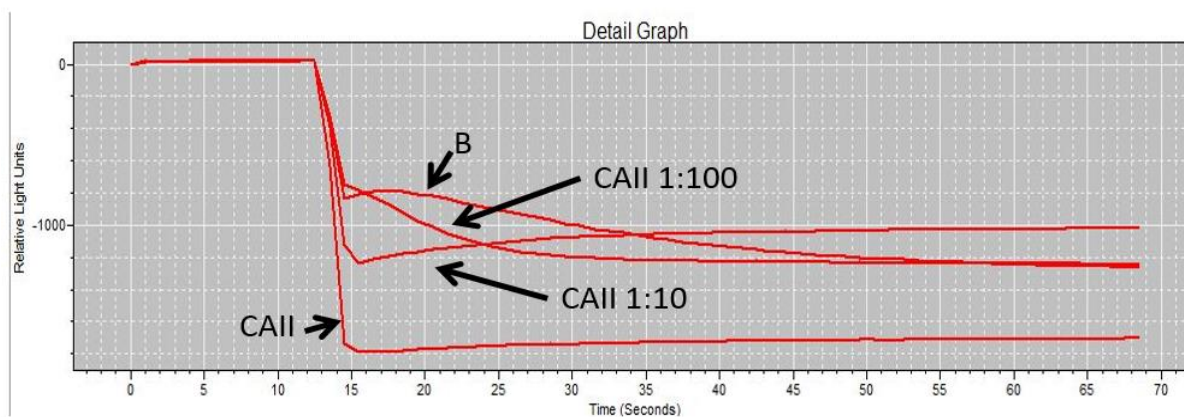


Obr. 8 - Průběh reakce tvorby HCO_3^- katalyzované CA II, indikované FR. 1 = pouze pufr, 2 = CA II 1:0 (30 nmol/l), 3 = CA II 1:10 (3 nmol/l), 4 = CA II 1:100 (0,3 nmol/l). Měřeno spektrofotometrem EnVision, 557 nm.

5.2. Stanovení aktivity enzymu CA II fluorescenční metodou

5.2.1. Stanovení vhodné koncentrace enzymu CA II a podmínek experimentu

Přístrojem FLIPR byl zaznamenán průběh reakce CO_2 a H_2O katalyzovaný CA II (30 nmol/l), CA II 1:10 (3 nmol/l) a CA II 1:100 (0,3 nmol/l). Na obrázku 9 jsou ukázány křivky reakcí. Křivka CA II klesá prudce, což značí rychlý pokles pH v reakci katalyzované nejkoncentrovanějším enzymem. Křivka CA II 1:10 má prudší průběh mezi 13. a 16. sekundou, ale pak se více podobá křivkám CA II 1:100 a B. Rychlost reakce je nepřímo úměrná ploše pod křivkou. Plocha pod křivkami (tabulka 4) ukazuje, že ředění enzymu má na jeho aktivitu velký vliv. Nejvyšší plochu pod křivkou má reakce katalyzovaná enzymem o koncentraci 30 nmol/l. Zbylé tři reakce mají podobné hodnoty ploch pod křivkou.



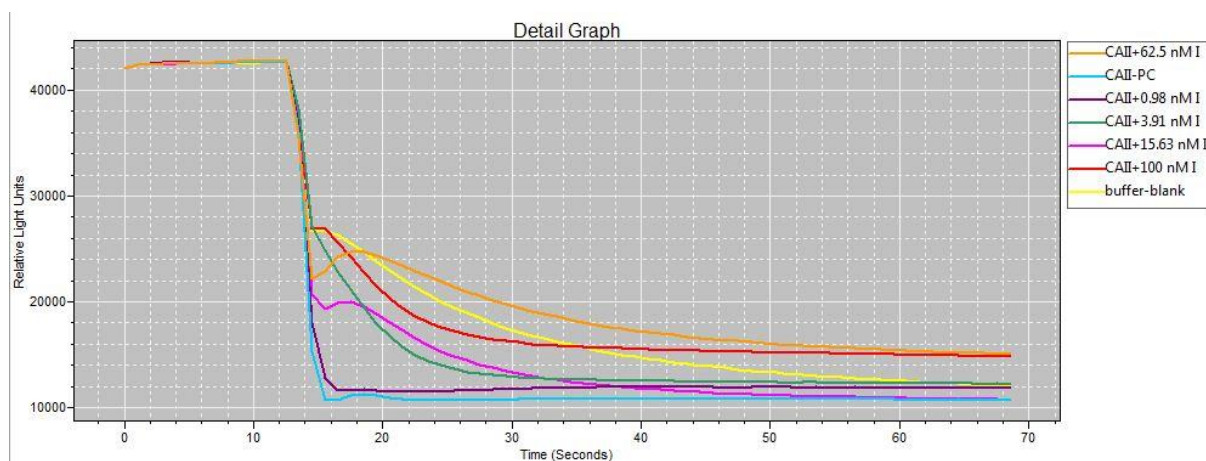
Obr. 9 - Průběhy reakcí CO_2 a H_2O katalyzované CA II v koncentracích 30 nmol/l (CAII), 3 nmol/l (CAII 1:10) a 0,3 nmol/l (CAII 1:100) stanovené pomocí fluorescenční metody přístrojem FLIPR indikované pyraninem. Křivka B je reakce bez enzymu.

Tab. 4 - Plochy pod křivkou reakcí CO_2 a H_2O katalyzovaných CA II v koncentracích 30 nmol/l (CAII), 3 nmol/l (CAII 1:10) a 0,3 nmol/l (CAII 1:100) stanovené pomocí fluorescenční metody přístrojem FLIPR indikované pyraninem.

	Plocha pod křivkou
Pufr	94 143,3
CA II	58 775,92
CA II 1:10	95 138,97
CA II 1:100	89 627,9

5.2.2. Stanovení vhodné koncentrace inhibitoru acetazolamidu jako pozitivní kontroly

Přístrojem FLIPR byl zaznamenán průběh reakce CO_2 a H_2O katalyzovaný CA II o koncentraci 3 nmol/l za přítomnosti inhibitoru acetazolamidu ve 4 koncentracích. Křivky reakcí jsou zaznamenány na obrázku 10. Nejprudší průběh měla reakce katalyzovaná CA II bez přítomnosti inhibitoru, čemuž odpovídá i její plocha pod křivkou (tabulka 5). Nejpomaleji reakce probíhala v jamce s pufrem. Reakce inhibované acetazolamidem o koncentracích 100 nmol/l a 62,5 nmol/l měly podobný průběh jako nekatalyzovaná reakce. Reakce inhibované acetazolamidem o koncentracích 15,63 nmol/l a 3,91 nmol/l měly prudší průběh než předchozí 2 reakce, ale inhibice je zde stále patrná. Reakce inhibovaná acetazolamidem o koncentraci 0,98 nmol/l se křivkou podobala neinhibované reakci, inhibice je zde minimální. V dalších experimentech jsme se rozhodli používat koncentraci acetazolamidu 100 nmol/l.



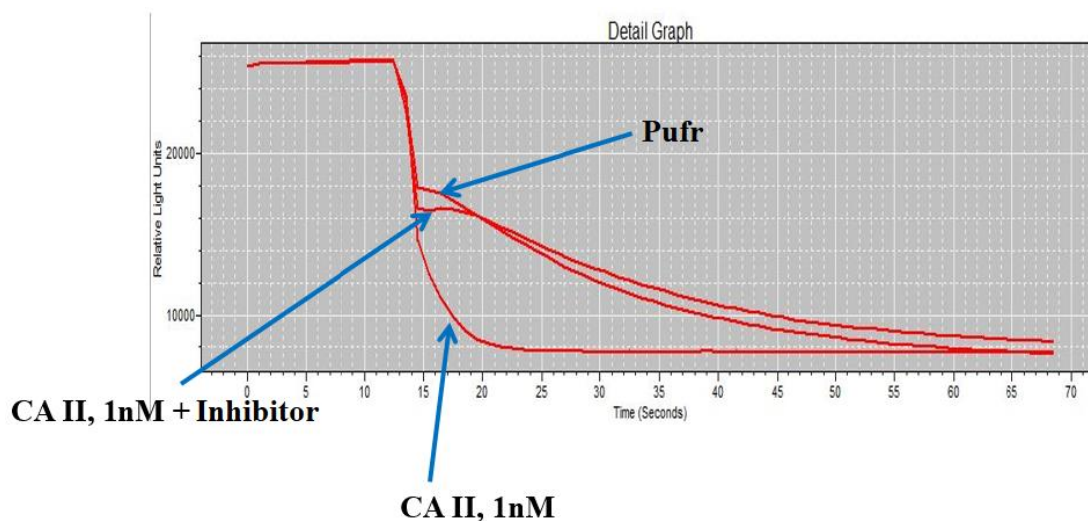
Obr. 10 - Průběhy reakcí CO_2 a H_2O katalyzované CA II o koncentraci 3 nmol/l za přítomnosti acetazolamidu (100 nmol/l, 62,5 nmol/l, 15,63 nmol/l, 3,91 nmol/l a 0,98 nmol/l). Křivka buffer-blank představuje reakci pouze s pufrem, křivka CAII představuje reakci katalyzovanou 3nmol/l neinhibovaným enzymem. Stanoveno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR, indikováno pyraninem.

Tab. 5 - Plochy pod křivkou reakcí CO₂ a H₂O katalyzovaných CA II (3 nmol/l) za přítomnosti inhibitoru acetazolamidu v 5 koncentracích. Stanoveno pomocí fluorescenční metody přístrojem FLIPR, indikované pyraninem.

	Plocha pod křivkou
Pufr	708 607,41
CA II	486 607,36
CA II + acetazolamid 100 nmol/l	678 357,55
CA II + acetazolamid 62,5 nmol/l	733 974,37
CA II + acetazolamid 15,63 nmol/l	597 147,35
CA II + acetazolamid 3,91 nmol/l	602 802,79
CA II + acetazolamid 0,98 nmol/l	512 351,30

5.2.3. Zavedení fluorescenční metody na stanovení aktivity CA II pro podmínky HTS

Pomocí přístroje FLIPR byl zaznamenán průběh reakce CO₂ a H₂O za přítomnosti CA II, CA II inhibovaného acetazolamidem (100 nmol/l) a pouze pufru. Na obrázku 11 jsou 3 vzorové reakce. Nejprudší průběh měla reakce katalyzovaná neinhibovaným enzymem. Křivky reakcí s inhibovaným enzymem a pouze s pufrům jsou srovnatelné. Pro každý typ reakce byl vypočítán průměr ploch (tabulka 6).



Obr. 11 - Vzorový průběh reakce CO₂ a H₂O za působení CA II 1nmol/l, CA II 1nmol/l a inhibitoru (100 nmol/l) a pouze pufru. Stanoveno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR, indikované pyraninem.

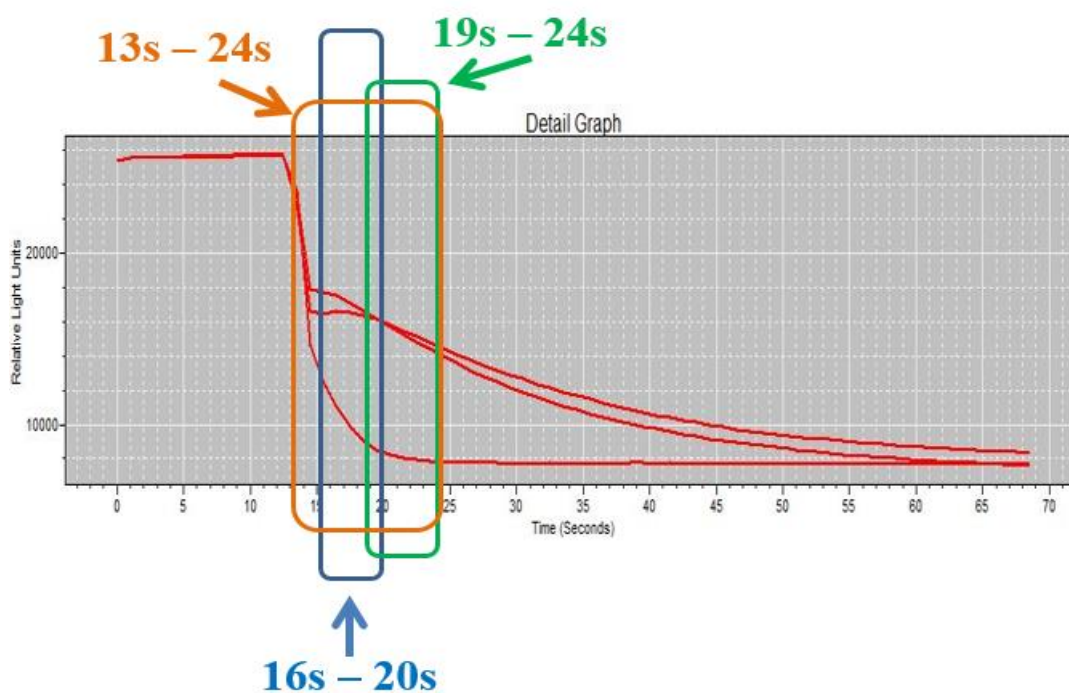
Tab. 6 - Průměry ploch pod křivkou a jejich směrodatné odchylky pro interval reakce mezi 13. a 24. sekundou, kde byl přítomen CA II 1nmol/l, CA II 1nmol/l a inhibitor 100 nmol/l a pouze pufr bez CA II.

	Průměr ploch pod křivkou	Směrodatná odchylka
Pufr	180 539,2	7 939,5
CA II + pufr	143 458,5	10 205,7
CA II + inhibitor + pufr	200 516,0	7 568,7

Podle obrázku 11 je vidět, že rozdíl mezi inhibovanou a neinhibovanou reakcí je v časovém intervalu mezi 15. a 30. sekundou. Byly tedy vypočítány plochy pod křivkou a Z – faktory pro různé časové intervaly reakce. Z hodnot v tabulce 7 vyplývá, že nejvýraznější rozdíl mezi pozitivní a negativní kontrolou je mezi 16. a 20 sekundou reakce. Čím byl interval reakce delší, tím se snižuje rozdíl mezi pozitivními a negativními kontrolami destičky a tím pádem se snižuje i Z – faktor. Na obrázku 12 jsou pro ilustraci ukázány různé intervaly reakce.

Tab. 7 - Z – faktory pro různé časové intervaly reakce CO₂ a H₂O katalyzované CAII.

Časový interval [s]	Z - faktor
13 - 24	0,15 – 0,58
16 – 20	0,50 – 0,65
19 - 24	0,51 – 0,59



Obr. 12 - Znázornění 3 vybraných časových intervalů reakce CO₂ a H₂O.

5.2.4. Validace fluorescenční metody na komerční knihovně LOPAC 1280

Pro validaci metody byla otestována komerční knihovna LOPAC 1280. Látky byly testovány ve dvou koncentracích – 10 a 0,1 μM . Bylo sledováno, jestli známé inhibitory CA budou pozitivní i za použití této metody. Pro otestování 1280 látek byly použity 4 destičky pro obě koncentrace. Z – faktory pro všech 8 destiček v časovém intervalu mezi 16. – 20. sekundou reakce jsou zaznamenány v tabulce 8.

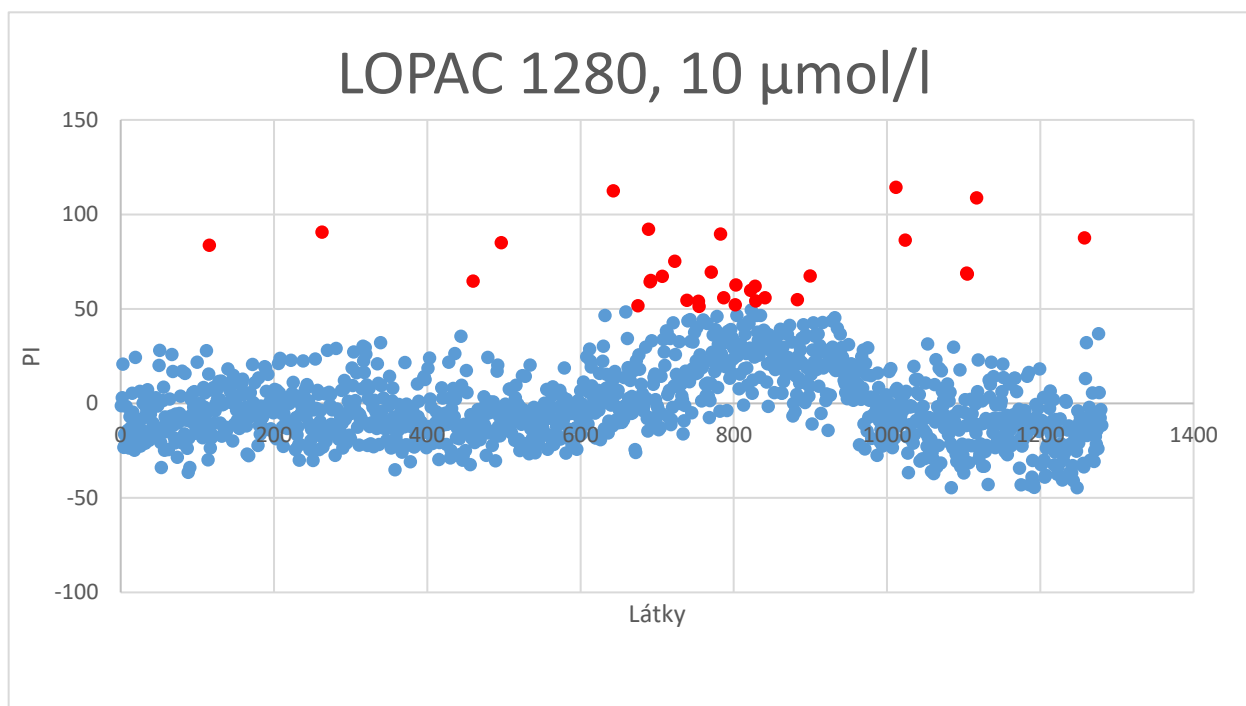
Tab. 8 - Z – faktory intervalu reakce mezi 16 – 20 sekundou 8 destiček při testování komerční knihovny LOPAC fluorescenční metodou.

Koncentrace látky	Z - faktory	
	10 $\mu\text{mol/l}$	0,1 $\mu\text{mol/l}$
Destička 1	0,52	0,51
Destička 2	0,57	0,50
Destička 3	0,53	0,65
Destička 4	0,56	0,57

Pro každou látku bylo vypočítáno PI, které vyjadřuje, jak testovaná látka mění rychlost reakce katalyzované enzymem CA II. Příklad vypočítaných hodnot PI programem dotmatics je vyobrazen na obrázku 13. Jako aktivní byla látka vyhodnocená, když způsobila aspoň 50% zpomalení reakce. Při testování koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ bylo nalezeno 31 aktivních látek (obrázek 14). Z těchto látek se potvrdilo 5 známých inhibitorů CA. V tabulce 9 jsou jejich názvy a procenta inhibice.

plate	well	sample id	PlenzymeCA	pass	conc	inc	
1 (Plate 1)	A3	LEM00006001	-1.1929	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	B3	LEM00006161	3.0009	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	C3	LEM00006011	20.758	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	D3	LEM00006171	-23.128	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	E3	LEM00006021	-16.335	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	F3	LEM00006181	-21.941	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	G3	LEM00006031	-1.5606	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	H3	LEM00006191	-22.236	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	I3	LEM00006041	-14.159	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	J3	LEM00006201	-18.385	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	K3	LEM00006051	-23.474	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	L3	LEM00006211	-6.9545	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	M3	LEM00006061	-12.946	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	N3	LEM00006221	-21.403	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	O3	LEM00006071	5.464	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	P3	LEM00006231	-4.5337	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	A4	LEM00006081	-17.155	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	B4	LEM00006241	-24.65	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	C4	LEM00006091	24.37	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	D4	LEM00006251	-17.722	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	E4	LEM00006101	-17.048	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	F4	LEM00006261	-10.061	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	G4	LEM00006111	-17.519	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	H4	LEM00006271	-16.343	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	I4	LEM00006121	6.4633	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
1 (Plate 1)	J4	LEM00006281	-22.478	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	P5	LEM00006872	-14.555	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	A6	LEM00006722	92.112	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	B6	LEM00006882	-7.5202	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	C6	LEM00006732	64.334	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	D6	LEM00006892	64.872	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	E6	LEM00006742	33.255	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	F6	LEM00006902	-10.796	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	G6	LEM00006752	10.086	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	H6	LEM00006912	13.886	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	I6	LEM00006762	15.631	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	J6	LEM00006922	2.1028	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	K6	LEM00006772	-7.2065	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	L6	LEM00006932	-1.1225	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	M6	LEM00006782	-2.4153	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	N6	LEM00006942	-13.829	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	O6	LEM00006792	14.738	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	P6	LEM00006952	-12.726	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	A7	LEM00006643	14.362	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	B7	LEM00006803	-5.3387	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	C7	LEM00006653	67.214	●	10.0uM	+ ✓ ✗	
3 (Plate 3)	D7	LEM00006813	33.862	●	10.0uM	+ ✓ ✗	

Obr. 13 - Hodnota procenta inhibice vypočítaná pro jednotlivé látky, příklad zobrazení výsledků v programu Dotmatics.

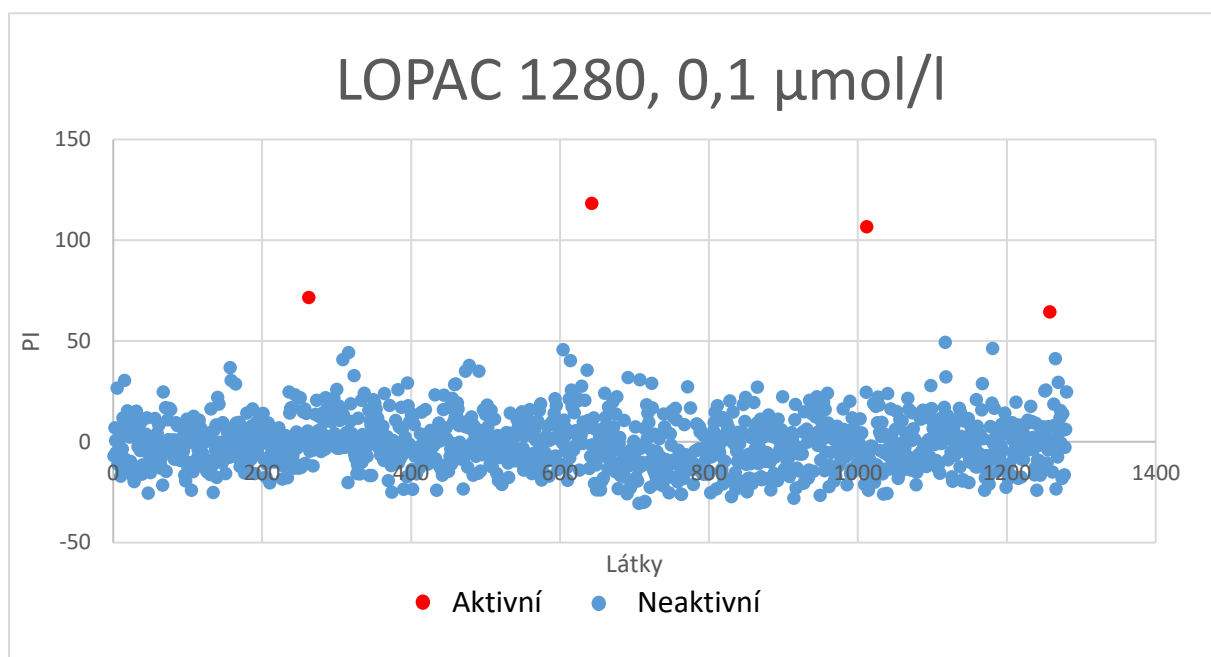


Obr. 14 - Distribuce látek (10 μmol/l) komerční knihovny LOPAC 1280 podle inhibiční aktivity vůči CAII testováno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Tab. 9 - Potvrzené inhibitory CA a jejich procenta inhibice z komerční knihovny LOPAC 1280 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ testované fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Látka	PI [%]
Chlorothiazid	89
Acetazolamid	110
Hydrochlorothiazid	69
Brinzolamid	116
Methazolamid	98

Při testování koncentrace 0,1 $\mu\text{mol/l}$ byly nalezeny jen 4 aktivní látky (obrázek 15). Z těchto 4 látek se potvrdili jen 2 známé inhibitory CA. V tabulce 10 jsou jejich názvy a procenta inhibice.



Obr. 15 - Distribuce látek (0,1 $\mu\text{mol/l}$) komerční knihovny LOPAC 1280 podle inhibiční aktivity vůči CAII testováno fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Tab. 10 - Potvrzené inhibitory CA a jejich procenta inhibice z komerční knihovny LOPAC 1280 o koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ testované fluorescenční metodou přístrojem FLIPR.

Látka	PI [%]
Acetazolamid	67
Brinzolamid	96

5.2.5. Hledání inhibitorů CA II v chemické knihovně pomocí fluorescenční metody

Po validaci metody pomocí komerční knihovny LOPAC 1280 bylo otestováno 5120 látek o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ z unikátní chemické knihovny ÚMTM ve dvou opakováních. Z 5120 otestovaných látek bylo 63 látek vyhodnocených jako aktivní. Z toho skupina 19 látek je známá svými inhibičními účinky vůči CA II (tabulka 11). Kontrolováním jednotlivých křivek pro vybrané látky bylo zjištěné, že až v 26 případech šlo o falešnou pozitivitu (tabulka 12). Šlo o látky s fluorescenčními vlastnostmi, čemu odpovídají i jejich křivky zobrazující průběh reakce (obrázek 16). U zbylých 18 látek ještě nikdy nebyly pozorované inhibiční vlastnosti vůči CA II (tabulka 13).

Tab. 11 - Aktivní látky chemické knihovny ÚMTM se známou inhibiční aktivitou vůči CA II, testované fluorescenční metodou.

LEM kód látky	Název látky	PI [%]
LEM 649		70
LEM 653		63
LEM 660		63
LEM 662		55
LEM 666		90
LEM 826		91
LEM 948		53
LEM 949		67
LEM 971		73
LEM 1290		75
LEM 1981		50
LEM 1985		73
LEM 1986		60
LEM 10271		62
LEM 2072	Acetazolamid	98
LEM 2679	Acetazolamidum	97
LEM 11220	Benzensulfonamid	89
LEM 12828	Ponceau S	50

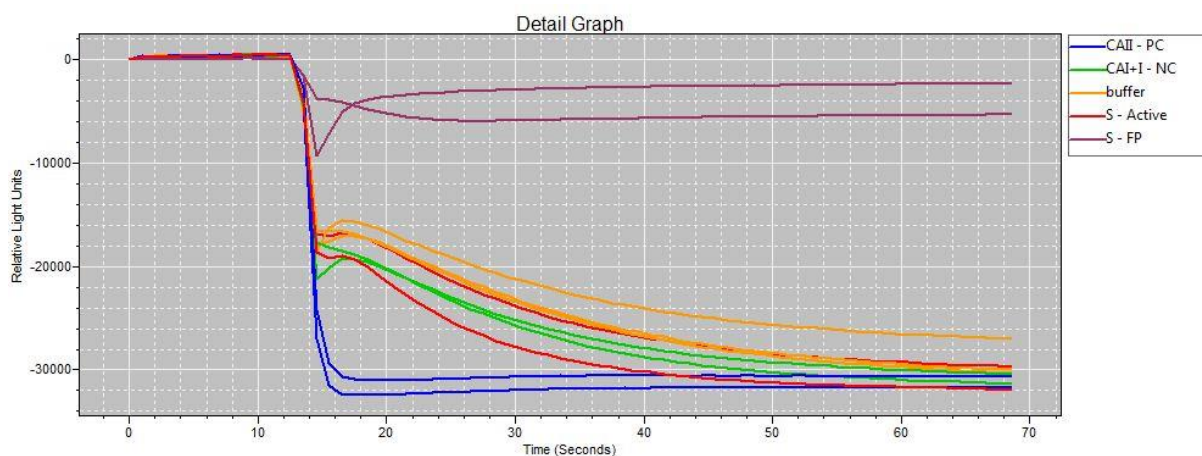
Tab. 12 - Aktivní látky chemické knihovny ÚMTM s fluorescenčními vlastnostmi, vykazující falešnou pozitivitu vůči CA II, testované fluorescenční metodou.

LEM kód látky	Název látky	PI [%]
LEM 2481		206
LEM 2485		194
LEM 2486		202
LEM 2487		120
LEM 2489		79
LEM 2896		90
LEM 10440		80,7
LEM 11184		74
LEM 11185		159
LEM 11186		192
LEM 11187		50
LEM 11522		64,3
LEM 11821		64,4
LEM 11823		74
LEM 11824		61
LEM 11827		57
LEM 13000		63
LEM 13106		67
LEM 13165		84
LEM 13169		64
LEM 13205		56
LEM 13443		56
LEM 10680	bodipy-FL	207
LEM 11198	BODIPY	210
LEM 11211	fluorescein	210

Tab. 13 - Aktivní látky chemické knihovny ÚMTM s inhibičními účinky vůči CA II, které je třeba dále validovat, testované fluorescenční metodou.

LEM kód látky	PI [%]
LEM 199	61
LEM 1040	52,9
LEM 1102	84,8
LEM 1167	53
LEM 1690	87
LEM 2771	87,8
LEM 10124D	92,8
LEM 12209	72
LEM 12213	50
LEM 12216	53
LEM 12224	53
LEM 12226	68
LEM 12230	59
LEM 12231	53
LEM 12266	77
LEM 12269	78
LEM 13125	66

Na obrázku 16 jsou pro ilustraci vyobrazeny vybrané křivky, které znázorňují průběh reakce v různých jamkách. Obrázek 16 obsahuje křivky reakce pozitivní a negativní kontroly, pufru, aktivní látky a látky s falešnou pozitivitou.



Obr. 16 - Vybrané křivky průběhu reakce CO_2 a H_2O katalyzované CAII (25 nmol/l). Žlutá = pouze pufr, modrá = negativní kontrola, zelená = pozitivní kontrola, červená = aktivní látka, fialová = falešně pozitivní látka.

6. Diskuze

Cílem práce byl vývoj vhodné metody pro měření aktivity enzymu CA, zavedení a validace metody do HTS podmínek a její využití pro identifikaci nových inhibitorů CA. CA katalyzuje reakci CO_2 a H_2O na hydrogenuhličitanový iont. Tvorbou hydrogenuhličitanového iontu klesá pH v reakci. Rychlost změny pH, a tím pádem aktivita enzymu, se dá sledovat pomocí různých acidobazických indikátorů.

Prvním způsobem indikace změny pH byla použita kolorimetrická metoda, která se objevila ve studii Buemi et al., 2015. Jako indikátor sloužila FR (0,2 mmol/l). S poklesem pH se měnila i absorbance FR. K měření aktivity byla použita průhledná 384- jamková destička a spektrofotometr EnVision. Aktivita enzymu byla měřena v koncentracích 30 nmol/l, 3 nmol/l a 0,3 nmol/l při 557 nm. Z obrázku 8 vyplývá, že pomocí FR jako indikátoru dokážeme sledovat aktivitu CA. Celá metoda se ovšem nehodí pro podmínky HTS z jednoho důvodu. Pipetovací systém spektrofotometru EnVision nedokáže pipetovat vodu syčenou CO_2 , která startuje celou reakci, a měřit absorbanci ve všech jamkách současně. Místo toho pipetuje vodu jen do jedné jamky a pak měří její absorbanci. Pokud byla jamka měřena 38 sekund, celá 384- jamková destička by byla měřena více než 4 hodiny, což je pro HTS podmínky nevhodné.

Problém s časem měření vyřešil fluorimetr FLIPR. Pipetovací systém FLIPRu dokáže pipetovat vodu do všech jamek destičky najednou a také měří fluorescenci všech jamek současně. Jako pH indikátor byla zvolena fluorescenční barva pyranin. Jde o fluorofor velmi citlivý na malé změny pH v rozmezí 6,5 – 8 a jeho vhodnost na stanovení aktivity CA ověřil Shingles a Moroney (1997).

V prvním kroku bylo testováno, jestli pomocí pyraninu dokážeme pozorovat změnu pH způsobenou aktivitou enzymu CA v našich podmínkách. Byla pozorována aktivita enzymu o koncentracích 30 nmol/l, 3 nmol/l a 0,3 nmol/l. Křivky reakcí a plochy pod křivkami podle očekávání ukazují, že enzym o koncentraci 30 nmol/l má nejvyšší aktivitu. Reakce s enzymem ředěným 1:10 a 1:100 mají srovnatelné plochy pod křivkou jako nekatalyzovaná reakce. Ovšem při zaměření se na průběh reakce mezi 14. a 20. sekundou je zřejmé, že i ředěné enzymy mají viditelnou aktivitu. Po 30. sekundě měření se v některých reakcích zvyšovala fluorescence pyraninu, což zvedalo plochy pod křivkou a zkreslovalo výsledky. Tento trend byl pozorován i v dalších experimentech.

Ve druhém kroku bylo stanoveno vhodné množství inhibitoru jako pozitivní kontroly. Pro tento účel byl vybrán acetazolamid. Acetazolamid byl testován v 5 koncentracích s CA II o koncentraci 3 nmol/l. Největší inhibice reakce byla zaznamenána pro acetazolamid o koncentraci 100 nmol/l. Koncentrace 62,5 nmol/l, 15,63 nmol/l a 3,91 nmol/l vykazovaly sníženou inhibici a křivka s koncentrací 0,98 nmol/l spíše připomínala neinhibovanou reakci. Proto pro pozitivní kontrolu byla zvolena koncentrace 100 nmol/l.

Po vybrání vhodné koncentrace pozitivní kontroly byla metoda zaváděna do HTS podmínek. Byla použita celá 384-jamková destička. Třetina jamek obsahovala CA II 1 nmol/l, třetina CA II 1 nmol/l a acetazolamid 100 nmol/l a ve třetině probíhala nekatalyzovaná reakce. Pro zjištění kvality testu byl vypočítán Z – faktor destičky. V některých případech se znovu objevoval trend, že po 30. sekundě reakce byla zaznamenávána zvýšená fluorescence pyraninu, což zkreslovalo výsledky. Proto byly vypočítány Z – faktory pouze pro intervaly mezi 13. – 24. sekundou měření, kde reakce probíhala nejkonzistentněji. Nejvyšší Z – faktor byl vypočítán pro interval mezi 16. a 20. sekundou měření. Plochy pod křivkou všech dalších testů byly vypočítány pro tento interval.

Pro validaci fluorescenční metody byla otestována komerční knihovna LOPAC 1280 v koncentracích 10 μ mol/l a 0,1 μ mol/l. Pro každou látku bylo vypočítáno PI podle plochy pod křivkou mezi 16. a 20. sekundou měření. Z látek o koncentraci 10 μ mol/l bylo 31 aktivních, z toho se potvrdilo 5 známých inhibitorů CA II – chlorothiazid (Pitts et al., 1958), acetazolamid (Friedberg et al., 1953), hydrochlorothiazid (Moyer et al., 1959), brinzolamid (Silver et Group, 1998) a methazolamid (Gray et al., 1958). Z látek o koncentraci 0,1 μ mol/l byly 4 aktivní látky, z toho 2 známé inhibitory CA II – acetazolamid a brinzolamid. Po těchto testech se ukázalo, že je metoda vhodná pro HTS podmínky. Byly správně určeny známé inhibitory CA II a Z – faktor všech destiček pro 16. – 20. sekundu reakce byla vždy vyšší než 0,5.

Pomocí validované fluorescenční metody bylo otestováno 5120 látek o koncentraci 10 μ mol/l unikátní chemické knihovny ÚMTM. Z 5120 testovaných látek bylo 63 identifikovaných jako „hity“, tzn. látky s inhibiční aktivitou vůči CA II. Bylo zjištěno, že z nich až 26 látek má fluorescenční vlastnosti. Jejich vypočítaná PI hodnota často převyšovala 200 % a po analýze naměřených křivek (obrázek 16) jsme je označili jako falešně pozitivní hity. Hodnota PI ostatních identifikovaných aktivních látek se pohybovala v intervalu 50 – 90 %, tj. 10 μ M aktivní látky způsobuje 50 – 98% inhibici reakce katalyzované CA II. Mezi identifikovanými aktivními látkami se potvrdilo 19 již známých inhibitorů CA II. Jde o skupinu látek s karboránovým jádrem, jejichž inhibiční aktivita již byla prokázána (Brynda et

al., 2013; Mader et al., 2014). Tyto látky jsou jako inhibitory velmi zajímavé, jelikož jsou tepelně a chemicky stabilní a ve většině případů nemají cytotoxickou aktivitu (Villiant et al., 2002). U zbylých 18 aktivních látek nebyl doposud analyzovaný jejich vliv na aktivitu CA II. Jde o látky s různou chemickou strukturou a bude potřebné jejich schopnost inhibovat CA II dále validovat. Po potvrzení jejich inhibiční aktivity by se látky mohly stát potenciálními léčivy, jakožto inhibitory CA.

7. Závěr

Cílem experimentální části diplomové práce bylo vyvinout metodu pro testování aktivity CA, její validace a zavedení do HTS podmínek a otestování unikátní chemické knihovny ÚMTM na inhibitory CA.

Napřed byla k měření aktivity použita kolorimetrická metoda s indikátorem pH FR, měřeno na EnVison. Tato metoda se ukázala nevhodná pro podmínky HTS, protože délka měření jedné 384- jamkové destičky byla příliš dlouhá.

Pro podmínky HTS byla tedy použita fluorescenční metoda s pH indikátorem pyraninem. Fluorescenční metoda byla validována pomocí komerční knihovny LOPAC 1280 a potvrdila se její vhodnost pro podmínky HTS. Z komerční knihovny látek o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ bylo určeno 31 aktivních látek, z toho 5 správně potvrzených inhibitorů CA. Testováním látek komerční knihovny o koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ byly nalezeny 4 aktivní látky, z toho 2 známé inhibitory CA.

Po validaci byla metoda použita na identifikaci nových inhibitorů CA II. Bylo otestováno 5120 látek z unikátní chemické knihovny ÚMTM. Z 5120 látek o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ bylo 63 aktivních. Z 63 aktivních látek se potvrdilo 19 již známých inhibitorů. Falešná pozitivita byla odhalena u 26 látek, protože se jednalo o fluorescenční látky. Zbylých 18 aktivních látek je potřeba dále validovat. Tyto látky se mohou stát potenciálními léčivy, jako inhibitory CA.

8. Literatura

Citace článků v časopise

Abbate, F., Winum, J. Y., Potter, B. V., Casini, A., Montero, J. L., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with EMATE, a dual inhibitor of carbonic anhydrases and steroid sulfatase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(1), 231-234.

Angeles, D. K. (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22(4), 489-501.

Aribi, A. M., & Stringer, J. L. (2002). Effects of antiepileptic drugs on extracellular pH regulation in the hippocampal CA1 region in vivo. *Epilepsy research*, 49(2), 143-151.

Assi, R., Kantarjian, H. M., Kadia, T. M., Pemmaraju, N., Jabbour, E., Jain, N. & Cortes, J. E. (2018). Final results of a phase 2, open-label study of indisulam, idarubicin, and cytarabine in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*, 124(13), 2758-2765. Cairns, R., Papandreou, I., & Denko, N. (2006). Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Molecular Cancer Research*, 4(2), 61-70.

Bartlett, J. D., & Jaanus, S. D. (2007). *Clinical ocular pharmacology*. Elsevier Health Sciences.

Bertini, I., Luchinat, C., & Scozzafava, A. (1978). Binding affinity of bicarboxylate ions for cobalt (II) bovine carbonic anhydrase. *Bioinorganic chemistry*, 9(2), 93-100.

Bonnet, U., Wiemann, M., & Bingmann, D. (1998). CO₂/HCO₃⁻-withdrawal from the bath medium of hippocampal slices: biphasic effect on intracellular pH and bioelectric activity of CA3-neurons. *Brain research*, 796(1-2), 161-170.

Brandish, P. E., Chiu, C. S., Schneeweis, J., Brandon, N. J., Leech, C. L., Kornienko, O. & Zheng, W. (2006). A cell-based ultra-high-throughput screening assay for identifying inhibitors of D-amino acid oxidase. *Journal of biomolecular screening*, 11(5), 481-487.

Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglione, G., & Supuran, C. T. (1997). Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry*, 36(34), 10384-10392.

Brynda, J., Mader, P., Šícha, V., Fábry, M., Poncová, K., Bakardiev, M. & Řezáčová, P. (2013). Carborane-Based Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(51), 13760-13763.

Buemi, M. R., De Luca, L., Ferro, S., Bruno, E., Ceruso, M., Supuran, C. T. & Gitto, R. (2015). Carbonic anhydrase inhibitors: design, synthesis and structural characterization of new heteroaryl-N-carbonylbenzenesulfonamides targeting druggable human carbonic anhydrase isoforms. *European journal of medicinal chemistry*, 102, 223-232.

Cammer, W. B., & Brion, L. P. (2000). Carbonic anhydrase in the nervous system. In *The Carbonic Anhydrases* (pp. 475-489). Birkhäuser, Basel.

- Carnero, A. (2006). High throughput screening in drug discovery. *Clinical and Translational Oncology*, 8(7), 482-490.
- Carter, N. D., Chegwidan, W. R., & Edwards, Y. H. (Eds.). (2000). *The carbonic anhydrases: new horizons*. Birkhauser Verlag.
- Cecchi, A., Hulikova, A., Pastorek, J., Pastoreková, S., Scozzafava, A., Winum, J. Y. & Supuran, C. T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors. *Journal of medicinal chemistry*, 48(15), 4834-4841.
- Clapp, J. W., & Roblin, J. R. O. (1951). U.S. Patent No. 2,554,816. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Covarrubias, A. S., Larsson, A. M., Högbom, M., Lindberg, J., Bergfors, T., Björkelid, C. & Jones, T. A. (2005). Structure and function of carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18782-18789.
- De Simone, G., & Supuran, C. T. (2012). (In) organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of inorganic biochemistry*, 111, 117-129.
- Dodgson, S. J. (1991). *The carbonic anhydrases: Overview of their importance. The carbonic anhydrases: Cellular and molecular genetics*.
- Filippi, D., Sciaky, M., Limozin, N., & Laurent, G. (1978). Anhydrase carbonique du système nerveux central du rat. Isolement et propriétés. *Biochimie*, 60(1), 99-102.
- Fox, S. J. (2006). *A History of High-Throughput Screening for Drug Discovery: A Special Report Summarizing Six Comprehensive Industry Studies in the Years 1998–2005*.
- Freed, S. Z. (1975). The alternating use of an alkalizing salt and acetazolamide in the management of cystine and uric acid stones. *The Journal of urology*, 113(1), 96-99.
- Friedberg, C. K., Taymor, R., Minor, J. B., & Halpern, M. (1953). The use of diamox, a carbonic anhydrase inhibitor, as an oral diuretic in patients with congestive heart failure. *New England Journal of Medicine*, 248(21), 883-889.
- Gerweck, L. E., & Seetharaman, K. (1996). Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer research*, 56(6), 1194-1198.
- Gray, W. D., Rauh, C. E., Osterbero, A. C., & Lipchuck, L. M. (1958). The anticonvulsant actions of methazolamide (a carbonic anhydrase inhibitor) and diphenylhydantoin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 124(2), 149-160.
- Greene, M. K., Kerr, A. M., McIntosh, I. B., & Prescott, R. J. (1981). Acetazolamide in prevention of acute mountain sickness: a double-blind controlled cross-over study. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 283(6295), 811-813.
- Gubler H: *Methods for statistical analysis, quality assurance and management of primary HTS data*. In Hüser J (ed): *High-Throughput Screening in Drug Discovery*. Weinheim, Germany: Wiley-VCh, 2006:151-207.

- Halpin, D. R., & Harbury, P. B. (2004). DNA display I. Sequence-encoded routing of DNA populations. *PLoS biology*, 2(7).
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 38.
- Henkin, R. I. (1999). Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *The American journal of the medical sciences*, 318(6), 380-391.
- Hertzberg, R. P., & Pope, A. J. (2000): High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current opinion in chemical biology*, 4(4), 445-451.
- Hewett-Emmett, D. (2000). Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In *The Carbonic Anhydrases* (pp. 29-76). Birkhäuser, Basel.
- Hopkins, G. A. (1985). Drug Treatment of Glaucoma. *Optometry and Vision Science*, 62(2), 132-141.
- Houston, J. G., Banks, M. N., Binnie, A., Brenner, S., O'Connell, J., & Petrillo, E. W. (2008). Case study: impact of technology investment on lead discovery at Bristol–Myers Squibb, 1998–2006. *Drug discovery today*, 13(1-2), 44-51.
- Huttenlocher, P. R. (1965). Treatment of hydrocephalus with acetazolamide: results in 15 cases. *The Journal of pediatrics*, 66(6), 1023-1030.
- Ilies, M. A., Vullo, D., Pastorek, J., Scozzafava, A., Ilies, M., Caproiu, M. T. & Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfanilamide and halogenophenylaminobenzamide derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 46(11), 2187-2196.
- Iversen PW, Eastwood BJ, Sittampalam GS, Cox KL: A comparison of assay performance measures in screening assays: signal window, Z' factor, and assay variability ratio. *J Biomol Screen* 2006;11:247-252.
- Jung, G., & Beck-Sickinger, A. G. (1992). Multiple peptide synthesis methods and their applications. *New synthetic methods* (87). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 31(4), 367-383.
- Klumpp, M., Boettcher, A., Becker, D., Meder, G., Blank, J., Leder, L. & Mayr, L. M. (2006). Readout technologies for highly miniaturized kinase assays applicable to high-throughput screening in a 1536-well format. *Journal of biomolecular screening*, 11(6), 617-633.
- Krishnamurthy, V. M., Kaufman, G. K., Urbach, A. R., Gitlin, I., Gudiksen, K. L., Weibel, D. B., & Whitesides, G. M. (2008). Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein– ligand binding. *Chemical reviews*, 108(3), 946-1051.
- Krungkrai, J., Scozzafava, A., Reungprapavut, S., Krungkrai, S. R., Rattanajak, R., Kamchonwongpaisan, S., & Supuran, C. T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides: towards antimalarials with a novel mechanism of action?. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(2), 483-489.

- Lindskog, S., & Silverman, D. N. (2000). The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases* (pp. 175-195). Birkhäuser, Basel.
- Lothman, E. W., & Collins, R. C. (1984). Seizures. *Neurological pathophysiology*.
- Macarron, R. (2006). Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug discovery today*, 7(11), 277-279.
- Mader, P., Pecina, A., Cígler, P., Lepšík, M., Šícha, V., Hobza, P. & Řezáčová, P. (2014). Carborane-based carbonic anhydrase inhibitors: insight into CAII/CAIX specificity from a high-resolution crystal structure, modeling, and quantum chemical calculations. *BioMed research international*, 2014.
- Maren, T. H. (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiological Reviews*, 47(4), 595-781.
- Maren, T. H. (1984). The General Physiology of Reactions Catalyzed by Carbonic Anhydrase and Their Inhibition by Sulfonamides a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 429(1), 568-579.
- Masereel, B., Rolin, S., Abbate, F., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2002). Carbonic anhydrase inhibitors: anticonvulsant sulfonamides incorporating valproyl and other lipophilic moieties. *Journal of medicinal chemistry*, 45(2), 312-320.
- Millichap, J. G. (1987). Acetazolamide in treatment of epilepsy. *Lancet (London, England)*, 2(8551), 163-163.
- Morgensen, E. G., Janbon, G., Chaloupka, J., Steegborn, C., Fu, M. S., Moyrand, F., ... & Levin, L. R. (2006). *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryotic cell*, 5(1), 103-111.
- Moyer, J. H., Fuchs, M., Irie, S., & Bodi, T. (1959). Some observations on the pharmacology of hydrochlorothiazide. *American Journal of Cardiology*, 3(1), 113-117.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with anions. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24(1), 70-76.
- Parker, G. J., Law, T. L., Lench, F. J., & Bolger, R. E. (2000). Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 5(2), 77-88.
- Parks, S. K., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2011). pH control mechanisms of tumor survival and growth. *Journal of cellular physiology*, 226(2), 299-308.
- Pastorekova, S., Ratcliffe, P. J., & Pastorek, J. (2008). Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU international*, 101, 8-15.
- Pavia, M. R., Sawyer, T. K., & Moos, W. H. (1993). The generation of molecular diversity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(3), 387-396.

- Pitts, R. F., Krück, F., Lozano, R., Taylor, D. W., Heidenreich, O. P. A., & Kessler, R. H. (1958). Studies on the mechanism of diuretic action of chlorothiazide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 123(2), 89-97.
- Potter, C. P. S., & Harris, A. L. (2003). Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *British journal of cancer*, 89(1), 2.
- Raftery, T. D., Isales, G. M., Yozzo, K. L., & Volz, D. C. (2014). High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. *Environmental science & technology*, 48(1), 804-810.
- Reiss, W. G., & Oles, K. S. (1996). Acetazolamide in the treatment of seizures. *Annals of Pharmacotherapy*, 30(5), 514-519.
- Robertson, N., Potter, C., & Harris, A. L. (2004). Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Research*, 64(17), 6160-6165.
- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., & Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(12), 1627-1664.
- Sedlakova, O., Svastova, E., Takacova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., & Pastorekova, S. (2014). Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Frontiers in physiology*, 4, 400.
- Shingles, R., & Moroney, J. V. (1997). Measurement of carbonic anhydrase activity using a sensitive fluorometric assay. *Analytical biochemistry*, 252(1), 190-197.
- Silver, L. H., & Group, T. B. P. T. S. (1998). Clinical efficacy and safety of brinzolamide (Azopt™), a new topical carbonic anhydrase inhibitor for primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *American journal of ophthalmology*, 126(3), 400-408.
- Silverman, D. N., & Lindskog, S. (1988). The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implications of a rate-limiting protolysis of water. *Accounts of Chemical Research*, 21(1), 30-36.
- Sittampalam, G. S., Kahl, S. D., & Janzen, W. P. (1997). High-throughput screening: advances in assay technologies. *Current opinion in chemical biology*, 1(3), 384-391.
- Sly, W. S. (1991). Carbonic anhydrase II deficiency syndrome. In *The Carbonic Anhydrases* (pp. 183-193). Springer, Boston, MA.
- Smith, K. S., & Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 335-366.
- Stams, T., & Christianson, D. W. (2000). X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. In *The Carbonic Anhydrases* (pp. 159-174). Birkhäuser, Basel.
- Stevens, M. E., Bouchard, P. J., Kariv, I., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1998). Comparison of automation equipment in high throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening*, 3(4), 305-311.

- Sugrue, M. F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in retinal and eye research*, 19(1), 87-112.
- Supuran, C. T. (2003). Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert opinion on investigational drugs*, 12(2), 283-287.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews Drug discovery*, 7(2), 168.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases-an overview. *Current pharmaceutical design*, 14(7), 603-614.
- Supuran, C. T. (2011). Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics?. *Frontiers in pharmacology*, 2, 34.
- Supuran, C. T. (2011). Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future medicinal chemistry*, 3(9), 1165-1180.
- Supuran, C. T., & Scozzafava, A. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 10(5), 575-600.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal research reviews*, 23(2), 146-189.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Conway, J. (Eds.). (2004). *Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators* (Vol. 1). CRC press.
- Tashian, R. E., Douglas, D. P., & Yu, Y. S. L. (1964). Esterase and hydase activity of carbonic anhydrase-I from primate erythrocytes.
- Terrett, N. K. (1998). *Combinatorial chemistry* (Vol. 2). Oxford University Press on Demand.
- Terstappen, G. C., & Reggiani, A. (2001). In silico research in drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 22(1), 23-26.
- Valler, M. J., & Green, D. (2000). Diversity screening versus focussed screening in drug discovery. *Drug discovery today*, 5(7), 286-293.
- Valliant, J. F., Guenther, K. J., King, A. S., Morel, P., Schaffer, P., Sogbein, O. O., & Stephenson, K. A. (2002). The medicinal chemistry of carboranes. *Coordination Chemistry Reviews*, 232(1-2), 173-230.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033.
- Virshup, A. M., Contreras-García, J., Wipf, P., Yang, W., & Beratan, D. N. (2013). Stochastic voyages into uncharted chemical space produce a representative library of all possible drug-like compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 135(19), 7296-7303.
- Vullo, D., Franchi, M., Gallori, E., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., & Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with

aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(6), 1005-1009.

Weiner, I. M., & Mudge, G. H. (1985). Pp. 887-907 in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*.

Wilson, D. S., & Szostak, J. W. (1999). In vitro selection of functional nucleic acids. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 611-647.

Winum, J. Y., Scozzafava, A., Montero, J. L., & Supuran, C. T. (2005). Sulfamates and their therapeutic potential. *Medicinal research reviews*, 25(2), 186-228.

Winum, J. Y., Scozzafava, A., Montero, J. L., & Supuran, C. T. (2006). Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. *Medicinal research reviews*, 26(6), 767-792.

Wu, G., & Doberstein, S. K. (2006). HTS technologies in biopharmaceutical discovery. *Drug discovery today*, 11(15-16), 718-724.

Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., Shi, Y., & Morel, F. M. (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452(7183), 56.

Xiong, Z. Q., & Stringer, J. L. (2000). Regulation of extracellular pH in the developing hippocampus. *Developmental Brain Research*, 122(2), 113-117.

Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999;4:67-73.

Internetové zdroje

LOPAC®1280 – The Library of Pharmacologically Active Compounds. Sigma - Aldrich [online]. Germany: Sigma - Aldrich, 2020 [cit. 2020-05-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/bioactive-small-molecules/lopac1280-navigator.html>