

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tat'ána Baudišová

Molekulární metody ve výzkumu léčiv proti *Trypanosoma brucei*

Molecular methods in drug discovery against *Trypanosoma brucei*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Jan Mach, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Tímto vřele děkuji vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Janu Machovi, PhD. za jeho vstřícnost, trpělivost, odborné rady i cenné připomínky. Také děkuji rodině a nejbližším za neutuchající podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25.4.2025

Taťána Baudišová

Abstrakt

Parazitický prvek *Trypanosoma brucei* způsobuje spavou nemoc, což je smrtelné onemocnění známé též jako africká trypanozomiáza. V endemických regiorech došlo ke konci 20. století k alarmujícímu nárůstu případů. Mezi příčiny patří komplikovaný politický stav v rozvojových zemích, ale také nedostatky dostupných léků. Léčiva se vyznačovala toxickými vedlejšími účinky a omezenou účinností proti oběma fázím a variantám nemoci. Tato situace podnítila vývoj nových léčiv, která by dosahovala vyšší účinnosti, minimalizovala vedlejší účinky, zjednodušila podávání a mohla být použita univerzálně u všech pacientů.

Vývoj léčiv je velmi dlouhý, drahý a komplikovaný proces s nejistými výsledky. Existují různé přístupy, kterými se lze za novými léčivými látkami ubírat. Výzkum často začíná hledáním molekulárních cílů v buňce parazita, na něž se mohou vědci zaměřit při navrhování nových terapeutických sloučenin. Běžnou strategií je také rozsáhlé testování tisíců látek, jejichž mechanismus účinku není předem znám. Na základě pozorovaného účinku jsou vybrány slibné sloučeniny, které jsou dále podrobeny bližšímu zkoumání a optimalizaci. Další přístup využívá léčiva původně vyvinutá pro jiná onemocnění.

Tato bakalářská práce popisuje postupy a metody nejčastěji užívané v raných fázích výzkumu nových léčiv proti spavé nemoci a zároveň se snaží nastínit jejich budoucí vývoj.

Klíčová slova: molekulární biologie, metody, léčiva, *Trypanosoma brucei*

Abstract

Trypanosoma brucei is a parasitic protozoan that causes sleeping sickness, a fatal disease also known as human African trypanosomiasis. Complicated political conditions in endemic countries contributed to a resurgence of cases at the end of the 20th century, but the ensuing health crisis was also caused by inadequate treatment options. Available drugs have long been associated with toxic adverse effects and limited efficacy against both stages and variants of the disease. These problems have spurred research efforts to discover new drugs that would improve efficacy, minimize adverse effects, simplify administration and could be used to treat all patients. However, drug discovery is a long and arduous process with uncertain results. Various approaches may be used to identify candidates for new drugs. Research may involve identifying novel molecular targets within the parasite's cells that scientists can exploit when designing new therapeutic agents. It is also common to test large sets of molecules against living pathogens. Most promising compounds are then further examined and optimized. Alternative approaches turn to other drugs, previously developed against different diseases, and attempt to repurpose them in a new way. In this bachelor thesis, I characterize the methods and procedures most

commonly used in the early phases of drug discovery for sleeping sickness and discuss future prospects of these approaches.

Key words: molecular biology, methods, drugs, *Trypanosoma brucei*

Obsah

1 Úvod.....	1
2 <i>Trypanosoma brucei</i>	2
3 Molekulární metody využívané v hledání a výzkumu léčiv proti <i>Trypanosoma brucei</i>	3
3.1 Identifikace a validace cílů	5
3.1.1 RNAi	6
3.1.1.2 RNAi target sequencing (RIT-seq)	8
3.1.2 Proteomika	9
3.1.3 <i>In silico</i>	13
3.2 High throughput screening.....	14
3.2.1 Fenotypový a cílený screening.....	16
3.2.1.1 Fenotypový screening	17
3.2.1.2 Cílený screening.....	17
3.2.2 Detekční metody	18
3.2.2.1 Resazurin.....	20
3.2.2.2 SYBR Green	20
3.2.2.3 Luciferáza	20
3.2.2.6 Förster resonance energy transfer	21
3.2.2.4 Zastaralé metody	21
3.2.3 High content screening.....	22
3.3 Drug repurposing	23
3.4 Budoucí vývoj.....	24
4 Závěr	27
5 Seznam literatury	28

Seznam použitých zkratk

AAT6 – amino acid transporter 6

ADMET – absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování a toxicita

AI – umělá inteligence

AQP – aquaglyceroporin

ATP - adenosintrifosfát

CADD – computer aided drug discovery

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA – CRISPR RNA

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative

dsRNA – double strand (dvojvláknová) RNA

DTI – interakce léčiva s cílovým mechanismem (drug-target interaction)

ER – endoplasmatické retikulum

FADH – flavinadenindinukleotid

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)

FMDH – formyl-methanoforin dehydrogenáza

FMNH – flavinmononukleotid

FRET – Försterův rezonanční přenos energie (Förster resonance energy transfer)

GSK-3 – glykogen syntáza kináza 3

HAT – lidská africká trypanozomiáza (human African trypanosomiasis)

HCS – high content screening

HTS – high throughput screening

ISM – isometamidium chlorid

kDNA – kinetoplastová DNA

MoA – mechanismus účinku (mechanism of action)

mRNA – mediátorová RNA

MS – mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)

MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyltetrazolium bromid, tetrazoliové soli

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NECT – kombinovaná terapie nifurtimox–eflornithine (nifurtimox-eflornithine combination therapy)

NGS – sekvenování nové generace (next generation sequencing)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RCS – Relaxed Complex Scheme

RIT-seq – RNA interference target sequencing

RNAi – RNA interference

SD – směrodatná odchylka

SHERLOCK – Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing

SILAC – Stable Isotope Labelling By Amino Acids In Cell Culture

siRNA – small interfering RNA

SPA – scintilační proximitní test (scintillation proximity assay)

ssRNA – single strand (jednovláknová) RNA

tbcatB - CathepsinB

tbcatL - CathepsinL

TDR – Tropical Disease Research

TMT – Tandem Mass Tag

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

1 Úvod

Tropické infekční nemoci, mezi které patří lidská africká trypanozomiáza (human African trypanosomiasis, HAT) způsobená parazitem *Trypanosoma brucei*, dlouhodobě představují vážnou zdravotní zátěž v rozvojových zemích. Snahy o zmírnění jejich dopadu narážely na nedostatek finanční podpory, mimo jiné, protože jejich potlačení neslibuje zásadní komerční zisk. Objev a výzkum léčiv používaných proti HAT v minulém století byl podnícen koloniálními potřebami, zájem vyspělých zemí o málo rozvinuté africké regiony však postupně ochladl a s ním i motivace nacházet řešení tropických onemocnění (Trouiller *et al.*, 2002). V této souvislosti bylo poukázáno na tendenci vyvíjet léčiva podle potřeb vyspělého světa, obzvláště u infekčních a parazitárních onemocnění, která celosvětově představují třetinu zdravotnické zátěže, ale pouze 5% v bohatých zemích.

Léčiva používaná proti HAT se přitom vyznačovala vážnými vedlejšími účinky, které mohou během léčby vést i k úmrtí pacienta, již v 90. letech proto bylo upozorňováno na řadu nedostatků dostupných léčebných procedur (Kuzoe, 1993). K tomu se přidávají nízké šance na objev vakcíny, kvůli důmyslnému systému antigenní variace, takže neexistuje efektivní forma prevence. Situace se zlepšila počátkem nového tisíciletí, kdy spolupráce Světové zdravotnické organizace (WHO) s farmaceutickými firmami pomohla zmírnit narůst nemocných díky zřízení dodávek léků a důslednější diagnostice v populaci (Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update, 2006). V roce 2002 vznikl projekt Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), nezávislá organizace zřízená Médecins Sans Frontières k výzkumu léčiv proti zanedbaným onemocněním, která započala práci na nových lécích (Médecins Sans Frontières, 2002). V případě HAT tyto snahy vyústily ve schválení nového léčiva fexinidazol v roce 2018 (Bernhard *et al.*, 2022). Další potenciální nové léčivo acoziborol se v době vzniku této práce nachází ve třetí fázi klinických testů (Kumeso *et al.*, 2022).

Hledání nových léčiv je časově i finančně náročný proces, ve kterém se setkává několik oblastí expertíz zahrnující molekulární biologii, medicínu, farmakologii a biotechnologie. Nejobvyklejší je využití velkých knihoven molekul, z nichž se vybírají nejlepší kandidáti na základě inhibičního účinku na cílové proteiny nebo celé buňky (Gilbert, 2013). Tyto vůdčí molekuly jsou pak optimalizovány na základě potence vůči cíli, selektivity, buněčné aktivity a farmakokinetických vlastností, přičemž v úvahu musí být také brány specifické požadavky daného onemocnění. U HAT je zejména žádoucí, aby molekula dokázala překonat hematoencefalickou bariéru a působit díky tomu i v pozdní fázi nemoci (Enanga *et al.*, 2001). Výzkum nových léků zahrnuje také hledání vhodných molekulárních cílů, především enzymů s klíčovou funkcí v buňce, které by navíc neměly mít příliš blízké homology mezi lidskými proteiny (Frearson *et al.*, 2007). Přínosné je dále studium vzniku rezistencí a objasňování mechanismu účinku (mechanism of action, MoA) léků již používaných - zvláště těch, které byly objeveny před érou moderních molekulárních metod.

Cílem mé práce je shrnout základní kroky procesu objevování nových léčiv na modelu *Trypanosoma brucei*, charakterizovat molekulární metody do tohoto procesu nejčastěji zapojené a nastínit možné budoucí směry přístupů k tomuto výzkumu.

2 *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je bičíkatý parazitický prvok náležející k rodu *Trypanosoma*, řád Trypanosomatida, třídy Kinetoplastida. Dále se dělí na poddruhy, které způsobují onemocnění u lidí a hospodářských zvířat, není však možné je rozdělit na základě morfologie. *Trypanosoma brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense* jsou původci lidské africké trypanozomiázy (Human African Trypanosomiasis, HAT), obecně známé jako spavá nemoc, zatímco *T. brucei brucei* způsobuje trypanozomiázu zvířat zvanou nagana.

HAT se šíří bodnutím mouchy tse-tse (*Glossina* spp.). Parazitická buňka se vyskytuje v různých morfologických formách v závislosti na prostředí. V hmyzím vektoru se může vyskytovat jako epimastigotní či metacyklická trypomastigotní forma, zatímco v krvi savce jako krevní trypomastigotní forma (Rotureau & Abbeele, 2013). Trypomastigoti v krvi se dále dělí na dlouhý štíhlý (proliferující) a krátký tlustý (neproliferující) typ.

Metacyklickí trypomastigoti, kteří se do těla dostanou slinami vektora, se množí v těle hostitele a podle rozsahu jejich výskytu se průběh HAT dělí na ranou (hemolymfatickou) fázi a pozdní (meningoencefalickou) fázi (Simarro *et al.*, 2014). Přechod mezi nimi je charakterizován vstupem parazita do centrálního nervového systému přes hematoencefalickou bariéru. Příznaky v raném stádiu zahrnují horečky a bolest hlavy či kloubů, zatímco u pozdní fáze se vyskytují psychiatrické potíže a poruchy spánku, které této nemoci daly její lidové jméno. Není-li léčeno, toto onemocnění končí kómatem a smrtí. *Trypanosoma brucei gambiense* způsobuje přes 95 % případů a vyznačuje se pomalejším průběhem, který může trvat i několik let. U *Trypanosoma brucei rhodesiense*, která se na rozdíl od *T. b. gambiense* přenáší zejména mezi zvířaty, může smrt nastat už po několika týdnech.

Před nástupem fexinidazolu byli lékaři nuceni spolehnout se na omezený repertoár léčiv s řadou nevýhodných vlastností. Mezi ně patří suramin, melarsoprol, pentamidine, eflornithine a kombinovaná terapie nifurtimox–eflornithine (NECT) (Babokhov *et al.*, 2013). Tyto léky měly zásadní nedostatky jako toxické vedlejší účinky, které v některých případech vedly k úmrtí pacienta během léčby (Pépin *et al.*, 1995), nebo vyžadovaly režim špatně skloubitelný s podmínkami rurální Afriky (Burri & Brun, 2003). Hlášené výskyty selhání zavedených medikamentů (Legros *et al.*, 1999) vyvolaly obavy z nárůstu počtu nakažených. Organizace DNDi z těchto důvodů začala v roce 2003 podporovat výzkum hledající nová léčiva, která by překonala slabé stránky těch předchozích ve způsobu podávání, režimu léčby, vedlejších účincích a působení v různých fázích onemocnění.

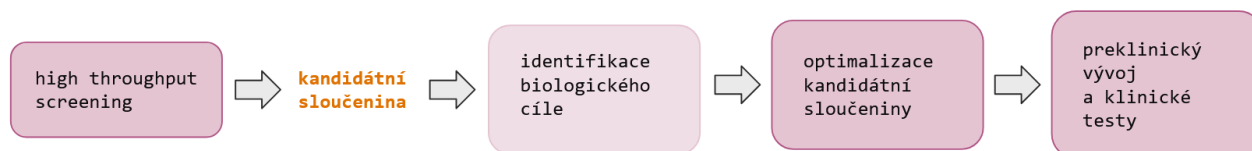
3 Molekulární metody využívané v hledání a výzkumu léčiv proti *Trypanosoma brucei*

Výzkum nových léčiv je zdlouhavý a nejistý proces, který i za ideálních podmínek stojí mnoho času, peněz a úsilí. Navržení správného postupu s využitím nejvhodnějších přístupů a metod může část prostředků ušetřit. Výzkum léčiv se v rané fázi často alespoň částečně drží jednoho ze dvou přístupů, cílený a fenotypový (Gilbert, 2013), které jsou zjednodušeně ilustrovány v Obrázku 1. Obecně je však obtížné jasně stanovit cestu, kterou se výzkum ubírá ve většině případů. Obvykle je výběr kroků závislý na tom, je-li jako cíl zvolena konkrétní biomolekula s ověřenou klíčovou rolí v organismu, nebo jsou látky testovány proti celým parazitům s jediným požadavkem na účinek potenciálního léčiva: omezit viabilitu parazitických buněk. Od toho se odvíjí výběr konkrétních metod využitých ve výzkumu.

cílený přístup



fenotypový přístup



Obrázek 1: zjednodušené schéma dvou nejčastějších přístupů ve vývoji léčiv. Obvykle je na počátku stanoveno, zda bude při high throughput screeningu testována knihovna molekul proti purifikovanému biologickému cíli z buňky parazita, u něhož je ověřeno, že hraje zásadní roli v jejím fungování. Druhou možností je testovat knihovnu proti buněčné kultuře bez předem prozkoumaného cíle, přičemž pozitivní výsledek je zjištěn inhibicí růstu kultury. Součástí postupu může být zjištění mechanismu účinku látky v buňce, ale není to tak vždy.

Při cíleném přístupu je prvním krokem identifikace vhodných biologických cílů, které mohou vzejít z genomických či proteomických studií, po které následuje jejich validace (Zheng *et al.*, 2013). Je totiž nutno prokázat, že vybraná biomolekula (receptor, enzym apod.) hraje dostatečně zásadní roli a je pro daný organismus jedinečná, aby se vyplatilo na ni zaměřit. Proti tomuto biologickému cíli se pak hledají modulatory cíle, tedy látky, které stimulují cílový mechanismus. Z nich se vybírají kandidátní molekuly na základě fyzikálně-chemických, farmakologických a tzv. „ADMET“ vlastností, což je zkratka pro absorpci, distribuci, metabolismus, vylučování a toxicitu (Lobell *et al.*, 2006). Tímto jsou prioritizovány nejlepší výsledky ze screeningů a přistupuje se k dalším optimalizacím z hlediska potence, selektivity atd.

Je však také běžné napřed otestovat širokou knihovnu látek proti živým buňkám, tzv. fenotypový přístup. U vybraných molekul, které projeví slibné účinky v hubení parazitů, se pak může přistoupit k objasnění jejich MoA (Terstappen *et al.*, 2007). Je samozřejmě vhodné znát o látce, která se má stát potenciálním léčivem, maximum dostupných informací. V případě selhání této konkrétní molekuly je pak snazší obrátit se k podobným látkám, které cílí na stejnou biochemickou dráhu, a je také snazší provádět strukturní úpravy za účelem dosažení lepší potence a selektivity léčiva. Znalost cíle může usnadnit včasné řešení potenciálních vedlejších účinků, ví-li se dopředu, že se např. v lidském těle vyskytuje blízký homolog (Wyatt *et al.*, 2011).

Tyto postupy jsou mimořádně náročné z časového a finančního hlediska: proces od přípravy na první screening po schválení americkým úřadem FDA obvykle trvá přes 10 let a může stát přes miliardu dolarů (Zheng *et al.*, 2013). Oproti tomu může být výhodné znovuvyužití léčiv („drug repurposing“), která již byla vyvinuta proti jinému onemocnění, což je také případ fexinidazolu.

V posledních dekádách ze screeningů vzešly desítky molekul s potenciálem uplatnit se ve zdravotnictví. Předtím však tyto látky musí projít řadou experimentů a chemických úprav, které je optimalizují pro použití jako léčivo. Kromě farmakologických vlastností, důležitých pro bezpečnost pacienta z hlediska vedlejších účinků, je například nutné ověřit, zda má daná látka trypanocidní nebo trypanostatické účinky. U některých látek, které zprvu vykazují negativní účinky na růst populace parazita, se teprve při bližším přezkoumání ukáže, že minimální koncentrace pro dosažení trypanocidního účinku je mnohem vyšší, než se jevílo z původních testů (De Rycker *et al.*, 2012). Často selhávají také molekuly, které nesplňují parametry „drug-like“ látek. Do těch spadá mj. vysoká rozpustnost a permeabilita, nízká molekulární hmotnost a nízké log P (hodnota afinity k lipofilním prostředím, která značí vysokou rozpustnost v tucích) (Lipinski *et al.*, 1997).

To není vše z kritérií pro úspěšného kandidáta na léčivo. Spavá nemoc má dvě fáze, přičemž v té pozdější parazité proniknou přes hematoencefalickou bariéru do centrální nervové soustavy. Toto specifikum klade další nároky na potenciální léčivo, pokud cílí na pokročilou fázi onemocnění či na obě fáze: musí se také dostat skrz hemoencefalickou bariéru, a to v dostatečné koncentraci k vyhubení parazita. Mimo to organizace DNDi ve svém profilu cílového produktu u HAT (Navarro *et al.*, 2012) definovala řadu specifických podmínek pro lék proti *T. brucei*, kde zahrnuje do cílové populace i těhotné a kojící ženy, upřesňuje požadavky na účinnost a náročnost léčby z hlediska času i ceny atd. Všechny podmínky jsou srovnány v Tabulce 1.

V kombinaci se zmíněnými farmakokinetickými požadavky tvoří toto vše dlouhý seznam, jemuž není jednoduché vyhovět. Dle Jones & Avery (2013) látky často ztratí svůj trypanocidní účinek a selžou během experimentálních studií za účelem dosažení všech popsanych vlastností.

Tabulka 1: profil cílového produktu u HAT, jak byl definován DNDi, popisující ideální a akceptovatelné podmínky pro potenciální léčiva (převzato a upraveno z Navarro *et al.*, 2012)

	Ideální	Akceptovatelné
Cílová populace	Efektivní pro pacienty v první i druhé fázi onemocnění Efektivní pro pacienty nereagující na melarsoprol Všichni pacienti vč. těhotných a kojících žen	Efektivní pro pacienty v první i druhé fázi onemocnění
Cílový druh	Účinné proti <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> i <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Účinné jen proti <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
Účinnost	Klinická účinnost nad 95 % při 18měsíčním sledování	Determinováno konzultací s experty
Bezpečnost/tolerabilita	Méně než 0,1 % úmrtnost související s léčivem Žádné sledování nežádoucích účinků	Méně než 1 % možná související úmrtnost Jednoduché laboratorní testování (testování v terénu) na nepříznivé účinky jednou týdně
Lékové formulace	Formulace pro dospělé i děti	
Léčebný režim	Sedmidenní (nebo kratší) léčba podáváním jednou denně orální cestou Sedmidenní (nebo kratší) léčba podáváním jednou denně intramuskulární injekcí	Desetidenní orální léčba, nebo léčba intramuskulární injekcí trvající méně než deset dní
Stabilita	Stabilita v klimatické zóně 4 po dobu více než 3 roky	Stabilita v klimatické zóně 4 po dobu více než 12 měsíců
Cena	Pod 30 EUR za jeden běh léčby (cena pouze za léčivo)	Pod 100 EUR / běh Pod 200 EUR / běh, pokud léčivo mimořádně dobře splňuje ostatní podmínky

3.1 Identifikace a validace cílů

Hledání léčebných cílů znamená hledání biomolekul hrajících zásadní roli v přežití, růstu a rozmnožení parazitické buňky. To může zjednodušeně znamenat hledání proteinů, které zásadně omezí schopnost buňky přežít nebo se dělit. Pokud je úkolem zkoumání významu různých proteinů, ať už enzymů, transportérů, kanálů nebo jiných biomolekul, pro život parazita, informativním přístupem může být sledování chování buněk, jsou-li o ně připraveny. Tento stav lze navodit zásahem do genomu umlčením některého genu (CRISPR-Cas9) nebo regulací pomocí degradace jeho transkriptu (RNA interference).

Před adaptováním CRISPR-Cas9 metody bylo genetických úprav dosaženo homologní rekombinací s rezistenčními markery nebo rekombinačním systémem Cre-loxP (Carruthers *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2013). Při hledání a validaci biologických cílů u *T. brucei* je však častěji využívána RNA interference

(RNAi), která byla pro *T. brucei* adaptována mnohem dříve než CRISPR-Cas9 (Wang *et al.*, 2000; Beneke *et al.*, 2017).

Zatímco genomické studie informují o esencionalitě různých genů a proteinů v nich kódovaných pro buňku, lze se také zaměřit přímo na proteiny, které se mohou stát cílem léčiva. Proteomické studie posouvají vpřed poznání o struktuře a funkci proteinů a jejich interakcích mezi sebou v různých fázích života parazita (Frantzi *et al.*, 2019). Pomáhají tedy pochopit konkrétní roli proteinů v biologickém systému, do něhož patří, a vybrat podle toho vhodné biologické cíle.

3.1.1 RNAi

RNAi je metoda regulace hladiny určitého proteinu pomocí interference s příslušnou mRNA. Toho se dosahuje pomocí transfekce dvojvláknové RNA (dsRNA) do buňky, přičemž sekvenční dsRNA musí odpovídat sekvenci cílové mRNA. Cizorodá dsRNA je následně zpracována molekulárním aparátem buňky, rozštěpením na více small interfering RNA (siRNA), s výsledkem následné degradace nejen této uměle vložené dsRNA, ale i mRNA se shodnou sekvencí, a to předtím, než dojde k její translaci do proteinu (Ngô *et al.*, 1998).

Nespornou výhodou RNAi je časová i finanční nenáročnost a jednoduchost přípravy. Je také charakteristická indukovatelností – možností spuštění děje molekulárním stimulem (Wang *et al.*, 2000). Je však nutno vzít v potaz, že RNAi fenotypy se projevují v různých mírách v závislosti na parametrech jako množství transkriptů nebo množství či stabilita proteinů (Morris *et al.*, 2002). RNAi také může způsobit degradaci mRNA jiných genů s podobnou sekvencí, čímž vzniká off-target efekt, a nemusí být naprosto spolehlivé v totálním potlačení dané mRNA (Qiu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2013). Pokud je cílem naprosté umlčení genu, může být lepší volbou zásah přímo do genomu. U *T. brucei* se nicméně RNAi stala standardní metodou pro výzkum esenciálních genů (Balaña-Fouce & Reguera, 2007).

Možnost spuštění RNAi vnějším stimulem výrazně rozšířila možnosti využití této metody. Wang *et al.* (2000) pro *T. brucei* vyvinuli vektor, do něhož lze vložit fragment cílového genu a tetracyklinem indukovat expresi dsRNA. Kolektiv prokázal, že hladina mRNA odpovídající genu, z něhož použili fragment do vektoru, po indukci interference prudce klesla, což ve většině případů vedlo k inhibici růstu nebo buněčné smrti. Na to navazující příprava první RNAi knihovny se uskutečnila v roce 2002 právě na *T. brucei* kolektivem Morris *et al.*

Metoda RNAi je s *T. brucei* výjimečně spjata i díky tomu, že první genomové RNAi knihovny byly zhotoveny právě na *T. brucei*, a je tedy prvním organismem, u něhož se potvrdil její význam a přínos. Už první screening odhalil překvapivou roli hexokinázy v obměně glykosylovaných EP-procyklinů na povrchu buňky za jejich neglykosylovanou GPEET formu (Morris *et al.*, 2002). Jde o glykoproteiny pokrývající povrch buňky *T. brucei* v její procyklické formě.

První pokusy bylo možné realizovat pouze na procyklické formě, kvůli potížím s transformací krevních buněk parazita (Burkard *et al.*, 2007). Po překonání těchto problémů přišly celogenomové RNAi screeniny krevní formy *T. brucei*, které odhalily aktivátor a transportér součástí mechanismů příjmu léčiv nifurtimox (aktivátor nitroreduktáza) a eflornithine (transportér AAT6)) (Baker *et al.*, 2011).

Jedna z oblastí, kde celogenomové RNAi screeniny prokázaly svůj přínos, je zkoumání příjmu a účinků již existujících léčiv (Schumann Burkard *et al.*, 2011). Principem screeningů, které se zaměřují na proteiny zahrnuté do těchto procesů v buňce parazita, je pěstování kultur *T. brucei* transfekovaných RNAi knihovnou v přítomnosti léčiva, ačkoliv ne smrtelné dávky. RNAi knihovnou se rozumí sbírka náhodných fragmentů genomické DNA z *T. brucei* o délkách 500-2000 bp vložených do plasmidu. Fragmenty DNA vznikají náhodně působením nukleázy. Pěstováním buněk v koncentraci léčiva nižší než by byla smrtelná dávka je umožněno přežít parazitům s částečnou rezistencí, což je důležité zejména kvůli tomu, že RNAi nesnižuje genovou expresi na minimum, ale na 30-35 % oproti normálnímu stavu. Pomocí tetracyklinu se indukuje snížení exprese různých proteinů a pokud je takto postižen protein se zásadní funkcí v příjmu nebo metabolismu látky, nebo je přímo jejím cílem, buňka se tím stává rezistentní na dané léčivo a přežije i v jeho přítomnosti. U buněk, které vykazují RNAi indukovanou rezistenci, se pomocí amplifikace DNA fragmentu ve vektoru a porovnáním sekvence s databází zjišťuje, který gen byl přesně postižen.

RNAi se uplatňuje ve zkoumání mnoha buněčných aktivit, které by mohly podnítit výzkum nových léčiv. Kromě mechanismů příjmu látek (zejména již etablovaných léčiv jako právě melarsoprol a eflornithine), vědci využívají RNAi ve výzkumu rezistence na léčiva, ale i rezistence na lidské krevní sérum (Alsford *et al.*, 2014) nebo proces připomínající quorum sensing u bakterií, kde přeměna parazita z proliferující štíhlé formy na neproliferující širokou je závislá na hustotě populace (Mony *et al.*, 2014). U mnoha léčiv byl jejich mechanismus působení neznámý a metoda RNAi se prokázala jako přímočarý a účinný způsob, jak tyto principy osvětlit. Bylo tomu tak například u 8-hydroxy-1,6-naphthyridinu (8-HNT). Tato látka s trypanocidními účinky byla ve studii z roku 2018 asociována se dvěma zinkovými transportéry (Wall *et al.*, 2018).

Jiná studie se zaměřila na isometamidium chlorid (ISM), veterinární trypanocidní léčivo (Baker *et al.*, 2015). RNAi screening rezistence na ISM odhalil role V-ATPázy, adaptin-3 a komplexů membrány endoplazmatického retikula (ER). ISM je látka, jejíž působení souvisí s kinetoplastem. Rezistence na ISM se vyskytla u buněk, kterým chyběly podjednotky V-ATPázy, adaptinu-3 nebo komplexů membrány ER, a kolektiv Baker *et al.* přišel s důkazy, že deplece těchto proteinů umožňuje *T. brucei* žít bez kinetoplastu.

Když jako potenciální cíl pro léčiva vyvstaly cysteinové proteázy Cathepsin-L a Cathepsin-B (tbcatL a tbcatB) (Nkemngu *et al.*, 2003), při bližším zkoumání jejich úloh a potenciálu pro další výzkum se

využívala také RNAi (Mackey *et al.*, 2004). Původní závěry upřednostnily *tbcA* kvůli průkaznější letalitě při depleci než *tbcL* (Abdulla *et al.*, 2008). Pozdější studie zpochybnily závěry kolektivu Abdulla *et al.* a jako vhodnějšího kandidáta vyzdvihly *tbcL* (Steverding *et al.*, 2012).

Pomocí RNAi knockdownu byl validován protein N-myristoyltransferáza jako esenciální pro životaschopnost buněk *T. brucei* v procyklické i krevní formě (Price *et al.*, 2003). RNAi screening také našel využití při zkoumání dopadů regulace polo-like kinázy na průběh cytokineze ve studii, která naznačila možné využití tohoto enzymu jako léčebný cíl (Hammarton *et al.*, 2007).

3.1.1.2 RNAi target sequencing (RIT-seq)

Skupina Alsford *et al.* v roce 2011 představila novou metodu zvanou „RNAi target sequencing“ (RIT-seq), která spojuje RNAi se sekvenováním nové generace („next generation sequencing“, NGS). Slouží k lepšímu pochopení, jak RNAi ovlivňuje genovou expresi a asociovanou ztrátu fitness. RIT-seq je metoda vyžadující více peněz a času než pouhá RNAi, zejména kvůli sekvenování a následné bioinformatické analýze, ale poskytuje vyšší throughput a celogenomové pokrytí, kdežto RNAi se obvykle soustředí na zkoumání jednoho genu.

Prvotní studie (Alsford *et al.*, 2011) identifikovala přes tisíc genů v krevní formě *T. brucei*, které geneticky validovala jako vhodné cíle léčby. Nejprve kolektiv vytvořil RNAi knihovnu buněk vložením RNAi kazety do genomu. RNAi kazety obsahovaly sekvence dlouhé zhruba 600bp, vzniklé náhodným štěpením DNA *T. brucei*. Po indukci snížení exprese tyto sekvence slouží jako předloha pro vznik dsRNA. Vložení kazety bylo cílené do vybraného konkrétního lokusu kvůli zvýšené spolehlivosti a reprodukovatelnosti pokusu. Následně bylo tetracyklinem indukováno snížení exprese. Z přeživších buněk po indukci kolektiv izoloval DNA, která sloužila k přípravě knihovny pro Illumina sekvenaci. Po amplifikaci a sekvenování následovalo mapování osekvenovaných úseků DNA na genom *T. brucei*. Změny v populaci buněk nesoucí RNAi kazetu, jejíž indukci je negativně ovlivněna fitness, jsou detekovány porovnáním s kontrolní populací, u níž nebylo snížení exprese spuštěno (kultivována bez tetracyklinu). Po mapování osekvenovaných DNA z přeživších buněk na genom *T. brucei* se ukázaly tzv. „cold spots“, tedy místa v genomu, kterým neodpovídala žádná ze sekvenovaných DNA. Tyto úseky se nevyskytovaly v žádné nebo velmi malém množství buněk po snížení exprese, což naznačuje, že narušení drah vyrábějící proteiny odpovídající těmto sekvencím způsobilo cytotoxicní nebo cytostatické defekty. Tímto způsobem – sekvenací a mapováním - lze ověřit, který gen je RNA interferencí přesně postižen.

Záhy poté, v roce 2012, bylo provedeno RIT-seq na všech pěti tehdy běžně užívaných léčivech proti HAT (suramin, pentamidin, melarsoprol, nifurtimox a eflornithin) s cílem objasnit jejich MoA a proteiny zapojené do příjmu a metabolismu těchto látek v buňce parazita. Vznikla knihovna asi 750 000 klonů reprezentující přes 99 % genů *Trypanosoma brucei*, které byly následně testovány na

rezistenci proti léčivům. DNA buněk, které odolaly vystavení vysokým koncentracím léčiv, byly podrobeny RIT-seq (Alsford *et al.*, 2012).

Tento RIT-seq screening asocioval pár aquaglyceroporinů (AQP2/AQP3), kanálů pasivního příjmu a výdeje vody skrz buněčnou membránu, s příjmem melarsoprolu a pentamidinu. Posloužil tak mimo jiné jako základ dalšího zkoumání melarsoprol-pentamidinové křížové rezistence (trypanozomy rezistentní na melarsoprol vykazující rovněž odolnost vůči pentamidinu). Bylo zjištěno, že melarsoprol-pentamidinová rezistence nastává, když buňka ztratí AQP2, AQP3 však nehraje zdaleka tak zásadní roli (Baker *et al.*, 2012).

3.1.2 Proteomika

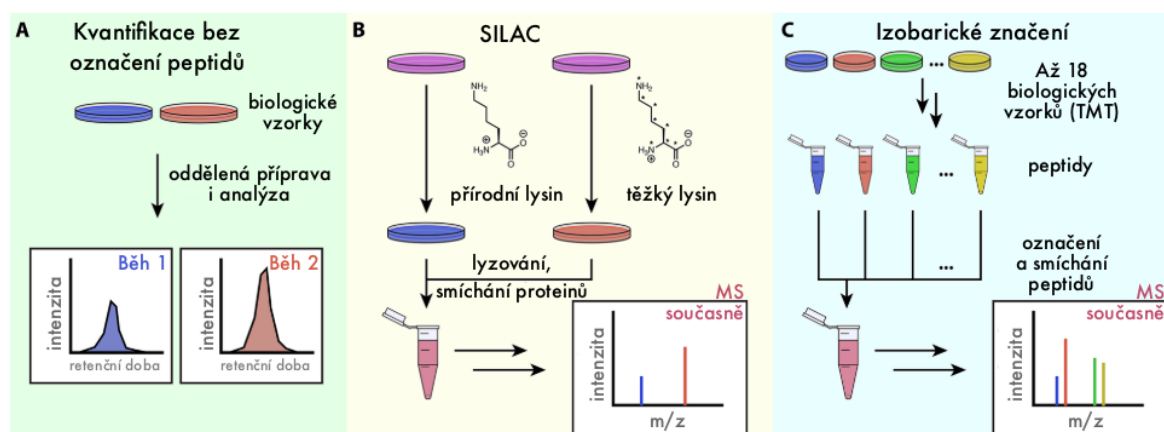
Proteom, soubor proteinů vyskytujících se v buňce za daných podmínek v daném čase, je sám o sobě knihovnou potenciálních cílů, na které se lze při vymýšlení nových inhibičních mechanismů zaměřit. Proteomické studie se uplatňují v široké škále úkonů náležících k procesu vývoje léčiv: během hledání nových léčebných cílů v parazitovi (Crozier *et al.*, 2018), zkoumání MoA vůdčích molekul vzešlých z fenotypových screeningů (Jones *et al.*, 2015) i v hledání biomarkerů v tělních tekutinách pacienta (Bonnet *et al.*, 2019). Jak píší ve svém review Frantzi *et al.* (2019), ve srovnání s relativně stabilním genomem je proteom dynamickým obrazem stavu buňky. Informace zapsaná v genomu prochází během transkripce a translace variabilními proměnami, od sestřihu a regulace na úrovni transkriptu po post-translační modifikace.

Proteomické studie mají u kinetoplastid jako právě *T. brucei* ještě zásadnější roli. Vzhledem k tomu, že genová exprese je u nich kontrolována post-transkripčními procesy (Clayton, 2013), nelze se při zkoumání abundance, struktury a funkce proteinů spoléhat pouze na analýzy DNA nebo mRNA.

Proteomické studie jsou obvykle založeny na hmotnostní spektrometrii (MS), která se stala nepostradatelným nástrojem při identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci komplexních proteinových směsí. Obvyklý postup zahrnuje izolaci a purifikaci proteinů z buněčného lyzátu a následné štěpení na peptidy, které jsou pak separovány kapalinovou chromatografií a u každého je změřen poměr hmotnosti ku náboji „m/z“ (Shuken, 2023). Výsledná data jsou analyzována softwarem (např. Mascot nebo MaxQuant) umožňujícím kvantifikaci a identifikaci proteinů, na základě dat týkajících se dílčích peptidů.

V mnoha studiích jsou proteiny předem značeny. To může proběhnout už během kultivace kultury, jako je tomu u „Stable Isotope Labelling By Amino Acids In Cell Culture“ (SILAC), kdy buňky během růstu zabudují těžké izotopy z média (Ong *et al.*, 2002). Jiné metody značí až po lyzi buněk – např. izobarické značení jako „tandem mass tag“ (TMT) (Thompson *et al.*, 2003). Není tomu tak ale vždy, hmotnostní

spektrometrie se často provádí i na neznačených vzorcích. Srovnání postupů je názorně ilustrováno v Obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma ilustrující možnosti značení či neznačení biologických vzorků při proteomických analýzách provedených hmotnostní spektrometrií (MS). „m/z“ je poměr hmotnosti ku náboji. **A.** Nejsou-li peptidy nijak označeny, je třeba je analyzovat zvlášť. **B.** Organismy jsou pěstovány v médiích obsahujících přírodní „lehký“ nebo těžký lysin. Vzorky je pak možné analyzovat v jednom běhu MS. **C.** Izobarické značení umožňuje až 18 biologických vzorků, které je po označení možno analyzovat v jednom běhu MS. Obrázek převzat a upraven z článku Shuken (2023).

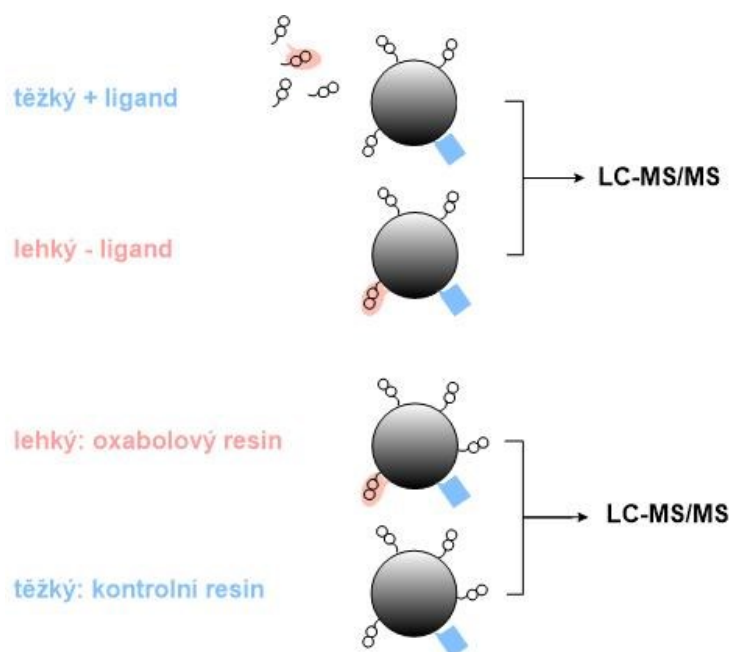
SILAC spočívá v kultivaci kultur krevní formy *T. brucei* ve dvou typech médií, které se liší obsahem lehkých a těžkých izotopů aminokyselin, např. lysinu a argininu (Jones *et al.*, 2015). Z jedné kultury obdržíme po lyzi buněk proteiny obvyklé váhy, z té druhé pak „těžké“ proteiny. Proteomy z lyzátů buněk obou typů jsou smíšený a měřeny ve společném vzorku.

TMT tkví v označení biologických vzorků po naštěpení peptidů různými „tagy“. Ty mají shodnou hmotnost, ale fragmentace způsobí uvolnění reportérových ionů, které jsou následně zaznamenány. Vzorky zde též po označení mohou být sloučeny do jednoho a hmotnostní spektrometrie pak může proběhnout najednou.

Hlavní výhoda značených peptidů je tedy možnost sloučit vzorky do jediného měření a zpřesnění výsledků, zejména při jejich kvantifikaci. Reagenty nutné ke značení však mohou být drahé, zatímco měření neoznačených peptidů sice vyžaduje měřit každý biologický vzorek zvlášť, je však levné a jednoduché.

Výzkumem cílových molekul a MoA oxaborolu SCYX-6759, sloučenině blízké příbuzné SCYX-7158 (acoziborole), se zabývala v roce 2015 proteomická a genomová studie skupiny Jones *et al.* V proteomické části výzkumu kolektiv využil SILAC a afinitní chromatografii k vytvoření seznamu proteinů interagujících s oxaboroly. Byly syntetizovány oxaboroly – SCYX-6759 ($EC_{50} = 0,19 \mu M$) a rozpustný oxaborole-1 ($EC_{50} = 0,064 \mu M$), – a k tomu navíc neaktivní kontrolní látka ($EC_{50} > 50 \mu M$).

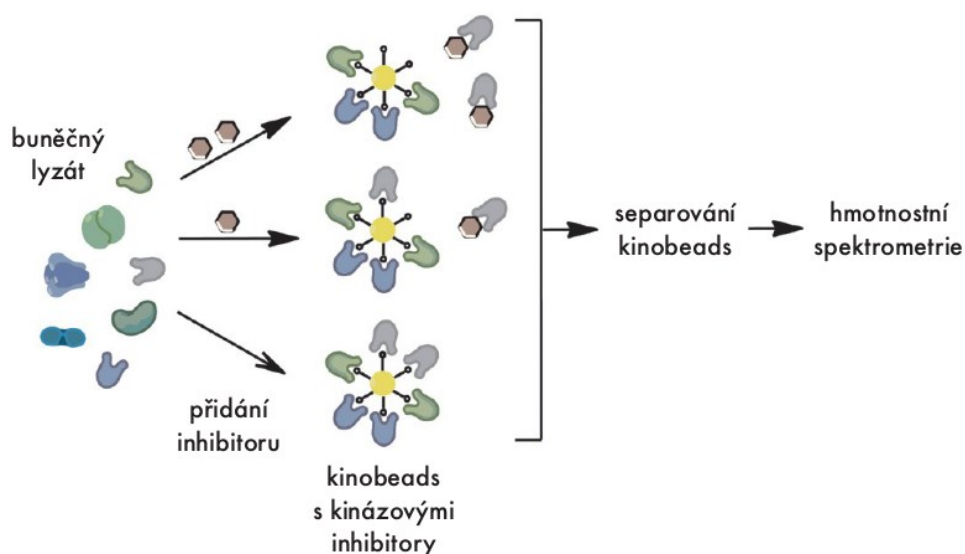
SCYX-6759 byl imobilizován na paramagnetických kuličkách, stejně jako neaktivní příbuzná sloučenina (ne však dohromady na jedné kuličce) pro využití v komparativní části. V kompetitivní části byly „těžké“ lyzáty vystaveny rozpustnému oxaborolu, který se navázal na proteiny specificky vážící oxaborole. Ty se po vystavení oxaborolu na paramagnetických kuličkách nemohly navázat, protože byly obsazené rozpustným oxaborolem, z kuliček byly proto posléze izolovány pouze nespecificky se vážící proteiny. „Lehké“ lyzáty nebyly vystaveny žádnému kompetitoru a na kuličky se proto navázaly proteiny vážící se specificky i nespecificky. V komparativní části byl „těžký“ lyzát vystaven kontrolnímu resinu s neaktivní sloučeninou, čímž byly navázány nespecificky se vážící proteiny. „Lehký“ lyzát byl vystaven oxaborolovému resinu, který navázal specificky i nespecificky se vážící proteiny. Kompetitivní část experimentu eliminuje proteiny, které se naváží na resin i za přítomnosti oxaborolu. Komparativní část eliminuje ty, které se váží na aktivní i neaktivní resin. Princip obou částí je zjednodušeně nastíněn v Obrázku 3. Experiment od sebe tímto postupem rozdělil proteiny z *T. brucei* vážící specificky SCYX-6759 od těch, které se váží nespecificky nebo nezávisle na aktivitě sloučeniny. Tato studie představila seznam 13 proteinů, čímž podpořila tvrzení, že tato sloučenina ovlivňuje v buňce více cílů, což zaprvé zesložitňuje MoA a zadruhé zkomplikuje parazitovi vývoj rezistence.



Obrázek 3: Horní dvojice představuje kompetitivní test, spodní komparativní. Modré obdelníky značí nespecificky se vážící proteiny. Růžově označené proteiny značí proteiny specificky vážící oxaborole. Obrázek byl převzat a upraven ze studie Jones *et al.* (2015).

Jiná studie se věnovala proteomické analýze kinomu *T. brucei* využívající tzv. „kinobeads“ – metoda, pomocí které je možné zachytit exprimované parazitické kinázy z buněčných lyzátů na kombinované kinázoinhibitorové matrixi (Urbaniak *et al.*, 2012). K buněčným lyzátům byly přidány inhibitory kináz v různých koncentracích, čímž bylo cílené kinázy znemožněno navázat se na kinobeads. Následovala

analýza proteinů zachycených na kinobeads pomocí izobarického značení a hmotnostní spektrometrie a zjištění inhibiční křivky pro každý protein. Proces je ilustrován v Obrázku 4. Tato studie se tímto snažila poskytnout lepší vhled do odlišností mezi savčím a parazitickým kinomem testováním typických inhibitorů proti savčím i parazitickým proteinkinázám.



Obrázek 4: buněčný lyzát je inkubován s testovanými inhibitory a následně vystaven kinázoinhibitorové matrix. Proteiny zachycené na těchto „kinobeads“ jsou posléze analyzovány hmotnostní spektrometrií. Výsledkem je inhibiční křivka pro každý z nich. Schéma převzato a upraveno ze studie Urbaniak *et al.* (2012).

Proteomická analýza procyklické formy *T. brucei* z roku 2018 odhalila 40 nových proteinů asociovaných s buněčným cyklem kvůli kolísání jejich množství v různých fázích cyklu a jejich nepostradatelnosti pro růst kultury (Crozier *et al.*, 2018). Kolektiv tedy soudí, že jsou pro přežití parazita zásadní a představují proto možné cíle budoucích léčiv, mimo jiné díky jejich odlišnosti od proteinů běžně se vyskytujících u jiných eukaryot. Byly identifikovány a kvantifikovány proteiny z 9 časových bodů během růstu buněk, přičemž se zajistilo, aby na samotném začátku byly zkoumané buňky v G1 fázi. Studie popsala využití desetinasobného tandemového hmotnostního značení peptidů (TMT) a následné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie k získání proteomických dat.

K podpoření svých závěrů kolektiv také využil dat projektu TrypTag, který vytvořil databázi popisující lokalizaci každého proteinu v buňce *T. brucei* na základě mikroskopie (Dean *et al.*, 2017). Data ze studie Crozier *et al.* byla také porovnána s transkriptomem z předchozího výzkumu (Archer *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že překryv je pozoruhodně malý. Za regulované buněčným cyklem je považováno 530 transkriptů a 384 proteinů, z nichž pouze 83 odpovídá transkriptům. Tato skutečnost může být přičítána na vrub nedostatkům proteomických technik, které nevykazují stoprocentní úspěšnost u proteinů vyskytujících se v buňce v nízkém množství. Je však nutné mít na vědomí, že *T. brucei* je

organismus kontrolující genovou expresi posttranskripčně. Tento poznatek tedy podporuje unikátní význam proteomických analýz, avšak bez zanedbání poznatků získaných výzkumem transkriptomu.

Proteomickou analýzou tělních tekutin subjektů nakažených *T. brucei gambiense* bylo identifikováno 69 lidských proteinů využitelných pro diagnostiku či určení fáze onemocnění (Bonnet *et al.*, 2019). Studie za tímto účelem zkoumala krevní sérum, mozkomíšni mok, moč a sliny. Peptidy rozdělila kapalinovou chromatografií, po níž následovala analýza hmotností a vzorů jejich rozpadu hmotnostní spektrometrií. Pro identifikaci proteinů byla data porovnána s databázemi proteomu člověka i *T. b. gambiense*. Kolektiv zejména poukázal na neuroserpin z mozkomíšního moku a moesin z moči jako proteiny s největším potenciálem stát se biomarkery nákazy HAT. Koncentrace moesinu v moči je oproti kontrolnímu vzorku zvýšená při obou fázích HAT, zatímco koncentrace neuroserpinu v mozkomíšním moku se průběžně snižuje v jeho průběhu. Tímto skýtá potenciál odhalit postup nemoci.

3.1.3 *In silico*

In silico metody prochází díky umělé inteligenci (AI) významným rozmachem, zejména v cílených přístupech však měly zastoupení dlouho před rozvojem AI (Crowther *et al.*, 2010). Výpočetní nástroje jako Tropical Disease Research (TDR) Targets Database umožňují prioritizaci proteinů na základě toho, zda jejich vlastnosti splňují žádoucí kritéria, např. schopnost interakce s léčivými („druggability“) nebo nepostradatelnost pro parazita. Často se tak zapojují do procesu po boku experimentálních metod z předchozích kapitol, v zájmu ušetření času a finančních prostředků na fyzické testy, je-li možno část provést ve virtuálním prostoru.

TDR Targets Database je databáze usilující o zjednodušení přístupnosti a uživatelské použitelnosti dat vzešlých z genetických, biochemických a farmakologických dat týkajících se původců tropických nemocí (Aguero *et al.*, 2008). Tato databáze zahrnuje prediktivní algoritmy posuzující schopnost být cílem léčiva, které zprostředkují automatizované zhodnocení cílových proteinů nebo vhodnost jejich inhibitorů. Databáze vygeneruje seznam možných léčebných cílů seřazený podle vlastností, které jsou předem stanoveny uživatelem.

Výpočetní nástroje založené na umělé inteligenci (např. AlphaFold, RaptorX) v posledních letech způsobily díky strojovému učení revoluci ve vyrábění strukturních modelů proteinů (Hameduh *et al.*, 2020; Jumper *et al.*, 2021). Strojové učení přináší dramatické zvýšení přesnosti oproti homolognímu modelování, metody výpočetního generování 3D modelů na základě primární struktury a homologií k lépe popsaným proteinům. Umělá inteligence využívá velké proteinové databáze k trénování modelů a nabízí plně automatizovanou predikci struktur, do které zapojuje kromě informací o homologiích i fyzikální omezení. V současnosti tedy nástroje jako AlphaFold pomáhají vyplnit prázdná místa v poznání funkčních struktur mnoha genů a proteinů. Spolehlivé modely jsou základem pro validaci

cílů a molekulární docking, zejména u zanedbaných onemocnění, kde prozkoumanost struktury proteinů z předchozích výzkumů nemusí pokrývat celý proteom.

Nedávná studie využila AlphaFold-Multimer k modelování interakcí klíčových proteinů v editosomu *Trypanosoma brucei*, nezbytného pro úpravu RNA (Poorinmohammad & Salavati, 2024). Studie díky tomu identifikuje místa v proteinových interakcích na úrovni jednotlivých aminokyselin, jejichž inhibicí lze tyto interakce narušit, a nabízí je jako potenciální léčebné cíle.

3.2 High throughput screening

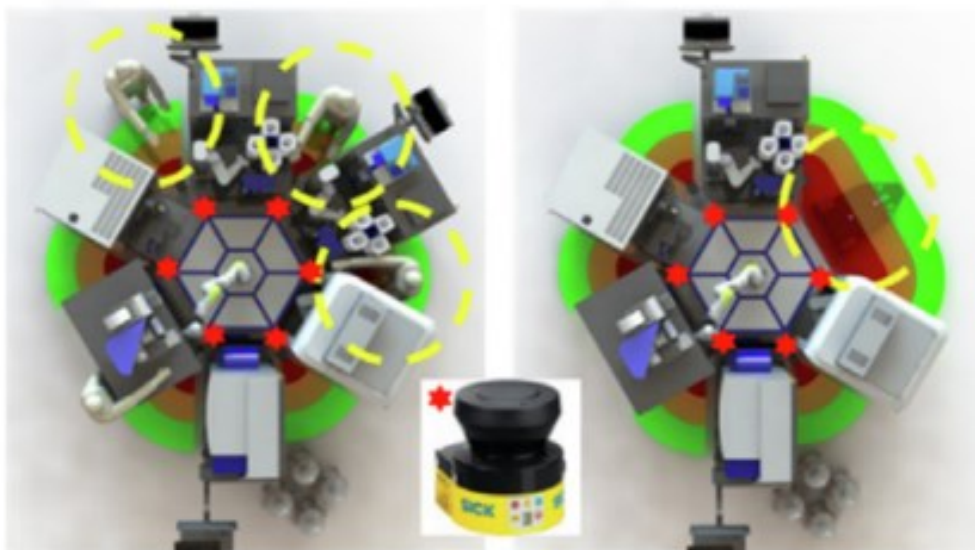
High throughput screening (HTS) je jednou z hlavních a nejčastěji využívaných metod ve výzkumu nových léčiv. Může mu předcházet fáze výběru konkrétního enzymu nebo biochemické dráhy, jejíž inhibicí dosáhneme potlačení růstu parazitické kultury, a to obvykle genomickými, proteomickými nebo *in silico* přístupy popsány v předchozích kapitolách. Ne vždy se však k HTS přistupuje s vybraným konkrétním cílovým mechanismem, ale testují se inhibiční účinky rozsáhlých knihoven na celé buňky. HTS umožňuje rychle a jednoduše otestovat obrovské množství molekul proti cíli a tak z databáze čítající i statisíce látek vybrat ty, které interagují s cílem žádoucím způsobem (Hajare *et al.*, 2014).

Primární screeniny běží často pouze v duplikátech nebo monoplíkátech a v jedné koncentraci (Armstrong, 1999). U pozitivních výsledků (tzv. “hit”) se provádí sekundární testy s důrazem na kvantifikaci a stanovení IC_{50} koncentrace, tedy poloviční maximální inhibiční koncentrace. Testy se snaží být informativní, reprodučibilní, spolehlivé, rychlé, cenově výhodné a snadno proveditelné.

Jak popisuje Hajare *et al.* (2014), za účelem zvýšení throughputu, snížení ceny a vyhovění ostatním zmíněným požadavkům se postupně miniaturizují a automatizují zapojením robotů. Příkladem miniaturizace je přechod z 96-jamkových destiček na 384-jamkové. Některé rozsáhlé studie se provádějí i s 864 až 1536-jamkovými destičkami. S rostoucím počtem jamek se snižuje objem připadající na jamku (u 96-jamkových je to 100-200 μ l, u 384-jamkových 25-100 μ l, u 1536-jamkových 2,5-10 μ l), čímž se šetří na roztocích. Při manuálním pipetování ovšem velmi snadno dochází k nepřesnostem a je nutné zapojit robotizaci. Snaha o automatizaci existuje u většiny laboratorních procedur z důvodů šetření času a prostředků, ale i zajištění uniformity testů a předcházení zkreslení výsledků, ke kterému může snadno docházet v důsledku nevyhnutelného lidského chybování. To se týká zejména dávkování tekutin.

Při automatizaci práce je kladen důraz na kombinaci efektivního využití prostoru s bezpečností, efektivitu, přizpůsobivost a modularitu systému. Modularita znamená, že systém sestává z několika pohyblivých platform (dávkování, pipetování, PCR, inkubace, imaging aj.) sloužících k různým účelům, kterými lze fyzicky manipulovat dle potřeby (Hansel *et al.*, 2022). Tyto vozíky lze propojovat

s centrální stanicí nebo navzájem a jsou také schopny nezávislé činnosti. Centrální stanice i jednotlivé platformy mohou obsahovat robota či robotickou ruku, které jsou navrženy ke kolaborativní práci s lidským personálem. Díky tomu je možné z těchto automatizovaných systémů odstranit fyzické bariéry, které dříve bránily jakémukoliv lidskému zásahu, jenž by zároveň nevyžadoval vypnutí procesu. Bezpečnost teď může být zajištěna laserovými paprsky, které v blízkosti personálu umožňují robotu přejít do kolaborativního módu zpomalením rychlosti práce o 90 %. Tato inovace, kdy se automatizované systémy v laboratoři již obejdou bez fyzických bariér aniž by byla kompromitována bezpečnost obsluhujícího personálu, šetří čas pracovníků i prostor v laboratořích.



Obrázek 5: Ilustrace kolaborativního systému, který využívá centrální stanici s robotickou rukou a možnost připojení až šesti platform, které mohou být použity i samostatně. Žluté přerušované čáry vyznačují laserem kontrolovaný prostor zajišťující bezpečnost lidské obsluhy. Obrázek vlevo popisuje takovou kontrolu v situaci, kdy jsou všechny pozice pro vozíky plné, obrázek vpravo případ, kdy pracovník nahradí jeden z vozíků.

Obrázek převzat a upraven z článku Hansel *et al.* (2022).

K posouzení kvality a vhodnosti konkrétního testu pro HTS byl definován statistický parametr “Z faktor” (Zhang *et al.*, 1999), který vychází z informací o síle signálu a jeho proměnlivosti během měření, podle vzorce:

$$Z' = (1 - [3SDs + 3SDc]) / (MEANs - MEANc)$$

MEANs a *SDs* jsou střední hodnota a směrodatná odchylka signálů z ošetřených buněk.

MEANc a *SDc* jsou střední hodnota a směrodatná odchylka signálů z buněčných kontrol.

Čím větší hodnota Z faktoru, tím vhodnější je daný test pro HTS. Z faktor posuzuje kvalitu testu z hlediska procenta potvrzených pozitivních výsledků (validovaných dalšími screeningy) ze všech výsledků primárního screeningu. Z faktor je také ovlivněn složením použitých knihoven sloučenin, které by měly být vzhledem k citlivosti na variabilitu dat z měření (SD) poměrně rozsáhlé, a jejich koncentrací. To je nutno vzít v úvahu při využívání této metody k porovnávání různých HTS testů mezi sebou. Podle Zhang *et al.*, $Z = 1$ značí ideální test. $1 > Z \geq 0,5$ je dobrý test. $0,5 > Z > 0$ je přijatelný test. Pokud $Z < 0$, test není možno použít.

3.2.1 Fenotypový a cílený screening

V kapitole 3 byl nastíněn rozdíl mezi fenotypovým a cíleným přístupem k výzkumu nových léčiv. Pro HTS je toto rozlišení zásadní, neboť se od něj odvíjí celá podoba daného testu. V případě fenotypového screeningu jde o aplikaci látky na živé parazity, zatímco u cíleného screeningu se látky testují *in vitro* proti definovaným a izolovaným cílovým mechanismům v parazitech, obvykle enzymům (Horn, 2014). Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma postupy tkví ve znalosti molekulárních a biochemických pochodů v parazitovi, která je klíčová u cíleného screeningu, u fenotypového screeningu však zásadní není. Fenotypový screening se provádí *in vivo*, cílený screening je založený na *in vitro* biochemických odečtech.

Nástup analýzy fenotypu buněk lze vysledovat až k začátku 20. století (Zheng *et al.*, 2013). Oproti tomu cílený screening je mnohem mladší a jeho vznik přitom závisel na pokrocích v molekulární biologii, zejména týkajících se enzymů. Rozvíjí se teprve od 80. let minulého století. Díky zvýšení throughputu zprostředkovaného robotizací a tlaku na znalosti MoA u testovaných látek, cílený screening rychle nabyl popularity na úkor fenotypového screeningu (Pereira & Williams, 2007). Technologický pokrok umožňující miniaturizaci buněčných testů ovšem v posledních dvou dekáдах navrátil relevanci upozaděným fenotypovým screeningům (Zheng *et al.*, 2013).

Obnovené atraktivitě fenotypových screeningů přispěly také spekulace, že jejich přínos byl podceněn, a to nejen v případě HAT, ale v kontextu výzkumu a vývoje léčiv obecně. Například analýza autorů Swinney & Anthony z roku 2011 se zaměřila na 189 small-molecule léčiv, které byly objeveny mezi lety 1999-2008 a schváleny americkým FDA, z nichž 75 se vyznačovalo dříve nepoznaným MoA. Navzdory soudobému důrazu na užívání cílených přístupů, tento článek přinesl zprávu, že většina léčiv schválených jako první své třídy vzešlo z fenotypových screeningů (28 látek) oproti cíleným screeningům (17 látek). Na druhou stranu u „follower“ léčiv přes 50 % vzešlo z cíleného screeningu a pouze 18 % z fenotypového. Follower léčivo (též „me-too“ nebo „follow-up“) je látka strukturou podobná jinému léčivu, která patří do stejné třídy a slouží ke stejnému účelu, ale liší se ve vedlejších účincích nebo interakcemi s jinými léčivy (Aronson & Green, 2020). Analýza Swinney & Anthony rovněž předkládá názor, že u follower léčiv vědci využívají znalosti MoA u léčiva, které mu předcházelo, a díky tomu efektivněji využívají cílené metody.

Během hledání nových účinných látek proti patogenu může volba vhodného postupu ušetřit mnoho času a prostředků. Při posuzování je zapotřebí vzít v úvahu povahu nemoci a jejího agens, informace o jeho biochemických pochodech a dostupných potenciálních cílech léčby. Není vhodné nechat se vést pouze současnými zobecněnými trendy, naopak je záhodno vzít v potaz specifika daného problému.

3.2.1.1 Fenotypový screening

Tento přístup bývá úspěšný u takových potenciálních léčiv, jejichž efektivita závisí na akumulaci a koncentraci v parazitovi. Jak název napovídá, analýza výsledků testovaného léčiva spočívá v pozorování fenotypových změn u parazita. Pozorování fenotypových změn může být založeno na mikroskopii, s technologickým postupem však výzkum mnohem častěji spoléhá na měření životaschopnosti buněk pomocí kolorimetrických, fluorescenčních nebo luminiscenčních metod. Tento způsob výzkumu nemusí zahrnovat určení cílů látky v parazitovi, na které negativně působí, ačkoliv po obdržení pozitivních výsledků z počátečních screeningů je výhodné prozkoumat podstatu účinku dané látky na organismus. Zkoumání MoA však nastává až u pozitivních výsledků a ne u celé knihovny látek, čítající tisíce až miliony různých molekul, kterým jsou parazité vystaveni během prvotních screeningů (Zheng *et al.*, 2013).

Výhoda fenotypového screeningu, kromě nenáročnosti na detailní znalosti biochemických drah, spočívá také v tom, že potenciální léčiva se dostanou do fyziologicky realistického prostředí (Woodland, 2015). Testované látky tedy mohou inhibovat více než jednu cílovou biomolekulu a u mnohých je to podmínka ke kýženému působení proti parazitovi. Fenotypový screening také eliminuje z výběru látky, neschopné proniknout do buněk, či jinak znevýhodněné v působení uvnitř parazita.

3.2.1.2 Cílený screening

Předpokladem tohoto přístupu je chápat biochemické mechanismy působení potenciálního léčiva proti parazitovi a interakce s jeho metabolismem. Praktický postup spočívá ve vystavení vybraného proteinu, který je determinován jako zásadní pro životaschopnost patogenu, knihovně sloučenin a následné optimalizaci těchto sloučenin, aby se zvýšila jejich potence proti cíli. Hledí se také na jejich selektivitu, aktivitu v buňce a farmakokinetické vlastnosti jako molekulární hmotnost a rozpustnost v tucích (Gilbert, 2013). Vhodné proteiny, které budou později během testování vystaveny potenciálním léčivům, jsou nejčastěji odhaleny pomocí celogenomového RNAi screeningu (Alsford *et al.*, 2011), který překlenuje prázdné místo v našem poznání mezi genovou sekvencí a funkcí proteinu u africké trypanozomy.

Mezi léčebné cíle patří trypanothion reductáza (Martyn *et al.*, 2007), RNA editační ligáza (Amaro *et al.*, 2008), N-myristoyl transferáza (Frearson *et al.*, 2010), glykogensyntáza kináza 3 (Oduor *et al.*, 2011), pteridin reductáza 1 (Moraes *et al.*, 2019) a další. Populárním léčebným cílem jsou enzymy zapojené do editace RNA (Rostamighadi *et al.*, 2024), díky jejím unikátním charakteristikám u kinetoplastid,

nebo proteinkinázy, na něž se vědci zaměřují při hledání léků na více různých onemocnění (Diaz *et al.*, 2014). Tato třída proteinů čítá u *T. brucei* 176 druhů, vč. 20 atypických proteinkináz sekvenčně odlišných od těch eukaryotických, a vykazují řadu odlišností od lidských kináz (Parsons *et al.*, 2005). Díky tomu se stala středem zájmu výzkumných skupin, které v této charakteristice vidí potenciál využít ho pro efektivní léčiva, na případu studie Diaz *et al.* lze ovšem poukázat na to, že hranice mezi cílenými a fenotypovými screeningy se občas stírají. Ačkoliv kolektiv jasně cílil na kinom (soubor kináz kódovaných v genomu) trypanozomy, nevybral z tohoto souboru enzymů žádný konkrétní. Otestoval místo toho knihovnu molekul, u nichž bylo známo, že cílí na kinázy, proti celým buňkám s očekáváním toho, že budou následovat studie zabývající se přesným MoA těchto látek.

3.2.2 Detekční metody

Způsoby detekce výsledků jsou významným dělicím kritériem HTS testů. Fenotypové a cílené postupy obvykle využívají odlišné postupy s různými detekčními metodami. U biochemických, zpravidla cílených testů, kde je látka testována *in vitro* navázáním ligandu na purifikovaný enzym nebo zastavením enzymatického procesu, je nejčastěji využívána fluorescence. Ta z velké části nahradila dříve využívané radiometrické metody jako scintilační proximitní test (SPA).

U fenotypového HTS může jít o testy buněčné viability s kolorimetrickou (tetrazoliové soli) nebo fluorescenční (např. resazurin) metodou detekce. Mohou to být také testy využívající reportérové geny např. pro beta-galaktosidázu nebo luciferázu, kde výstup obvykle závisí na aktivaci či inhibici promotoru genu. Významný rozmach zaznamenal high content screening (HCS), kombinující HTS s mikroskopickými metodami, spočívající v pořizování optických či fluorescenčních snímků a jejich automatizovaném zpracování do numerických výstupů. V Tabulce 2 jsou detekční metody stručně srovnány mezi sebou.

Tabulka 2: stručné srovnání principů, výhod a nevýhod detekčních metod v HTS.

	Předmět měření	Výhody	Nevýhody
Resazurin	Viabilita buněk detekcí metabolických procesů pomocí redoxní reakce.	- Jednoduchý a relativně rychlý test za nízkou cenu. - Netoxický pro buňky. - Real-time dlouhodobější pozorování.	- Nutná několikahodinová inkubace. - Vyšší riziko interakce s některými sloučeninami a vzniku falešných pozitiv.
SYBR green	Detekce nukleových kyselin.	- Jednoduchý odečet. - Vysoce citlivý. - Vysoký throughput.	- Pokud jsou v kultuře i jiné než cílové buňky (např. hostitelské), zkreslí to výsledky. - K odečtu je nutno buňky zlyzovat.
Luciferáza	Viabilita buněk detekcí ATP.	- Velmi rychlé, bez inkubační doby. - Extrémně citlivý test.	- Signál rychle mizí (v řádu minut). - K odečtu je nutno buňky zlyzovat.
Försterův rezonanční přenos energie (FRET)	Proteinové interakce, aktivita enzymů.	- Vysoká senzitivita. - Vhodný ke sledování interakcí molekul.	- Komplikovaná příprava. - Nízký throughput.
Tetrazoliové soli (MTT)	Viabilita buněk kolorimetrickým měřením schopnosti metabolizovat MTT.	Levné.	- Nutnost rozpustit krystaly před kolorimetrickým měřením. - Redoxně aktivní látky mohou ovlivnit výsledky.
Scintilační proximitní test (SPA)	Proteinové interakce, aktivita enzymů.	Specifické měření metabolického příjmu.	- Zacházení s radioaktivními sloučeninami. - Nízký throughput.

3.2.2.1 Resazurin

Jedním z nejrozšířenějších metod detekce množství buněk je využití fluorescenčního markeru resazurin (komerční název Alamar Blue). Resazurin je fluorescenční barvivo aktivované redukcí v cytosolu a je vhodné ke kvantitativním analýzám životaschopných buněk (Munshi *et al.*, 2014). V oxidované formě je resazurin modrý a přijímáním elektronů od NADPH, FADH, FMNH, NADH a cytochromů se redukuje na resofurin, čímž získává fluorescenční růžovou barvu. Díky tomu ho lze využít k určení množství metabolicky aktivních buněk v kultuře.

Resazurinový test představil kolektiv Rāz *et al.* (1997) pro 96-jamkové destičky a posléze ho Sykes a Avery upravili pro 384-jamkové destičky, čímž zajistili vyšší throughput (2009a). Výhodou resazurinu je bezpochyby nízká cena a nenáročnost testu, který vyžaduje pouze přidání resazurinu ke kultuře, kultivaci a měření fluorescence. Inkubace trvá 4 hodiny (Lim *et al.*, 2016), což není mnoho, existují však i rychlejší metody zjištění viability buněk jako luciferáza.

Při stanovování fluorescenčního signálu je nutné měřit kontrolní vzorky, které obsahují pouze resazurin a médium bez buněk, a jejich hodnoty posléze odečítat. Resazurin totiž reaguje také s médiem a zvyšuje jeho fluorescenci (Munshi *et al.*, 2014). Ačkoliv resofurin je chválen pro své netoxické vlastnosti, je vhodné se vyvarovat delší inkubaci, než je doporučeno výrobcem. Resofurin prochází další redukcí na hydroresofurin, který pak ovlivňuje viabilitu buněk (Pace & Burg, 2013).

3.2.2.2 SYBR Green

Kolektiv Faria *et al.* (2015) vyvinul test využívající SYBR Green k detekci viability trypanozom po inkubaci s testovanou látkou. Skupina tento test připravila jako alternativu k resazurinu, aby snížila množství falešných pozitiv a vylepšila jednoduchost a reproducibilitu. SYBR Green je cyaninové barvivo, které se váže na nukleové kyseliny, zejména dvouvláknovou DNA. Postup zahrnuje přidání SYBR Green reagentu a navození lýzy buněk, kde následuje inkubace v temnotě po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Následuje fluorescenční odečet.

3.2.2.3 Luciferáza

Luciferázové testy jako CellTiter-Glo® stanovují viabilitu buněk detekcí vnitrobuněčného ATP. Enzym luciferáza z *Photinus pyralis* katalyzuje oxidaci luciferinu za přítomnosti kyslíku, hořčíku a ATP. Tato reakce vydává stabilní luminiscenční signál už po deseti minutách od přidání reagentu, kdy dochází k lyzi buněk a uvolnění ATP, které je pak spotřebováno v reakci s luciferinem (Sykes & Avery, 2009b). Více živých buněk znamená více ATP, které se pak účastní více reakcí a tím se zvyšuje intenzita záření.

Kolektiv Oduor *et al.* (2011) podnikl cílený HTS proti glykogen syntáza kináze 3 (GSK-3) a použil přitom „Kinase-Glo“ (Ojo *et al.*, 2010) reagent za účelem *in vitro* luminiscentního měření kinázové spotřeby ATP pomocí luciferázy. Tomu přecházela inkubace GSK-3 s potenciálním inhibitorem

z knihovny čítající přes 16 000 látek. Je zde nepřímá úměra mezi množstvím ATP, změřeným pomocí Kinase-Glo, a kinázovou aktivitou. Čím je vyšší aktivita kinázy, tím méně je ve vzorku ATP, které by se mohlo účastnit luciferázou katalyzované reakce. Nejúčinnější inhibitory GSK-3 proto způsobí nejslabší luminiscentní signál. Luciferázové testy jsou tedy využitelné pro fenotypové i cílené screeningy.

3.2.2.6 Förster resonance energy transfer

Försterův rezonanční přenos energie (FRET) je detekční metoda častá v cíleném screeningu. Je založená na transferu energie z donorového fluoroforu, excitovaného externí iluminací, na blízký akceptorový fluorofor, jehož emise jsou posléze měřeny (Zimmermann *et al.*, 2016). Nutností je fyzická blízkost fluoroforů. Akceptorem také může být „quencher“, který energii pohlcuje bez vzniku signálu. Signál je emitován teprve po rozštěpení vazby mezi donorem a akceptorem, po zániku FRET (Moshiri & Salavati, 2010).

FRET bývá využíván v cíleném výzkumu zaměřujícím se na editosom, multiproteinový komplex zásadní v úpravě RNA (Moshiri & Salavati, 2010; Zimmermann *et al.*, 2016; Rostamighadi *et al.*, 2024). Studie Rostamighadi *et al.* je *in vitro* napodobeninou skutečného buněčného procesu, s využitím syntetické předupravené mRNA, guide RNA a editosomového proteinového komplexu. Z mRNA se po zpracování editosomem stává aktivní ribozym, který rozštěpí FRET substrát a tím je uvolněno fluorescenční záření. Pokud testovaná látka zabránila úpravě mRNA, ribozym je neaktivní a nemůže být uvolněno záření. Čím větší naměřená fluorescence, tím méně inhibičního působení testované látky.

3.2.2.4 Zastaralé metody

Tradiční metody detekce účinku testovaných látek u fenotypového screeningu byly postavené na manuálním počítání buněk pod mikroskopem, obarvených např. Giemsovým barvením (Dantas *et al.*, 2022). Tento postup je neefektivní a náchylný k chybování. Také některé mladší metody, které umožnily zapojení pokročilejší laboratorní techniky jako čtečky mikroděstiček a průtokové cytometry, však byly postupně vytlačeny z obvyklé metodiky HTS testů pro cenové, bezpečnostní nebo jiné nedostatky.

Jde např. o tetrazoliové soli (3,(4,5-dimethylthiazol2-yl)2,5-difenyl tetrazolium bromid zkracováno na MTT), což je kolorimetrická metoda adaptována pro testy viability *Trypanosoma brucei* v roce 1993 (Ellis *et al.*, 1993). MTT významně posunulo možnosti posouzení životaschopnosti a růstu buněčných kultur v cytotoxických nebo cytostatických podmínkách, které bylo dříve prováděno manuálním počítáním buněk nebo pěstováním buněk na médiích obsahujících radioaktivní nukleotidy (Mosmann, 1983). Test je založen na přeměně MTT v nerozpustný barevný formazan uvnitř živých buněk. Koncentrace formazanu je měřena spektrofotometricky. Před měřením je však nutné rozpustit krystaly

formazanu roztokem obsahujícím dodecylsírán sodný a kyselinu chlorovodíkovou, což způsobí smrt buněk.

Scintilační proximitní test (scintillation proximity assay, SPA) je dnes již upozaděná radiometrická metoda spočívající v zachytu radioaktivně značené molekuly na kuličku pokrytou scintilačním materiálem, např. polyvinyltoluenem (Glickman *et al.*, 2008). Signál plyne z navázání radioaktivně značené látky v blízkosti kuličky se scintilačním materiálem, jehož interakce s rozpadovými částicemi vede k vyžáření fotonů. Na světelném signálu je založen odečet testu. Její využití leží zejména v cíleném HTS, metody založené na radioaktivitě však ustupují bezpečnějším postupům.

3.2.3 High content screening

Jedná se o typ fenotypového screeningu kombinující obrazový odečet s algoritmickým vyhodnocením výsledků. Jak tvrdí Bickle (2008), high content screening (HCS) odvozuje svůj název od vysokého datového obsahu, který tento screening ze své podstaty poskytuje právě díky tomu, že zahrnuje vizuální stránku a umožňuje sledování většího množství parametrů. HCS kombinuje high throughput postupy s fluorescenčním značením a dále automatizovaným pořizováním a analýzou mikroskopických snímků.

S průlomovou studií přišel kolektiv Giuliano *et al.* (1997). Ten představil HCS jako metodu ulehčující validaci molekulárních cílů a optimalizaci kandidátů z prvotního screeningu analýzou snímků, které mohou poskytnout časové i prostorové informace o dynamikách uvnitř buňky. Díky tomu lze důkladněji pochopit roli léčebných cílů uvnitř buňky a determinovat specifitu vůdčích látek ze screeningů. Později se z tohoto postupu, původně vyvinutého pro sekundární screening, stal populární nástroj při hledání nových vůdčích molekul. Data extrahovatelná z digitálních snímků mohou zahrnovat kvantifikaci na základě intenzity fluorescence vícero markerů, odlišených vlnovou délkou, počet objektů a jejich prostorovou distribuci, nebo měření založená na rozeznání granularity buněk.

Proces obvykle zahrnuje obarvení parazitů fluorescenčními barvivý a pořízení mikroskopických fluorescenčních snímků pomocí high content systémů a následnou analýzu snímků s využitím specializovaného softwaru (Dantas *et al.*, 2022).

Kolektiv Miskinyte *et al.* (2022) představil test, který dle výše uvedeného postupu testoval knihovnu 13 486 látek na inhibici údržby kinetoplastové DNA (kDNA). Kolektiv použil dvě barviva, 5(6)-carboxyfluorescein diacetát succinimidyl ester (CFDA-SE) k obarvení cytoplazmy pro určení viability a Hoechst 33342 k označení jádra a kDNA.

3.3 Drug repurposing

Když v roce 2004 iniciativa DNDi oživila zájem o zanedbané tropické nemoci a spustila výzkum nových léčiv (Pécoul, 2004), využila ve svých HTS kampaních mimo jiné knihovny léčebných molekul vyvinutých v předchozích výzkumech proti různým onemocněním, ať už se tehdy zaměřovaly na spavou nemoc, jiné tropické nemoci nebo zcela odlišné patologie s parazity vůbec nesouvisející (Chatelain & Ioset, 2011). Tento přístup je výjimečný využitím investice času a prostředků minulých výzkumů, jejichž výsledek dosud nebyl komerčně využit. Výzkum léčiv proti onemocnění, které v současnosti vyžaduje urgentní pozornost, se díky čerpání z minulého výzkumu může zkrátit na pouhých několik měsíců za zlomek ceny, kterou by bylo třeba investovat do výzkumu začínajícího od píky (Fernández-Prada *et al.*, 2019). Drug repurposing těží nejen z obsáhlých knihoven již optimalizovaných léčiv, ale i ze zásoby informací, které přinesl jejich výzkum ve své době; jde mimo jiné o znalosti týkající se struktury léčivých látek, interakcí léčiva s cílovým mechanismem („drug-target interaction“, DTI), funkční genomiky nebo výsledků fenotypových screeningů.

Úspěšný drug repurposing nezávisí na tom, která molekula interaguje s cílem, ale především jak s ním interaguje a jaký to má dopad na buňku jako celek. U zvažovaných léčiv je proto nutné znát DTI. Znalosti o DTI významně napomáhají v předvídání, jak bude léčivo působit proti jinému onemocnění než bylo původně míněno, jestli má vůbec smysl ho zkoušet (např. pokud cílí na enzym, který parazit ani nemá) a jak může potenciálně ovlivňovat hostitele.

Drug repurposing je blízce spjatý s computer-aided drug designem (CADD), který lze rozdělit na cílené a ligandové přístupy (Fernández-Prada *et al.*, 2019). U ligandových přístupů jsou analyzovány struktury molekul, o nichž se ví, že se vážou na daný cíl, a na základě těchto analýz jsou stanoveny charakteristiky zásadní pro jejich aktivitu. Cílené strukturní přístupy využívají dostupných informací o 3D struktuře biologického cíle k vyvinutí nových ligandů navržených tak, aby se vážaly na specifické části cílové molekuly. K tomuto je využíván molekulární docking, virtuální screening a simulace molekulárních dynamik. Simulace molekulární dynamiky je počítačové modelování pohybu a vlastností molekul v čase (Amaro *et al.*, 2007). Molekulární docking je výpočetní metoda predikce, jak bude malá molekula interagovat s cílovou makromolekulou (Amaro *et al.*, 2008). Relaxed Complex Scheme (RCS) kombinuje tyto dvě metody zachycením několika různých proteinových konformací v průběhu simulace molekulární dynamiky, které poté podrobí molekulárnímu dockingu různých molekul. Tím je dosaženo lepšího odhadu dynamiky molekul a je možno odhalit dosud skryté nuance v možnostech vazeb ligandů.

Tohoto přístupu využil kolektiv Amaro *et al.* (2007). Analýza krystalové struktury RNA editační ligázy 1 u *T. brucei* spolu se simulací molekulární dynamiky odhalily dutinu poblíž místa pro navázání ATP v apo-TbREL1 (stav bez ligandu). Tato dutina, která vzniká přeskupením aktivního místa enzymu, se

nabízí pro navržení inhibitoru. Autoři zkoumali flexibilitu aktivního místa a dynamiku krystalizovaných molekul vody, které se nachází hluboko uvnitř enzymu a jsou pro TbREL1 unikátní. Na to navázal virtuální screening databáze National Cancer Institute (Amaro *et al.*, 2008). S využitím RCS pak autoři odhalili potenciál některých molekul, které by neuspěly při statickém dockingu. Představili jako nejvhodnější inhibitory tři zástupce azobarviv podobných suraminu, které však na rozdíl od něj vyhovují Lipinského pravidlům a mohou lépe procházet membránami.

CADD ovšem není podmínkou pro úspěšné nalezení léčiva vhodného ke znovuvyužití. Nedávno bylo upozorněno na slibné účinky MitoTamu, léčiva původně vyvinutého proti rakovině, které cílí na mitochondrie a na základě toho bylo vybráno k otestování proti parazitickým protistům (Arbon *et al.*, 2022). Fexinidazol, nejnovější schválené léčivo proti HAT, také vzešlo z fenotypových screeningů existujících léčiv. Organizace DNDi se obrátila ke staré třídě chemikálií ze 70. let s prokázanou antimikrobiální aktivitou a orální biologickou dostupností: nitroimidazoly (Raether & Seidenath, 1983; Torreele *et al.*, 2010). Fexinidazol vykazoval už během preklinických studií vhodné vlastnosti: především schopnost překonat hematoencefalitickou bariéru a velmi nízkou nespecifickou cytotoxicitu. Postihuje tedy pouze parazitické buňky a neovlivňuje negativně hostitele. Díky příznivým vlastnostem nebylo třeba léčivo optimalizovat a fexinidazol pokračoval do klinických testů, které vedly k jeho úspěšnému schválení.

3.4 Budoucí vývoj

Dopad AI na pole výzkumu nových léčiv s největší pravděpodobností zcela změní *status quo*. Nejspíše proběhne odklon od přístupů, které testují látky spíše náhodně, nýbrž se čím dál více bude spoléhat na výpočetní techniky. Ty pomáhají rychle a spolehlivě hledat vzorce v molekulárních dynamikách, strukturách proteinů a jejich ligandů. Z předchozích dekád screeningů a optimalizací vůdčích molekul z nich vzešlých má vědecká obec kam sáhnout pro zásobu prozkoumaných molekul, k nimž se lze vrátit s jiným cílem a zkrátit si tím cestu k novým léčivům. V těchto databázích se nejspíš bude více než kdy dříve pátrat po molekulách, jejichž vývoj byl předčasně ukončen, a nástup AI, která tyto databáze dokáže zpracovat a rychle se v nich orientovat, tento proces urychlí a učiní ho praktickým pro běžný výzkum.

AI navíc zaznamenala velké pokroky v předvídání molekulárních struktur proteinů (Jumper *et al.*, 2021), což byla disciplína donedávna považovaná za časově náročnou a velmi nepřesnou. Informace o konformacích a jejich změnách v závislosti na podmínkách otevrou mnoho nových dveří k novým inhibitorům a zrychlí vědecké poznání, stejně jako objevování nových léčiv. Pokrok umělé inteligence se navíc prudce vyvíjí. K AlphaFold se v roce 2024 přidaly další modely predikce biomolekulárních struktur, Boltz-1 (Boitreaud *et al.*, 2024) a Chai-1 (Wohlwend *et al.*, 2024), zatím však není zcela osvětleno, jaké specifické výhody a nevýhody tyto jednotlivé modely mohou mít. ABCFold je software,

který umožňuje používání všech tří jediným zadáním, což by mělo přispět k jasnějšímu srovnání (Elliot *et al.*, 2025).

AI také vstupuje do high throughput screeningů, jak popisuje ve svém reportu kolektiv Wallach *et al.* (2024). Neuronová síť AtomNet byla použita při hledání bioaktivních molekul proti 318 cílům, ve spolupráci s 482 laboratořemi a screeningovými centry skrz akademický kolaborační program Artificial Intelligence Molecular Screen. Ve studii kolektivu Wallach *et al.* jsou prezentovány výsledky těchto projektů v ohledu úspěšnosti neuronové sítě při vyhledávání nových a významných molekulárních skafoldů. Studie shledala, že AtomNet byl úspěšný (identifikoval alespoň jednu sloučeninu působící na cíl) v 73 % projektů (215 z celkového počtu 318). Tento výsledek srovnává se zhruba 50% úspěšností HTS (Fox *et al.*, 2006).

Zapojení AI do fáze hledání bioaktivních molekul skýtá mnoho výhod. Mezi ně patří možnost otestování mnohem širšího počtu molekul, protože ve virtuálním prostoru zcela odpadá nutnost všechny předem nasyntetizovat. K fyzickému testování pak lze přistoupit až u kandidátů, kteří při primárním virtuálním screeningu vykáží slibné výsledky. Kromě rychlosti a snížení nákladů AtomNet také přináší omezení falešně pozitivních výsledků. Navíc je úspěšný i u cílů, pro které nebyla k dispozici data o žádných dříve prozkoumaných bioaktivních molekulách.

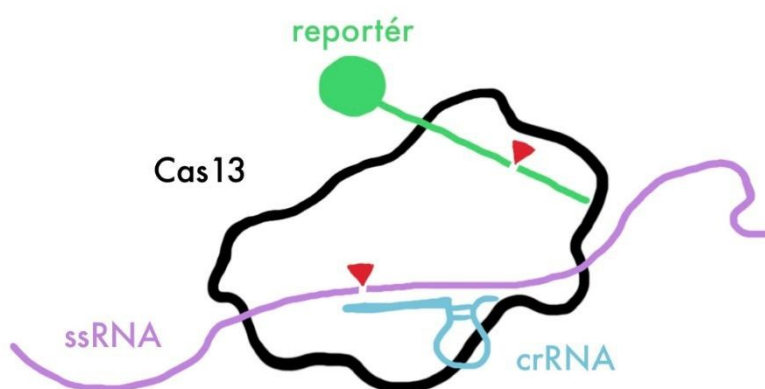
AI má i své nevýhody, které je nutné vzít v potaz. Je náročná na technické požadavky, ačkoliv vzhledem k rychlému technologickému pokroku lze očekávat snížení finančních nároků. Neuronové sítě jsou také závislé na kvalitě tréninkových dat. Falešně pozitivní výsledky, byť jejich míra při použití AtomNet byla nižší než průměrně bývá u HTS, stále představují riziko, se kterým je třeba počítat a nevynechat fyzickou validaci výsledků.

Aby snahy nepřišly vniveč, je také zapotřebí hlídat nástup rezistencí na nejnovější léčiva. V laboratorních podmínkách se rezistence na fexinidazol vyvolává snadno a probíhá podobným mechanismem jako u nifurtimoxu, tedy mutací genu kódujícího nitroreduktázu (Wyllie *et al.*, 2016). Může existovat možnost, že léčba nifurtimoxem již mohla u některých parazitů způsobit rezistenci na fexinidazol (Sokolova *et al.*, 2010). U fexinidazolu je navíc hlášen častější relaps onemocnění než u NECT (Lutje *et al.*, 2021), což může zvýšit riziko navození rezistence. Je zapotřebí získat rychlé a spolehlivé způsoby, jak tento jev monitorovat a v případě výskytu co nejrychleji reagovat změnou léčebného postupu. Jedním ze způsobů, jak předcházet či brzdít rozvoj rezistencí, je také vývoj kombinovaných léčebných postupů, podobně jako se tak už stalo u NECT terapie používající eflornithine a nifurtimox zároveň.

V diagnostice může pomoci nové využití CRISPR/Cas systému: CRISPR-Cas13 a „SHERLOCK4HAT“. Na tuto metodu, využívající endonukleázu Cas13 místo Cas9, která je používána v genovém inženýrství, bylo v kontextu spavé nemoci upozorněno kvůli potenciálnímu

uplatnění v diagnostice (Sima *et al.*, 2022). Studie adaptovala tzv. „Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing“ nebo-li „SHERLOCK“ jako nový nástroj sloužící k molekulární diagnostice nákazy, která navíc umožňuje i rozlišení mezi poddruhy *T. brucei* navzdory jejich těsné příbuznosti. Z hlediska výzkumu léčiv může SHERLOCK4HAT hrát zásadní roli při zjištění nastupující rezistence.

Jak je ilustrováno v Obrázku 6, SHERLOCK4HAT využívá kolaterální aktivitu endonukleázy Cas13, která po navázání specifické RNA, jejíž přítomnost je zamýšleno ve vzorku potvrdit či vyvrátit, rozštěpí také RNA reportérovou molekulu. Reportér po rozštěpení začne vydávat fluorescenční záření, zjiřitelné fluorescenčním odečtem nebo laterálním průtokovým testem. Rozlišení mezi HAT způsobenou *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense* je zajištěno výběrem genů specifických pro daný poddruh, podle kterých je posléze navržena crRNA. Jde o glykoproteinový gen specifický pro *T. b. gambiense* a gen asociovaný s rezistencí proti séru, specifický pro *T. b. rhodesiense*.



Obrázek 6: zjednodušené schéma kolaterální aktivity endonukleázy Cas13, kde ssRNA znamená single strand RNA a crRNA je CRISPR RNA, která navádí endonukleázu ke komplementární sekvenci v ssRNA, aby ji štěpila.

Toto uplatnění CRISPR technologie představuje výrazný posun v rychlosti diagnózy onemocnění, která dosud vyžadovala sérologický test a pozorování pod mikroskopem. To jsou postupy vyžadující čas, vybavení a specifickou odbornou způsobilost pracovníků, což v podmínkách rurální Afriky představuje vážný logistický problém. Pro HAT způsobenou *T. b. rhodesiense* navíc sérologické metody ani neexistují (Büscher & Deborggraeve, 2015).

„SHERLOCK4HAT“ byl nedávno adaptován jako potenciálně přelomová metoda v detekci vznikajících rezistencí na léčiva (Antón *et al.*, 2024). Dva testy popsané v této studii jsou schopné rozlišit mezi divokým typem a cílovými genovými chimérami variantami s jednonukleotidovými polymorfismy. RNA diagnostické využití může posloužit ke screeningu pacientů vykazující relaps a rozlišení mezi skutečným relapsem a reinfekcí. Tento rozdíl je v otázce rezistence na léčivo klíčový a zásadní také pro další úpravu léčebného postupu.

4 Závěr

Proces hledání nových léčiv je dlouhý, komplexní, nejistý a velmi drahý. Jistou nadějí představují snahy o znovuvyužití léčiv, často pocházejících ze starých kampaní, které ve své době zdánlivě neskončily úspěšně a přece mohou najít nečekané uplatnění o mnoho let později. Je to naděje pro minulé i současné výzkumy, jejichž výsledky mohou v budoucnu přispět k průlomům, ačkoliv v současnosti nemusí vykazovat potenciál okamžitého návratu investice. Zejména v zájmu postižených oblastí je však žádoucí hledat způsoby urychlení a zefektivnění výzkumu, zejména pokud to s sebou nese i snížení nákladů.

Kde dříve bylo relativně snadné rozdělit přístupy na fenotypové a cílené, každý se svými specifickými výhodami a nevýhodami, jejich použití se více a více prolíná dohromady. Ačkoliv tradiční metody nejspíš zcela nepřijdou o své místo v procesu, lze očekávat, že jejich využití se udrží zejména v experimentální validaci nových léčebných cílů nebo při optimalizaci vůdčích molekul vzešlých z velkoplošných screeningů. Vzhledem k nedozírnému potenciálu umělé inteligence by se tyto počáteční screeniny v budoucích letech mohly více přesouvat do virtuálního prostoru.

V poslední dekádě se počty nakažených spavou nemocí dramaticky snížily. Cesta k úplné eradikaci onemocnění vstupuje do pozdní fáze a nastává dilema, je-li nutné se nadále věnovat výzkumu nových léčiv a pokud ano, jak nejlépe získat prostředky k tomu nutné. Bylo zjištěno, že rezistence se může rozvinout poměrně snadno, a proto nelze vyloučit, že nové léky budeme potřebovat i navzdory současnému úspěchu fexinidazolu a s největší pravděpodobností acoziborolu. Tyto obavy však nevyvíjí dostatečný tlak a s klesající urgencí spojenou s počtem nakažených nejspíš klesne možnost získat finanční podporu pro další výzkum. S klesajícími počty nakažených také nastávají komplikace v pozdních fázích klinických testů, kde jsou efekty léčiv testovány na lidských pacientech. K překážkám daným nepraktickými podmínkami rozvojových zemí se přidávají potíže spojené s rostoucí vzácností onemocnění.

Proto je zapotřebí nepolevit ve snaze, ačkoliv se podařilo zmírnit dopad tohoto onemocnění na ohrožené oblasti. Výzkum léčiv proti *T. brucei* je navíc spojen s ostatními zanedbanými tropickými nemocemi, jejichž infekčním agens je příbuzná, a s *T. brucei brucei*, která je původcem trypanozomiázy zvířat a působí velké hospodářské škody. Je tedy přinejmenším vhodné apelovat na stávající relevanci ostatních zanedbaných tropických onemocnění a nevynechat z výzkumů s nimi spojených také *T. brucei*.

5 Seznam literatury

(* značené sekundární citace)

Abdulla, M.-H., O'Brien, T., Mackey, Z. B., Sajid, M., Grab, D. J., & McKerrow, J. H. (2008). RNA interference of *Trypanosoma brucei* cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e298. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000298>

Agüero, F., Al-Lazikani, B., Aslett, M., Berriman, M., Buckner, F. S., Campbell, R. K., Carmona, S., Carruthers, I. M., Chan, A. W. E., Chen, F., ... Verlinde, C. L. M. J. (2008). Genomic-scale prioritization of drug targets: the TDR Targets database. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(11), 900–907. <https://doi.org/10.1038/nrd2684>

Alsford, S., Currier, R. B., Guerra-Assunção, J. A., Clark, T. G., & Horn, D. (2014). Cathepsin-L can resist lysis by human serum in *Trypanosoma brucei brucei*. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004130. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004130>

Alsford, S., Eckert, S., Baker, N., Glover, L., Sanchez-Flores, A., Leung, K. F., Turner, D. J., Field, M. C., Berriman, M., & Horn, D. (2012). High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature*, 482(7384), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature10771>

Alsford, S., Turner, D. J., Obado, S. O., Sanchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., Hertz-Fowler, C., & Horn, D. (2011). High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Research*, 21(6), 915–924. <https://doi.org/10.1101/gr.115089.110>

Amaro, R. E., Schnauffer, A., Interthal, H., Hol, W., Stuart, K. D., & McCammon, J. A. (2008). Discovery of drug-like inhibitors of an essential RNA-editing ligase in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17278–17283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805820105>

Amaro, R. E., Swift, R. v., & McCammon, J. A. (2007). Functional and structural insights revealed by molecular dynamics simulations of an essential RNA editing ligase in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(2), e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000068>

Antón, E. P., Dujancourt-Henry, A., Rotureau, B., & Glover, L. (2024). A next generation CRISPR diagnostic tool to survey drug resistance in Human African Trypanosomiasis. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.15.24313552>

Arbon, D., Ženíšková, K., Šubrtová, K., Mach, J., Štursa, J., Machado, M., Zahedifard, F., Leštinová, T., Hierro-Yap, C., Neuzil, J., ... Sutak, R. (2022). Repurposing of MitoTam: Novel anti-cancer drug

candidate exhibits potent activity against major protozoan and fungal pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(8), e0072722. <https://doi.org/10.1128/aac.00727-22>

Archer, S. K., Inchaustegui, D., Queiroz, R., & Clayton, C. (2011). The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PloS One*, 6(3), e18425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018425>

Armstrong, J. W. (1999). A review of high-throughput screening approaches for drug discovery. *Am. Biotechnol. Lab*, 17(1), 26-28.

Aronson, J. K., & Green, A. R. (2020). Me-too pharmaceutical products: History, definitions, examples, and relevance to drug shortages and essential medicines lists. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 86(11), 2114–2122. <https://doi.org/10.1111/bcp.14327>

Babokhov, P., Sanyaolu, A. O., Oyibo, W. A., Fagbenro-Beyioku, A. F., & Iriemenam, N. C. (2013). A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathogens and Global Health*, 107(5), 242–252. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.00000000105>

Baker, N., Alsford, S., & Horn, D. (2011). Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176(1), 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.010>

Baker, N., Hamilton, G., Wilkes, J. M., Hutchinson, S., Barrett, M. P., & Horn, D. (2015). Vacuolar ATPase depletion affects mitochondrial ATPase function, kinetoplast dependency, and drug sensitivity in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(29), 9112–9117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505411112>

Baker, N., Hamilton, G., Wilkes, J. M., Hutchinson, S., Barrett, M. P., & Horn, D. (2015). Vacuolar ATPase depletion affects mitochondrial ATPase function, kinetoplast dependency, and drug sensitivity in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(29), 9112–9117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505411112>

Balaña-Fouce, R., & Reguera, R. M. (2007). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? *Trends in Parasitology*, 23(8), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.008>

Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., & Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *Royal Society Open Science*, 4(5), 170095. <https://doi.org/10.1098/rsos.170095>

*Bernhard, S., Kaiser, M., Burri, C., & Mäser, P. (2022). Fexinidazole for human African Trypanosomiasis, the fruit of a successful public-private partnership. *Diseases*, 10(4), 90. <https://doi.org/10.3390/diseases10040090>

Betu Kumeso, V. K., Kalonji, W. M., Rembry, S., Valverde Mordt, O., Ngolo Tete, D., Prêtre, A., Delhomme, S., Ilunga Wa Kyhi, M., Camara, M., Catusse, J., ... Tarral, A. (2023). Efficacy and safety of acoziborole in patients with human African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a multicentre, open-label, single-arm, phase 2/3 trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 23(4), 463–470. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00660-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00660-0)

*Bickle, M. (2008). High-content screening: a new primary screening tool? *IDrugs : The Investigational Drugs Journal*, 11(11), 822–826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988127>

Boitreaud, J., Dent, J., McPartlon, M., Meier, J., Reis, V., Rogozhnikov, A., & Wu, K. (2024). Chai-1: Decoding the molecular interactions of life. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.10.10.615955>

Bonnet, J., Garcia, C., Leger, T., Couquet, M.-P., Vignoles, P., Vatunga, G., Ndung'u, J., Boudot, C., Bisser, S., & Courtioux, B. (2019). Proteome characterization in various biological fluids of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected subjects. *Journal of Proteomics*, 196, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.005>

Burkard, G., Fragoso, C. M., & Roditi, I. (2007). Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 153(2), 220–223. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.02.008>

Burri, C., & Brun, R. (2003). Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitology Research*, 90(S1), S49–S52. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0766-5>

Büscher, P., & Deborggraeve, S. (2015). How can molecular diagnostics contribute to the elimination of human African trypanosomiasis? *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(5), 607–615. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1027195>

Carruthers, V. B., van der Ploeg, L. H., & Cross, G. A. (1993). DNA-mediated transformation of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 21(10), 2537–2538. <https://doi.org/10.1093/nar/21.10.2537>

*Chatelain, E., & Ioset, J.-R. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Drug Design, Development and Therapy*, 5(5), 175–181. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S16381>

*Clayton, C. (2013). The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS Pathogens*, 9(11), e1003680. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003680>

- Crowther, G. J., Shanmugam, D., Carmona, S. J., Doyle, M. A., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Nwaka, S., Ralph, S. A., Roos, D. S., van Voorhis, W. C., & Agüero, F. (2010). Identification of attractive drug targets in neglected-disease pathogens using an *in silico* approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), e804. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000804>
- Crozier, T. W. M., Tinti, M., Wheeler, R. J., Ly, T., Ferguson, M. A. J., & Lamond, A. I. (2018). Proteomic analysis of the cell cycle of procyclic form *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 17(6), 1184–1195. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000650>
- *Dantas, R. F., Torres-Santos, E. C., & Silva, F. P. (2022). Past and future of trypanosomatids high-throughput phenotypic screening. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210402. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210402>
- De Rycker, M., O'Neill, S., Joshi, D., Campbell, L., Gray, D. W., & Fairlamb, A. H. (2012). A static-cidal assay for *Trypanosoma brucei* to aid hit prioritisation for progression into drug discovery programmes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1932. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001932>
- Dean, S., Sunter, J. D., & Wheeler, R. J. (2017). TrypTag.org: A trypanosome genome-wide protein localisation resource. *Trends in Parasitology*, 33(2), 80–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.009>
- Elliott, L. G., Simpkin, A. J., & Rigden, D. J. (2025). ABCFold: easier running and comparison of AlphaFold 3, Boltz-1 and Chai-1. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.03.12.642791>
- Ellis, J. A., Fish, W. R., Sileghem, M., & McOdimba, F. (1993). A colorimetric assay for trypanosome viability and metabolic function. *Veterinary Parasitology*, 50(1–2), 143–149. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90015-F](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90015-F)
- Enanga, B., Burchmore, R. J. S., Stewart, M. L., & Barrett, M. P. (2002). Sleeping sickness and the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(5), 845–858. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8472-0>
- Faria, J., Moraes, C. B., Song, R., Pascoalino, B. S., Lee, N., Siqueira-Neto, J. L., Cruz, D. J. M., Parkinson, T., Ioset, J.-R., Cordeiro-da-Silva, A., & Freitas-Junior, L. H. (2015). Drug discovery for human African trypanosomiasis: Identification of novel scaffolds by the newly developed HTS SYBR Green assay for *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 70–81. <https://doi.org/10.1177/1087057114556236>
- Fox, S., Farr-Jones, S., Sopchak, L., Boggs, A., Nicely, H. W., Khoury, R., & Biros, M. (2006). High-throughput screening: Update on practices and success. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(7), 864–869. <https://doi.org/10.1177/1087057106292473>

- *Frantzi, M., Latosinska, A., & Mischak, H. (2019). Proteomics in drug development: The dawn of a new era? *Proteomics. Clinical Applications*, 13(2), e1800087. <https://doi.org/10.1002/prca.201800087>
- Frearson, J. A., Wyatt, P. G., Gilbert, I. H., & Fairlamb, A. H. (2007). Target assessment for antiparasitic drug discovery. *Trends in Parasitology*, 23(12), 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.019>
- *Gilbert, I. H. (2013). Drug discovery for neglected diseases: Molecular target-based and phenotypic approaches. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(20), 7719–7726. <https://doi.org/10.1021/jm400362b>
- Giuliano, K. A., DeBiasio, R. L., Dunlay, R. T., Gough, A., Volosky, J. M., Zock, J., Pavlakis, G. N., & Taylor, D. L. (1997). High-content screening: A new approach to easing key bottlenecks in the drug discovery process. *SLAS Discovery*, 2(4), 249–259. <https://doi.org/10.1177/108705719700200410>
- Glickman, J. F., Schmid, A., & Ferrand, S. (2008). Scintillation proximity assays in high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies*, 6(3), 433–455. <https://doi.org/10.1089/adt.2008.135>
- *Hajare, A. A., Salunkhe, S. S., Mali, S. S., Gorde, S. S., Nadaf, S. J., & Pishawikar, S. A. (2014). Review on: High-throughput screening is an approach to drug discovery. *American Journal of PharmTech Research*, 4(1).
- *Hameduh, T., Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3494–3506. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.007>
- Hammarton, T. C., Kramer, S., Tetley, L., Boshart, M., & Mottram, J. C. (2007). *Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1229–1248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05866.x>
- Hansel, C. S., Plant, D. L., Holdgate, G. A., Collier, M. J., & Plant, H. (2022). Advancing automation in high-throughput screening: Modular unguarded systems enable adaptable drug discovery. *Drug Discovery Today*, 27(8), 2051–2056. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.03.010>
- Horn, D. (2014). High-throughput decoding of drug targets and drug resistance mechanisms in African trypanosomes. *Parasitology*, 141(1), 77–82. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000243>
- Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. (2006). *Releve Epidemiologique Hebdomadaire*, 81(8), 71–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16673459>
- *Jones, A. J., & Avery, V. M. (2013). Whole-organism high-throughput screening against *Trypanosoma brucei*. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(5), 495–507. <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.783816>

- Jones, D. C., Foth, B. J., Urbaniak, M. D., Patterson, S., Ong, H. B., Berriman, M., & Fairlamb, A. H. (2015). Genomic and proteomic studies on the mode of action of Oxaboroles against the African Trypanosome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), e0004299. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004299>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kim, H.-S., Li, Z., Boothroyd, C., & Cross, G. A. M. (2013). Strategies to construct null and conditional null *Trypanosoma brucei* mutants using Cre-recombinase and loxP. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 191(1), 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.08.001>
- Kuzoe, F. A. (1993). Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 54(3–4), 153–162. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(93\)90089-t](https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90089-t)
- Legros, D., Evans, S., Maiso, F., Enyaru, J. C. K., & Mbulamberi, D. (1999). Risk factors for treatment failure after melarsoprol for *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis in Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(4), 439–442. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90151-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90151-7)
- Lim, K. T., Zahari, Z., Amanah, A., Zainuddin, Z., & Adenan, M. I. (2016). Development of resazurin-based assay in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei rhodesiense* strain STIB 900 for the identification of potential anti-trypanosomal agents. *Experimental Parasitology*, 162, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.002>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1–3), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Lobell, M., Hendrix, M., Hinzen, B., Keldenich, J., Meier, H., Schmeck, C., Schohe-Loop, R., Wunberg, T., & Hillisch, A. (2006). *In silico* ADMET traffic lights as a tool for the prioritization of HTS hits. *ChemMedChem*, 1(11), 1229–1236. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600168>
- Lutje, V., Probyn, K., Seixas, J., Bergman, H., & Villanueva, G. (2021). Chemotherapy for second-stage human African trypanosomiasis: drugs in use. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(12), CD015374. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015374>
- Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B., & McKerrow, J. H. (2004). A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 48426–48433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402470200>

Médecins Sans Frontières. (2001, 3. května). *Supply of sleeping sickness drugs confirmed*. <https://www.msf.org/supply-sleeping-sickness-drugs-confirmed>

Médecins Sans Frontières. (2002, 25. února). *DNDi, the Drugs For Neglected Diseases Initiative: A global initiative to develop drugs for those in need*. <https://msfaccess.org/dndi-drugs-neglected-diseases-initiative-global-initiative-develop-drugs-those-need>

Miskinyte, M., Dawson, J. C., Makda, A., Doughty-Shenton, D., Carragher, N. O., & Schnauffer, A. (2022). A novel high-content phenotypic screen to identify inhibitors of mitochondrial DNA maintenance in trypanosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(2), e0198021. <https://doi.org/10.1128/AAC.01980-21>

Mony, B. M., MacGregor, P., Ivens, A., Rojas, F., Cowton, A., Young, J., Horn, D., & Matthews, K. (2014). Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 505(7485), 681–685. <https://doi.org/10.1038/nature12864>

Morris, J. C., Wang, Z., Drew, M. E., & Englund, P. T. (2002). Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *The EMBO Journal*, 21(17), 4429–4438. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf474>

Moshiri, H., & Salavati, R. (2010). A fluorescence-based reporter substrate for monitoring RNA editing in trypanosomatid pathogens. *Nucleic Acids Research*, 38(13), e138. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq333>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Munshi, S., Twining, R. C., & Dahl, R. (2014). Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: potential for false positives. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70(2), 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.06.005>

*Navarro, G., Chokpaiboon, S., de Muylder, G., Bray, W. M., Nisam, S. C., McKerrow, J. H., Pudhom, K., & Linington, R. G. (2012). Hit-to-lead development of the chamigrane endoperoxide merulin A for the treatment of African sleeping sickness. *PloS One*, 7(9), e46172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046172>

Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., & Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14687–14692. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14687>

- Nkemgu, N. J., Grande, R., Hansell, E., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., & Steverding, D. (2003). Improved trypanocidal activities of cathepsin L inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(2), 155–159. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00096-7](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00096-7)
- Oduor, R. O., Ojo, K. K., Williams, G. P., Bertelli, F., Mills, J., Maes, L., Pryde, D. C., Parkinson, T., van Voorhis, W. C., & Holler, T. P. (2011). *Trypanosoma brucei* glycogen synthase kinase-3, a target for anti-trypanosomal drug development: A public-private partnership to identify novel leads. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e1017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001017>
- Ojo, K. K., Larson, E. T., Keyloun, K. R., Castaneda, L. J., Derocher, A. E., Inampudi, K. K., Kim, J. E., Arakaki, T. L., Murphy, R. C., Zhang, L., ... van Voorhis, W. C. (2010). *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 is a target for selective kinase inhibitors. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(5), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1818>
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 1(5), 376–386. <https://doi.org/10.1074/mcp.m200025-mcp200>
- Pace, R. T., & Burg, K. J. L. (2015). Toxic effects of resazurin on cell cultures. *Cytotechnology*, 67(1), 13–17. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9664-1>
- Pécoul, B. (2004). New drugs for neglected diseases: from pipeline to patients. *PLoS Medicine*, 1(1), e6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0010006>
- Pépin, J., Milord, F., Khonde, A. N., Niyonsenga, T., Loko, L., Mpia, B., & Wals, P. D. (1995). Risk factors for encephalopathy and mortality during melarsoprol treatment of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(1), 92–97. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90673-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90673-8)
- *Pereira, D. A., & Williams, J. A. (2007). Origin and evolution of high throughput screening. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 53–61. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707373>
- Poorinmohammad, N., & Salavati, R. (2024). Prioritization of *Trypanosoma brucei* editosome protein interactions interfaces at residue resolution through proteome-scale network analysis. *BMC Molecular and Cell Biology*, 25(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12860-024-00499-4>
- Price, H. P., Menon, M. R., Panethymitaki, C., Goulding, D., McKean, P. G., & Smith, D. F. (2003). Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7206–7214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211391200>

- Qiu, S., Adema, C. M., & Lane, T. (2005). A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 33(6), 1834–1847. <https://doi.org/10.1093/nar/gki324>
- Raether, W., & Seidenath, H. (1983). The activity of fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77(1), 13–26. <https://doi.org/10.1080/00034983.1983.11811668>
- Räz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R., & Brun, R. (1997). The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Tropica*, 68(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00079-x](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00079-x)
- Rostamighadi, M., Kamelshahrudi, A., Mehta, V., Zeng, F.-Y., Pass, I., Chung, T. D. Y., & Salavati, R. (2024). High-throughput screening of compounds targeting RNA editing in *Trypanosoma brucei*: Novel molecular scaffolds with broad trypanocidal effects. *Biochemical Pharmacology*, 219, 115937. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115937>
- Rotureau, B., & van den Abbeele, J. (2013). Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(SEP). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00053>
- Schumann Burkard, G., Jutzi, P., & Roditi, I. (2011). Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 175(1), 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.002>
- *Shuken, S. R. (2023). An introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research*, 22(7), 2151–2171. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00838>
- Sima, N., Dujeancourt-Henry, A., Perlaza, B. L., Ungeheuer, M.-N., Rotureau, B., & Glover, L. (2022). SHERLOCK4HAT: A CRISPR-based tool kit for diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *EBioMedicine*, 85(8), 104308. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104308>
- *Simarro, P., Franco, J., Diarra, A., & Jannin, J. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 257. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728>
- Sokolova, A. Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S. L., Read, K. D., & Fairlamb, A. H. (2010). Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 2893–2900. <https://doi.org/10.1128/AAC.00332-10>
- Steverding, D., Sexton, D. W., Wang, X., Gehrke, S. S., Wagner, G. K., & Caffrey, C. R. (2012). *Trypanosoma brucei*: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug

target. *International Journal for Parasitology*, 42(5), 481–488.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.03.009>

Swinney, D. C., & Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(7), 507–519. <https://doi.org/10.1038/nrd3480>

Sykes, M. L., & Avery, V. M. (2009). A luciferase based viability assay for ATP detection in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream form strain 427. *Parasites & Vectors*, 2(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-54>

Sykes, M. L., & Avery, V. M. (2009a). Development of an Alamar Blue viability assay in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream form strain 427. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 665–674. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0015>

Terstappen, G. C., Schlüpen, C., Raggiaschi, R., & Gaviraghi, G. (2007). Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(11), 891–903. <https://doi.org/10.1038/nrd2410>

Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K. A., & Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>

Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M. A., & Pécou, B. (2010). Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e923. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923>

Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., & Ford, N. (2002). Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet*, 359(9324), 2188–2194. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09096-7)

Urbaniak, M. D., Mathieson, T., Bantscheff, M., Eberhard, D., Grimaldi, R., Miranda-Saavedra, D., Wyatt, P., Ferguson, M. A. J., Frearson, J., & Drewes, G. (2012). Chemical proteomic analysis reveals the drugability of the kinome of *Trypanosoma brucei*. *ACS Chemical Biology*, 7(11), 1858–1865. <https://doi.org/10.1021/cb300326z>

Wall, R. J., Moniz, S., Thomas, M. G., Norval, S., Ko, E.-J., Marco, M., Miles, T. J., Gilbert, I. H., Horn, D., Fairlamb, A. H., & Wyllie, S. (2018). Antitrypanosomal 8-hydroxy-naphthyridines are

chelators of divalent transition metals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00235-18>

Wallach, I., Bernard, D., Nguyen, K., Ho, G., Morrison, A., Stecula, A., Rosnik, A., O'Sullivan, A. M., Davtyan, A., Samudio, B., ... Heifets, A. (2024). AI is a viable alternative to high throughput screening: a 318-target study. *Scientific Reports*, 14(1), 7526. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54655-z>

Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E., & Englund, P. T. (2000). Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40174–40179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008405200>

Wohlwend, J., Corso, G., Passaro, S., Getz, N., Reveiz, M., Leidal, K., Swiderski, W., Atkinson, L., Portnoi, T., Chinn, I., ... Barzilay, R. (2024). Boltz-1: Democratizing biomolecular interaction modeling. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.11.19.624167>

Woodland, A., Thompson, S., Cleghorn, L. A. T., Norcross, N., De Rycker, M., Grimaldi, R., Hallyburton, I., Rao, B., Norval, S., Stojanovski, L., ... Gilbert, I. H. (2015). Discovery of inhibitors of *Trypanosoma brucei* by phenotypic screening of a focused protein kinase library. *ChemMedChem*, 10(11), 1809–1820. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500300>

Wyatt, P. G., Gilbert, I. H., Read, K. D., & Fairlamb, A. H. (2011). Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(10), 1275–1283. <https://doi.org/10.2174/156802611795429185>

Wyllie, S., Foth, B. J., Kelner, A., Sokolova, A. Y., Berriman, M., & Fairlamb, A. H. (2016). Nitroheterocyclic drug resistance mechanisms in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 625–634. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv376>

Zhang, J., Chung, T., & Oldenburg, K. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 4(2), 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>

Zheng, W., Thorne, N., & McKew, J. C. (2013). Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(21–22), 1067–1073. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.07.001>

Zimmermann, S., Hall, L., Riley, S., Sørensen, J., Amaro, R. E., & Schnauffer, A. (2016). A novel high-throughput activity assay for the *Trypanosoma brucei* editosome enzyme REL1 and other RNA ligases. *Nucleic Acids Research*, 44(3), e24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv938>