

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Imunologie



Bc. Klára Pospíšilová

Využití specifických inhibitorů CAIX pro
fluorescenční značení rakovinných buněk

Utilization of CAIX specific inhibitors for
fluorescence labeling of cancer cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Maloy Řezáčová, Ph.D.

Laboratoř strukturní biologie ÚOCHB AV ČR, v. v. i.

Praha 2016

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

V Praze dne 30. 4. 2016

Poděkování:

Tato práce byla vypracována v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.

Především bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D., za skvělé vedení práce, trpělivý a vlídný. Dík patří celému kolektivu Laboratoře strukturní biologie za podporu a přátelskou atmosféru.

Dále děkuji doc. Jiřímu Bryndovi, CSc., Ing. Ireně Sieglové, RNDr. Vlastimilu Královi, Mgr. Tomáši Knedlíkovi, Ph.D., RNDr. Milanu Fabrymu, Ph.D., Mgr. Janě Dvořanové Štěpánkové, Ph.D., Mgr. Janě Škerlové, Ph.D. a Ing. Michaelu Kuglerovi za veškerou pomoc.

Hlavní dík patří mému manželovi Pavlovi, dcerám Lucii, Zuzaně a celé rodině za pochopení a podporu během studia. Zvláštní poděkování patří mé sestře RNDr. Martině Roeselové, Ph.D., která mně celý svůj život byla velkým vzorem a velkou oporou.

ABSTRAKT

Lidské karbonátlyázy jsou metaloenzymy, které se účastní mnoha fyziologických pochodů v organismu, ale hrají také roli v patogenezi řady chorob. Karbonátlyáza IX (CAIX) se, na rozdíl od ostatních 14 izoenzymů lidských karbonátlyáz, za normálních podmínek vyskytuje v organismu jen v omezené míře, avšak v hypoxických nádorech je vysoce exprimovaným znakem na povrchu buněk. Z tohoto důvodu je tento enzym dobrým cílem pro terapii a diagnostiku nádorů, a proto jsou proti CAIX vyvíjeny různé monoklonální protilátky i specifické inhibitory.

V této práci byla ověřována možnost využít polymerní konjugát nesoucí specifický inhibitor CAIX ke fluorescenčnímu značení rakovinných buněk. Prostřednictvím průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie byla testována specifická vazba polymerního konjugátu na různých buněčných liniích a schopnost vazby tohoto polymerního konjugátu byla srovnávána s CAIX specifickou monoklonální protilátkou M75 a jejím jednořetězcovým fragmentem scFv M75.

Dále byly zjišťovány schopnosti testovaného konjugátu inhibovat enzymovou aktivitu CAIX. Pro tyto experimenty byl připraven a purifikován rekombinantní protein CAII, který byl dále též využit pro účely proteinové krystalizace. Testy inhibičních aktivit rovněž umožnily vytipovat nové inhibitory CAIX, které by mohly být díky lepším inhibičním vlastnostem využity pro vznik dalších účinnějších polymerních konjugátů. Úspěšné krystalizační pokusy a následná RTG strukturní analýza poskytly strukturní informaci o vazbě vybraných inhibitorů do aktivního místa CAII. Na základě těchto struktur bylo možné navrhnout vhodné místo pro připojení ke kopolymeru pro budoucí vývoj polymerních konjugátů druhé generace.

Klíčová slova: karbonátlyáza IX, inhibitory CAIX, nádorové onemocnění, polymerní konjugáty

ABSTRACT

Human carbonic anhydrases are metalloenzymes that are involved in many physiological processes in the body, but also play an important role in the pathogenesis of numerous diseases. Under regular conditions, expression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is very limited, unlike that of other 14 human carbonic anhydrase isozymes. But in hypoxic tumors this enzyme is highly overexpressed on the cell surface. For this reason, this enzyme represents a good target for therapy and diagnosis of tumors and thus various anti-CAIX monoclonal antibodies and specific inhibitors are being developed.

In this work we investigated the possibility to use fluorescent polymer conjugate carrying a CAIX specific inhibitor for fluorescent labeling of tumor cells. Specific binding of polymer conjugate to different cell lines was investigated by flow cytometry and confocal microscopy. Binding properties of the polymer conjugate was compared to CAIX specific monoclonal antibody M75 and its single-chain fragment scFv M75.

Ability of the polymer conjugate to inhibit CAIX enzyme activity was also investigated. For these experiments, recombinant protein CAII was prepared and purified, which was also used for protein crystallization. Tests of inhibitory activities allowed to identify novel inhibitors CAIX with better inhibitory properties, which could be used for the preparation of more efficient polymer conjugates. Successful crystallization experiments and subsequent X-ray structure analyses provided structural information about the binding of selected inhibitors to the CAII active site. Based on these structures, it was possible to design a suitable position for connection to the copolymer for the future development of the second generation polymer conjugates.

Keywords: carbonic anhydrase IX (CAIX), inhibitors CAIX, tumors, polymer conjugates

Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK	9
2. ÚVOD.....	11
3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	11
3.1. Lidské karbonátlyázy	11
3.2. Karbonátlyáza II	13
3.2.1. Fyziologický výskyt a funkce.....	13
3.2.2. Struktura.....	13
3.3. Karbonátlyáza IX.....	14
3.3.1. Fyziologický výskyt a funkce.....	14
3.3.2. Struktura.....	15
3.3.3. CAIX funkce v nádorech	17
3.4. CAIX jako cíl v terapii a diagnostice nádorů.....	19
3.5. Možnosti terapeutického zásahu CAIX.....	19
3.5.1. Specifické protilátky proti CAIX.....	20
3.5.2. Inhibitory CAIX	24
3.6. Cíl práce.....	30
4. MATERIÁL	31
4.1. Chemikálie	31
4.2. Expresní plazmidy a bakteriální kmeny	33
4.3. Protilátky a syntetické oligonukleotidy.....	33
4.4. Buněčné kultury.....	33
4.5. Použitá média a pufry	33
4.6. Ostatní materiál	34
4.7. Přístroje.....	36
5. METODY	38
5.1. Příprava CAII	38
5.1.1. Rekombinatní exprese.....	38
5.1.2. Izolace proteinu	39
5.1.3. Purifikace CAII afinitní chromatografií na sulfonamidové koloně.....	39
5.1.4. Kontrola čistoty proteinu pomocí SDS-PAGE	40
5.1.5. Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance	41
5.1.6. Dialýza a ultrafiltrace.....	42
5.2. Testování inhibiční aktivity a vazby inhibitoru	42

5.2.1.	Měření inhibice enzymové aktivity CA	43
5.2.2.	Příprava krystalu pro RTG studie	44
5.2.3.	Snímání difrakčních dat a určení trojrozměrné struktury	44
5.3.	Testování vazby značeného inhibitoru na buněčných kulturách	44
5.3.1.	Průtoková cytometrie.....	45
5.3.2.	Konfokální mikroskopie.....	46
6.	VÝSLEDKY	48
6.1.	Příprava rekombinantní CAII	48
6.1.1.	Exprese rekombinantní CAII.....	48
6.1.2.	Purifikace a příprava vzorku pro krystalizaci	49
6.2.	Vazba polymerního konjugátu U28 na CAIX	51
6.2.1.	Inhibiční účinek polymerního konjugátu U28	51
6.2.2.	Vazba polymerního konjugátu U28 na CAIX v buněčných kulturách	52
6.3.	Testování inhibiční aktivity a vazby inhibitorů CB23 a FD4	59
6.3.1.	Příprava krystalů komplexu CAII.....	60
7.	DISKUZE	65
8.	ZÁVĚR.....	67
9.	SEZNAM LITERATURY.....	69
10.	PŘÍLOHA 1	80

1. SEZNAM ZKRATEK

- $A_{280\text{nm}}$ absorbance při vlnové délce 280 nm
- $A_{550\text{nm}}$ absorbance při vlnové délce 550 nm
- AA akrylamid
- AV ČR Akademie věd České republiky
- AZM acetazolamid
- BIS N,N'-metylen-bis(akrylamid)
- BL21 (DE3) kmen *E. coli* nesoucí profága λ DE3 s genem pro T7 RNA polymerázu
- C - myc epitop myši monoklonální protilátky klon 9E10
- CA karbonátlyáza
- DMEM Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium
- EcoR I restriční endonukleáza pocházející z bakteriálního druhu *E. coli*
- EDTA etylendiamintetraoctová kyselina
- ETG etyl- β -D-thiogalaktosid (analog IPTG)
- Fab antigen vazebný fragment (z angl. fragment antigen-binding)
- FBS fetal bovine serum
- Fc krystalizovatelný fragment (z angl. fragment crystallizable)
- FITC fluorescein isothiocyanát
- Fv variabilní fragment (z angl. fragment variable)
- GAM/FITC Goat Anti-Mouse
- His₅ histidinový pentapeptid
- IC intracelulární
- IPTG isopropyl- β -D-thiogalaktosid
- LacI represor (reprimující *lac* operátor)
- LB Luria-Bertani, typ média
- MM minimální médium
- ot./min. počet otáček za minutu

- PAGE diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- PBS Phosphate Buffered Saline
- PDB protein data bank
- pelB signální peptid pro transport proteinu do periplasmy *E. coli*
- PG peptidoglykanová kotva
- RCC renal cell carcinoma
- scFv single-chain variable fragment
- SDS dodecylsírán sodný
- SP signální peptid
- TEMED N, N, N',N'-tetramethylethylendiamin
- TM transmembránová
- TRIS tris(hydroxymethyl)aminomethan
- ÚOCHB AV ČR Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR
- ÚMG AV ČR Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR
- ÚMCH AV ČR Ústav makromolekulární chemie Akademie věd ČR
- ÚACH AV ČR Ústav anorganické chemie Akademie věd ČR
- v. v. i. veřejná výzkumná instituce
- v/v objemová procenta
- VH variable region of the heavy chain
- VL variable region of the light chain variable
- w/v hmotnostní procenta

2. ÚVOD

Karbonátlyázy (CA, z angl. carbonic anhydrase) jsou metaloenzymy, které katalyzují reverzibilní hydrataci oxidu uhličitého (CO_2) na hydrogenuhličitanový aniont (HCO_3^-) a proton (H^+). Patří mezi nejrychlejší enzymy na světě, vyvinuly se konvergentní evolucí a vyskytují se téměř u všech organismů, od archeí a prokaryot, přes rostlinnou říši až po člověka. CA dělíme do pěti tříd: α , β , γ , δ , ϵ , přičemž mezi jednotlivými třídami nacházíme značné rozdíly v okolí aktivního místa, a to jak sekvenční, tak v prostorovém uspořádání, ale samotné místo katalýzy, reakce přeměny $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, zůstává velmi konzervované. CA se u jednotlivých organismů podílejí na mnoha fyziologických funkcích.

U člověka nacházíme CA třídy α a v současné době je známo 15 izoenzymů CA, přičemž 13 z nich je aktivních. Jednotlivé izoenzymy se účastní mnoha důležitých pochodů v organismu, ke kterým patří například udržení acidobazické rovnováhy, sekrece elektrolytů, dýchání, urogeneze, glukoneogeneze a mnoho dalších. Tato funkční pestrost se odráží v širokém výskytu lidských CA v lidském těle, v orgánové i buněčné lokalizaci.

Karbonátlyázy jsou vzhledem ke svému častému výskytu a bohatému zapojení v různých pochodech, ať již fyziologických, či v patologických, středem zájmu jako terapeutické cíle v různých patologiích. CAIX, o které pojednává tato práce, je jedním ze znaků nádorových buněk u rychle rostoucích hypoxických nádorů, a to ji činí velice vhodným cílem pro diagnostiku a případnou terapii určitých typů nádorů.

3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

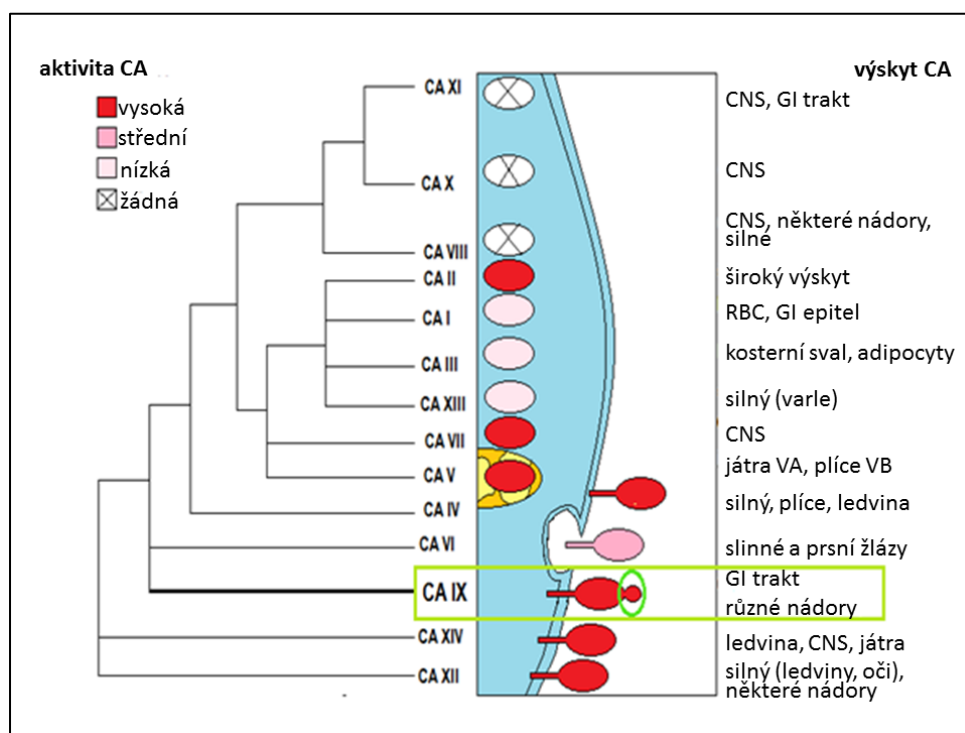
3.1. Lidské karbonátlyázy

Karbonátlyázy byly poprvé popsány v roce 1933 v lidských erythrocytech [1] a postupně byla objevována další místa výskytu CA v lidském těle. Jak ukazuje obrázek 1, izoenzymy CA se nacházejí ve všech tkáních. Vyskytují se v dýchacím, trávicím, urogenitálním traktu, opěrné soustavě i v centrálním nervovém systému.

Buněčná lokalizace rozděluje lidské CA na cytoplazmatické (I, II, III, VII, VIII, X, XI, XIII), mitochondriální (V), membránové s extracelulární katalytickou doménou (IV, IX, XIV, XII) a jednu sekretovanou formu (VI).

Katalytická aktivita izoenzymů je různá, zcela katalyticky neaktivní jsou tři CA VIII, X a XI [2]. Jde o proteiny příbuzné CA tzv. CARPs (carbonic anhydrase related proteins), jejichž fyziologické funkce zatím nejsou zcela objasněné [2].

Fyziologické funkce aktivních izoenzymů jsou pestré. Usnadňují transport CO_2 a HCO_3^- mezi tkáněmi a plicemi, v některých tkáních a orgánech (oční čočka, ledviny, plíce) napomáhají sekreci elektrolytů, účastní se řady biosyntetických reakcí, hrají roli při kalcifikaci kostí [3].



Obrázek 1: Organová a buněčná lokalizace lidských CA

Obrázek shrnuje místa výskytu jednotlivých izoenzymů CA v organismu, jejich katalytickou aktivitu a buněčnou lokalizaci. Červeně jsou vysoce aktivní izoenzymy (CAII, IV, V, VII, IX, XII, XIV), fialově středně aktivní (CAVI), bíle nízké aktivní (CAI, III, XIII), bíle s přeškrtnutím neaktivní izoenzymy (CAVIII, X, XI). Buněčná lokalizace je schematicky znázorněna: sub celulórní lokalizace – mitochondrie (CAV), cytoplazmatická (CAI, II, III, V, VII, VIII, X, XI, XIII), cytoplazmatická s orientací extracelulárně (CAIV, IX, XII, XIV) a segregovaná vně buňky (CAVI). Na obrázku je schematicky znázorněna a zeleně zakroužkovaná peptidoglykanová doména (PG). Tato PG doména je pro CAIX jedinečná a uděluje jí specifické vlastnosti. GI – gastrointestinální trakt, RBC – erytrocyty
Obrázek převzat a upraven [4].

Kromě fyziologických funkcí izoenzymů CA v lidském těle je aberantní exprese enzymů spojena s řadou nemocí. Mezi ně patří glaukom (zvýšená exprese CAII a CAIV), otoky (CAII), sterilita (CAXIII), horská nemoc (CAII), obezita (CAV), hemolytická anémie (CAI) a

solidní nádory (CAIX) [5–7]. Tato účast na patologických procesech činí CA potencionálními diagnostickými či terapeutickými cíli. Inhibice CA se využívá například při léčbě glaukomu (inhibice izoformy CAII), epilepsie (CAVII), obezité a vysokém krevním tlaku [8].

V této diplomové práci jsou podrobně probírány dvě karbonátlyázy CAII a CAIX. U obou jsou však možnosti a potřeby inhibice značně odlišné. CAII je v organismu široce rozšířená a tak se při vývoji specifických inhibitorů pro CAIX používána jako tzv. „off-target“, tedy cíl, který by testovanou sloučeninou neměl být inhibován. Zároveň v této práci byla CAII použita jako model pro strukturní studie vazby inhibitorů do konzervovaného aktivního místa.

3.2. Karbonátlyáza II

3.2.1. Fyziologický výskyt a funkce

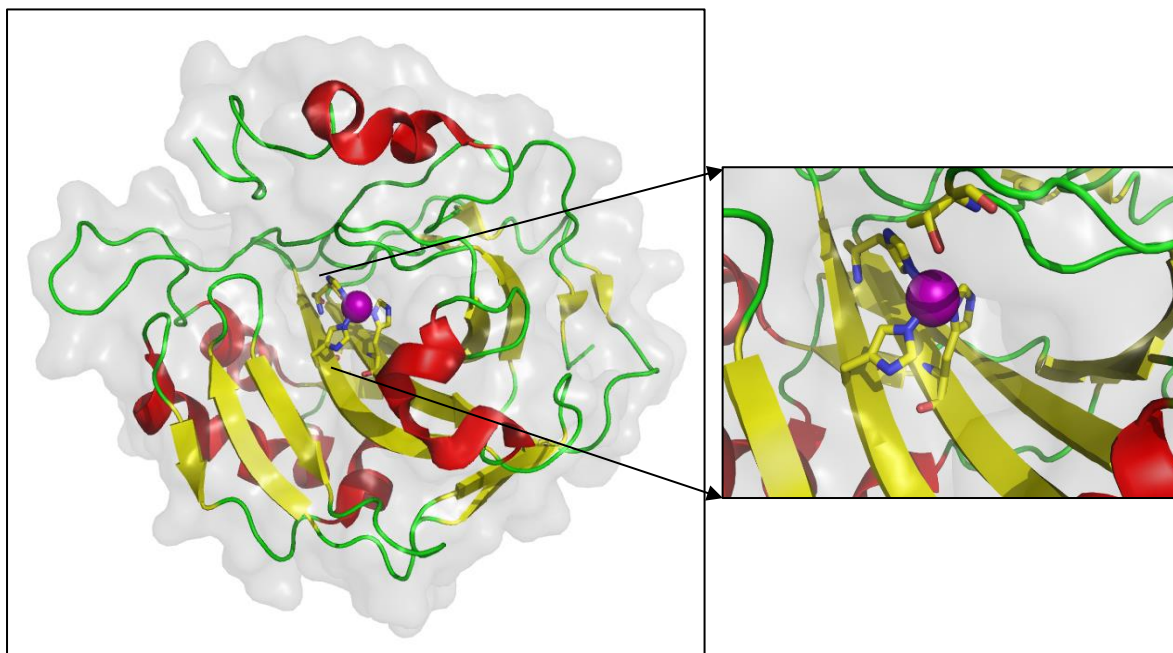
Lidská karbonátlyáza II (CAII) představuje nejrozšířenější karbonátlyázu v lidském těle. Je přítomná téměř v každé lidské tkáni a orgánu a zodpovídá tam za velkou řadu biologických funkcí. Nejvíce je obsažena v erytrocytech, ale nalezneme ji téměř ve všech orgánech gastrointestinálního traktu. Ve slinných a pankreatických žlázách ovlivňuje sekreci hydrogenuhličitanového aniontu [9], v buňkách sliznice jícnu chrání před nadměrnou acidifikací nebo před případným únikem žaludečních šťáv, vyskytuje se také v žaludku a tenkém i tlustém střevu [10]. Dále se vyskytuje v mozku, kde se účastní tvorby mozkomíšního moku [11]. V ledvinách se podílí na okyselení moči. Ve velké míře se také vyskytuje v plicních pneumocytech a kostních buňkách osteoklastech, kde hraje důležitou roli v hospodaření s vápníkem [12].

Vzhledem k širokému rozšíření představuje CAII skupinu lidských CA, kde je cílená inhibice nežádoucí. Jak již bylo zmíněno, slouží často jako „off-target“ izoforma, kdy jsou případné inhibitory CA cílené na jiné izoenzymy CA.

3.2.2. Struktura

CAII je protein tvořený 260 aminokyselinovými zbytky. Jde o cytoplazmatický protein. Katalytická doména obsahuje aktivní místo, které se nachází na spodní části prohlubně ve tvaru kužele s jednou stěnou tvořenou hydrofobními a druhou hydrofilními zbytky [13]. V centru aktivního místa se nachází zinečnatý ion, který je koordinován třemi histidiny His94, His96, His119. Přes síť vodíkových můstků interaguje zinečnatý iont dále s hydroxylovou skupinou

postranního řetězce aminokyselinového zbytku Thr199. Trojrozměrná struktura proteinu CAII je ukázána na obrázku 2.



Obrázek 2: Trojrozměrná struktura CAII

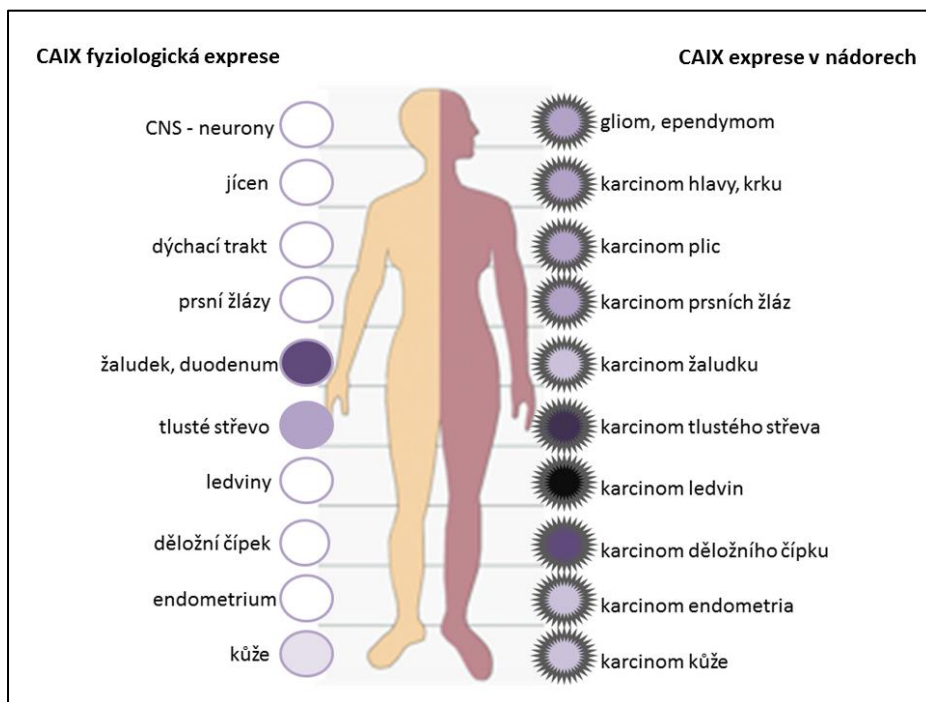
Celkový pohled na strukturu CAII ukazuje průběh hlavního řetězce, prvky sekundární struktury a detail aktivního místa. β skládané listy jsou obarveny žlutě, α helixy červeně, zeleně obarvené jsou oblasti bez pravidelné struktury (smyčky). Uprostřed je znázorněn Zn^{2+} (fialová kulička) koordinovaný třemi histidinovými zbytky (His94, His96, His119, atomy uhlíků žlutě, dusíky modře, kyslíky červeně), v detailu aktivního místa (pravá část obrázku) je znázorněn i Thr199. Vodě přístupný povrch proteinu je naznačen v pozadí. Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. [14], souřadnice krystalových struktur 4MDG [15] byly získány z databáze proteinových struktur PDB [16].

3.3. Karbonátlyáza IX

3.3.1. Fyziologický výskyt a funkce

Lidská karbonátlyáza IX (CAIX), dříve nazývaná MN protein objevený týmem Dr. Jana Závady [17], se za normálních podmínek v organismu vyskytuje ve větší míře pouze ve sliznici žaludku, kde se účastní tvorby žaludečních šťáv [18]. S distálním postupem trávicí trubice míra exprese karbonátlyázy v gastrointestinálním traktu klesá. V menší míře se CAIX nachází ve sliznici žlučových. Malé množství CAIX je ve sliznici střeva v rychle proliferujících buňkách v oblasti krypt [19], zde se uplatňuje adhezivní vlastnost molekuly. Minimální hladiny se dále nacházejí ještě v epitelu pankreatického vývodu [20], duktech mužských pohlavních orgánů, kde se CAIX účastní tvorby testikulární tekutiny, a v epitelálních buňkách vystylajících tělní dutiny [21]. Zatímco fyziologický výskyt CAIX je značně omezen, při nádorovém bujení často dochází k hyper-expresi (jak bude dále popsáno v kapitole 3.3.3).

Obrázek 3 porovnává expresi CAIX v jednotlivých tkáních za fyziologických podmínek se stavem exprese tohoto znaku v nádoru.



Obrázek 3: Distribuce CAIX v tkáních a nádorech

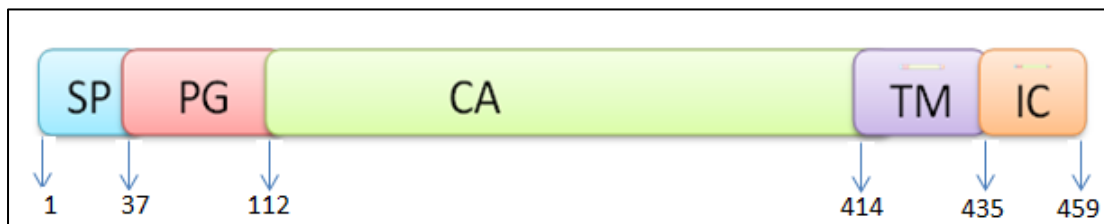
Levá strana obrázku ukazuje fyziologický výskyt CAIX v tkáních lidského těla, pravá pak výskyt v nádorech. Většina normálních tkání neobsahuje CAIX. Silnou expresi vykazuje žaludeční a duodenální sliznice. V nádorech je exprese CAIX většinou ektopická, nejsilnější exprese CAIX nádorových buněk je u karcinomu ledvin a o něco slabší u tlustého střeva. Bílá výplň – místa bez exprese CAIX, světle fialová až tmavě fialová výplň znázorňuje různý stupeň exprese v jednotlivých tkáních. Černá výplň nejsilnější exprese CAIX. *Obrázek převzat a upraven [4].*

3.3.2. Struktura

CAIX membránový protein je tvořen 459 aminokyselinovými zbytky. Protein je uspořádán do homodimeru, což umožňuje jednak kovalentní propojení přes disulfidické můstky mezi sousedními Cys137 a dále stabilizace interakcemi mezi oblastmi hydrofobních reziduí jednotlivých monomerů [22, 23].

Lidská CAIX se skládá z 37 aminokyselinových zbytků dlouhého signálního peptidu (SP), který je odštěpen během post translační modifikace, následuje 75 aminokyselinových zbytků tvořících extracelulární N-terminální proteoglykanovou doménu (PG), zcela unikátní pro lidskou CAIX izoformu. Extracelulární katalytická doména (CA) dlouhá 302 aminokyselinových zbytků je propojena 21 aminokyselinovými zbytky dlouhým transmembránovým segmentem (TM) s krátkým C-terminálním intracelulárním úsekem (IC).

Uspořádání jednotlivých domén proteinu vidíme na obrázku 4 a model trojrozměrné struktury dimeru lidské CAIX je na obrázku 5.

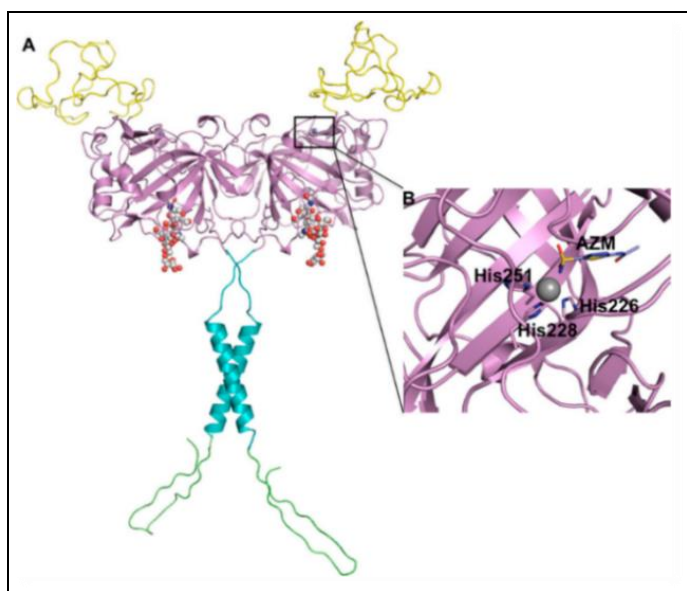


Obrázek 4: CAIX uspořádání domén

Na obrázku je schematicky znázorněno uspořádání domén CAIX. SP – signální peptid (aminokyselinové zbytky 1-37), PG – proteoglykanová doména (aminokyselinové zbytky 38–112), CA – katalytická doména (aminokyselinové zbytky 113–414), TM – trans membránová doména (aminokyselinové zbytky 415–435), IC – intracelulární úsek (aminokyselinové zbytky 436–459).

Katalytická doména proteinu vykazuje velkou strukturní homologii α tříd CA. V centru aktivního místa se nachází zinečnatý ion, který je koordinován třemi histidiny, tentokrát jde o His226, His228, His251. Pro tuto doménu byla určena krystalová struktura [23].

Přítomnost PG domény je pro CAIX zcela unikátní ve srovnání s ostatními izoformami CA a předpokládá se její podíl na buněčné adhezivitě a na udržení katalytické aktivity v kyselém nádorovém prostředí [24].



Obrázek 5: Struktura dimeru CAIX

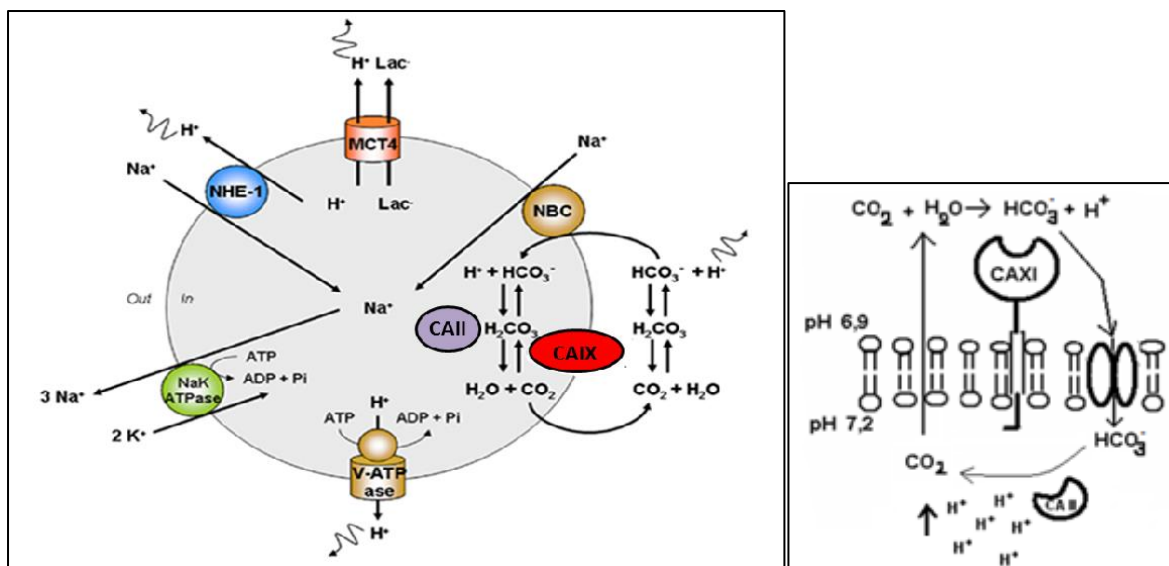
Na obrázku A je PG doména znázorněna žlutě, TM doména modře, CA doména růžově a IC doména zeleně. Pro CA doménu byla vyřešena krystalová struktura, struktura ostatních částí byla namodelována. Červené body jsou místa glykosylace proteinu. B na pravé straně obrázku je detail aktivního místa proteinu, tři histidinové aminokyselinové zbytky His 226, 228, 251 koordinují zinečnatý iont a klasický inhibitor CA acetazolamid (AZM) vytěšňuje $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ z vazby na Zn^{2+} . Obrázek převzat z [24].

3.3.3. CAIX funkce v nádorech

Jak již bylo zmíněno, fyziologický výskyt CAIX na buňkách je značně omezený, zatímco zvýšená exprese CAIX v solidních nádorech velmi častá. Enzym je na povrchu nádorových buněk často nadměrně exprimován, a to i na původně CAIX negativních buňkách (obrázek 3). Hypoxický stres indukuje přechod metabolismu od oxidativní fosforylace v mitochondriích k anaerobní glykolýze v cytosolu. Tato změna metabolismu pak v nádorových buňkách zůstává bez ohledu na množství přítomného O_2 (tzv. Warburgův efekt) a i při dostatečné kyslíkové saturaci je většina glukózy stále převáděna na laktát. Vzrůstající množství laktátu následně ještě více prohlubuje acidózu mikroprostředí [25, 26]. Zvýšený metabolismus rakovinných buněk a nedostatečné cévní zásobení rychle proliferujících nádorových buněk vede k hromadění kyselých produktů, ke kyslíkovému deficitu a poklesu extracelulárního pH.

K aktivaci genové exprese CAIX dochází za podmínek zvýšené hustoty nádorových buněk a vzrůstající hypoxie, kdy se aktivuje hypoxií indukovaný faktor (HIF, z angl. hypoxie inducible factor), klíčový regulátor buněčné odpovědi na hypoxii. HIF je spojen s aktivací hypoxií indukovaných genů, jako je HRE (z angl. hypoxie responsible factor). HRE je lokalizovaný v promotoru CAIX a po jeho aktivaci dochází k zvýšení exprese tohoto znaku [27].

Nejdůležitější role CAIX v nádorech je pH regulace. Rychlý metabolismus v nádorové buňce vytváří velké množství protonů. Pro udržení vnitrobuněčného pH kolem hodnoty 7,4 je nutné neustále pufrovat kyselé vnitřní prostředí. Proti snižování intracelulárního pH existuje několik možných mechanismů (obrázek 6). V nádorové buňce tuto funkci zastává hlavně CAIX. Vně buňky katalyzuje přeměnu CO_2 na kyselinu uhličitou (H_2CO_3). Proton, který následně disociuje, zůstává extracelulárně. Hydrogenuhličitán je transportován zpět do buňky pomocí Na^+ , HCO_3^- kotransporteru (NBC), kde za katalýzy CAII vyvazuje kyselý proton. Vzniklé produkty (H_2O a CO_2) projdou z buňky a celý cyklus se může opakovat.



Obrázek 6: Funkce CAIX a hlavní buněčné dráhy zapojené do buněčného transportu protonů

Vysoký obrat glykolýzy v nádorové buňce vyžaduje zvýšený transport protonů z buňky. Monokarboxylový transportér 4 (MCT4) je pasivní laktát (Lac^-) – proton (H^+) symporter přizpůsobený pro export protonů. CO_2 difunduje z buňky a pomocí CAIX je hydratován na kyselinu uhličitou (H_2CO_3). Proton zůstává extracelulárně, zatímco hydrogenuhličitán může být transportován spolu se sodným iontem zpět do buňky pomocí $\text{Na}^+, \text{HCO}_3^-$ kotransporteru (NBC) a intracelulárně opět navázat další proton. V-ATPázy mohou v nádorových buňkách působit jako protonové čerpadlo poháněné ATP. Sodík-proton výměníku 1 (NHE1) je pasivní antiporter Na^+/H^+ . Sodík-draslík (Na^+K^+) ATPáza exportuje sodné kationty, které by se jinak hromadily jako důsledek aktivit NHE1, NBC. Anorganický fosfát je označen Pi. V pravé části obrázku je v detailu schematicky znázorněna činnost enzymu CAIX. Obrázek upraven a převzat z [28].

Jak je patrné z obrázku 6, vlivem CAIX intracelulární pH stoupá, a naopak extracelulární pH klesá. Nahromaděné protony vně buňky přispívají k narušení mikroprostředí nádoru. Zvýšení acidity indukuje genovou nestabilitu, podílí se na oslabování buněčných adhezí, což následně podporuje invazivní chování nádoru. Také z tohoto důvodu patří nádory s pozitivní expresí CAIX k těm se špatnou prognózou [29–31].

Kromě regulace pH se CAIX díky své proteoglykanové doméně podílí i na mezibuněčné adhezi. Kompetitivně interaguje s E catherinem, čímž destabilizuje buněčné kontakty zprostředkované touto molekulou. Napomáhá tak narušovat okolí nádoru a dalšími heterofilními interakcemi dále podporuje migraci nádorových buněk [32, 33].

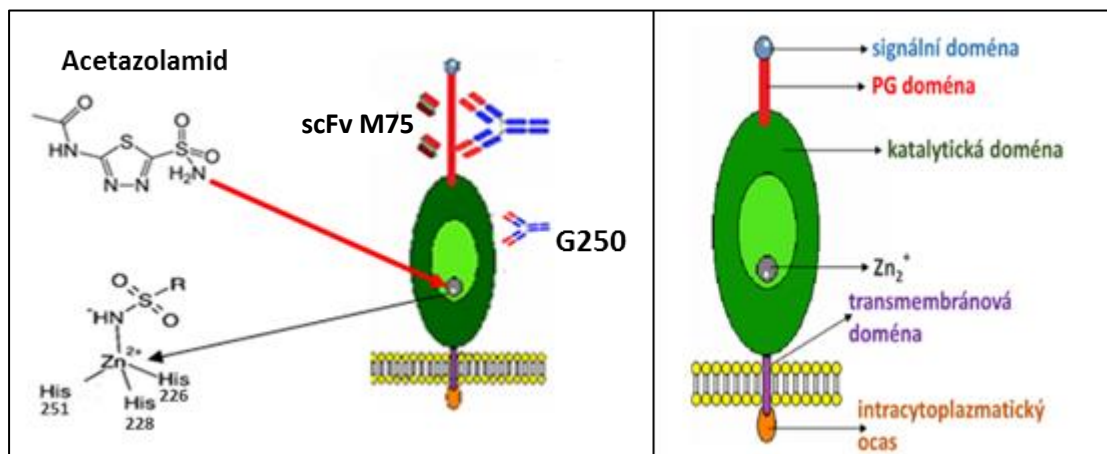
Obě popsané funkce CAIX v rakovinné buňce ovlivňují existenci a propagaci nádoru a dávají tak prostor k vývoji nových terapeutických postupů cílených na inhibici funkce CAIX.

3.4. CAIX jako cíl v terapii a diagnostice nádorů

Jak již bylo řečeno, je CAIX nadějným znakem pro zlepšení diagnostických i léčebných přístupů v onkologii. CAIX pozitivní nádory špatně reagují na běžnou protinádorovou terapii. Po léčbě dochází opakovaně k relapsům onemocnění a nádory také obvykle metastazují [34–36]. Expresi CAIX indukuje nádorová hypoxie, a tak tento protein slouží jednak jako znak hypoxie a současně i prognostický faktor některých lidských karcinomů. CAIX pozitivita znamená špatnou prognózu u karcinomu plic, prsu, děložního čípku, mozku a nádorů ledvin a rakoviny krku [37–42]. Nesporný vliv CAIX na agresivnější chování nádorů, hyperexprese v solidních nádorech a extracelulární lokalizace enzymu jsou dobrými argumenty pro využití tohoto znaku v diagnostice i terapii nádorů.

3.5. Možnosti terapeutického zásahu CAIX

Vzhledem k přítomnosti unikátní PG domény a lokalizaci vně buněk jsou u CAIX přístupná dvě možná místa zásahu (obrázek 7). V první řadě jde o aktivní místo v katalytické doméně enzymu, kdy je možno blokovat enzymatickou aktivitu, která má zásadní význam pro chování nádoru v hypoxickém prostředí a pro jeho další růst a progresi [30]. Druhou možností je blokování PG domény, která hraje roli zejména v metastatickém chování nádoru [4].



Obrázek 7: Místa možného zásahu na molekule CAIX

Na obrázku je schéma molekuly CAIX a její jednotlivé domény: signální, PG, katalytická, transmembránová (zanořená do fosfolipidové dvojvrstvy) a intracytoplazmatický ocas. Je zde také naznačena interakce protilátky M75 a jejího scFv fragmentu s PG doménou, protilátky G250 s katalytickou doménou. Červená šipka směřuje k místu interakce inhibitoru Acetazolamidu, na Zn²⁺, který je zobrazen jako šedivá kulička ve světlezeleném poli aktivního místa enzymu. Černá šipka ukazuje na schéma koordinace zinečnatého iontu třemi histidiny His226, His228, His251 a funkční skupinou sulfonamidu inhibitoru.

Z hlediska terapeutického zásahu jsou v současné době nejvíce studovány dva přístupy. Ovlivnění CAIX pomocí monoklonálních protilátek a dále vývoj nízkomolekulárních látek se schopností inhibice CAIX.

Většina z testovaných strategií se ukázala jako účinná *in vitro*, v myších modelech a řada z nich je testována v různých fázích klinických studií [4]. Nejúspěšnější se zatím jeví léčba minimální reziduální nemoci u pacientů s rakovinou ledvin po nádorové nefrektomii pomocí protilátky G250 [43].

3.5.1. Specifické protilátky proti CAIX

Dvě dlouhou dobu známé specifické protilátky proti CAIX antigenu byly v průběhu několika let vyvinuty nezávisle na sobě v rámci zdánlivě nesouvisejících výzkumů. Jako první vznikla v 80. letech minulého století specifická protilátka mG250 proti proteinu exprimovanému buňkami karcinomu ledvin označenému G250. O dvacet let později byl antigen G250 molekulárně definován jako transmembránový protein shodný s tumor asociovaným antigenem MN/CAIX, který byl popsán v lidské prsní nádorové buněčné linii v roce 1992 kolektivem Dr. J. Závady, za použití monoklonální protilátky M75 [17].

V současné době bylo vyvinuto několik dalších protilátek proti rozpoznávajících různých epitopů na CAIX [44–46].

Existuje několik možných alternativ, jak prostřednictvím monoklonálních protilátek proti CAIX působit na nádor. Přímá vazba monoklonální protilátky na antigen CAIX může vést k imunologické reakci známé jako protilátkami zprostředkovaná buněčná cytotoxicita (ADCC). Vazba protilátky by také mohla vést k internalizaci receptoru, a tím ke zprostředkování dodávky různých cytotoxických látek a radionuklidů do nádorové buňky. Dále se nabízí blokování funkce enzymu vazbou protilátky do katalytické domény či možnost znemožnění buněčné adheze vazbou na PG doménu enzymu.

3.5.1.1. Monoklonální protilátka G250

Protilátka G250 byla vytvořena proti buněčnému homogenátu z primární léze karcinomu ledvin (RCC, z angl. renal cell carcinoma) [47]. Touto protilátkou byl identifikován

antigen G250 na povrchu buněk karcinomu ledvin, a tak byl tento antigen dlouho považován za specifický pro RCC.

Protilátka interaguje s páteří katalytické domény celé molekuly CAIX. Bylo pozorováno, že její vazba nezasahuje do aktivního místa enzymu, a tak nedochází k její interakci s navázanými malými inhibitory CAIX. Tato skutečnost naznačuje, že by CAIX exprimující hypoxické nádory mohly být případně podrobeny působení protilátky G250 v kombinaci s inhibitory CAIX [48]. Vazba protilátky je konformačně závislá [49] a ,na rozdíl od protilátky M75, protilátka G250 váže pouze nativní antigen a používá se pouze v *in vivo* analýzách.

Tato protilátka byla nejvíce studována pro diagnostiku a terapii RCC. Vzhledem k vysoké specifitě u velké populace nemocných s renálním karcinomem je CAIX potenciálně nejvýznamnějším markerem pro dané onkologické onemocnění. Ve III. fázi klinické studie byla zkoumána léčba protilátkou G250 Girentuximab u pacientů s vysoce rizikovým, kompletně resekovaným RCC. Bylo prokázáno, že se stoupající hustotou antigenu CAIX na povrchu buněk účinnost protilátky stoupá [50]. Pokud se výsledky potvrdí, půjde o první úspěšnou systémovou léčbu snižující riziko návratu RCC alespoň u části pacientů [51].

Protilátka byla také vyvíjena pro diagnostické účely. Firmou WILEX byla pro identifikaci buněk karcinomu ledvin vyvinuta radioaktivně značená varianta protilátky Girentuximab (I^{124}), která již úspěšně dokončila registrační studii fáze III. Pomocí této protilátky použité při polohově emisní tomografii mohou být zobrazena drobná ložiska nádoru v postižené ledvině a poté lokalizována pomocí počítačové tomografie [52].

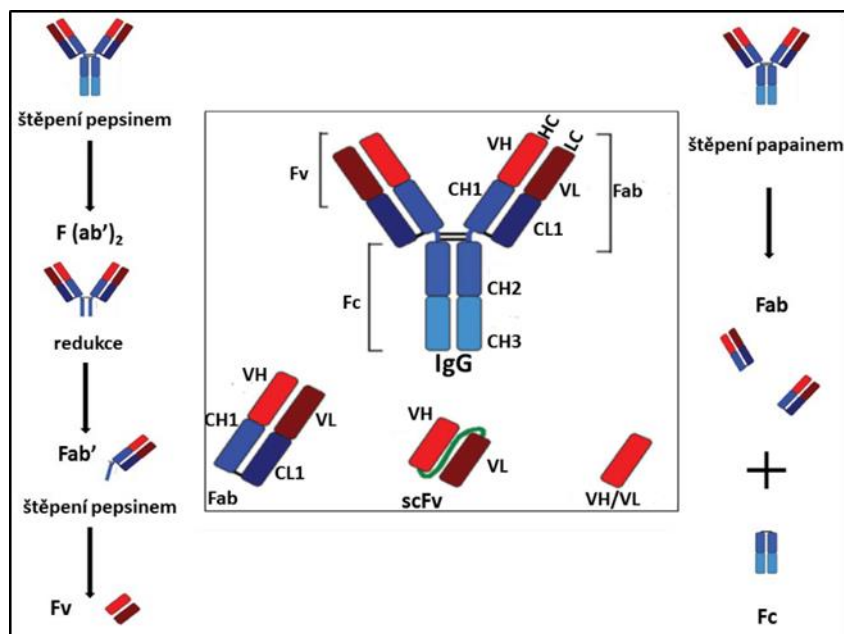
3.5.1.2. Monoklonální protilátka M75

Monoklonální protilátka M75 (IgG2b) byla vyvinuta proti antigenu hojně exprimovanému na buňkách lidské prsní nádorové linie [17], který byl následně charakterizován jako protein CAIX [18]. Protilátka M75 se váže na PG doménu proteinu N-koncového segmentu proteinu. PG doména nese negativní náboj, jelikož převážně obsahuje velké množství zbytků karboxylových aminokyselin. Tyto aminokyselinové zbytky se vyskytují v PG doméně opakovaně v rámci GEEDLP motivu [32]. Negativní náboj PG domény umožňuje snadnou disociaci komplexu od vazebného partnera CAIX již v oblasti slabě kyselého pH [53]. Tímto partnerem může být jednak dosud neznámý povrchový receptor, ale i monoklonální protilátka M75, jejíž epitopem je motiv GEEDLP. Interakci monoklonální protilátky M75 s adhezivním místem PG domény je zablokována adheze buněk [32].

Protilátka M75 se využívá jak v *in vivo*, tak k *in vitro* analýzám. Z *in vivo* analýz jde například o cílení hypoxických nádorových buněk ve zvířecích modelech [54]. K těmto účelům byl také vyvinut radioaktivně značený derivát protilátky [54, 55]. Protilátka M75 je ale považována za zlatý standard pro imunohistochemické analýzy, a to z důvodu, že opakující se motivy jejího epitopu spadají do lineárních oblastí antigenu a vazba protilátky tak není ovlivněna denaturací epitopu, na rozdíl od protilátky G250 [56, 57].

Od protilátky M75 byl odvozen jednořetězcový variabilní fragment scFv M75 (z angl. single-chain Fv fragment), který si zachovává vazebnou specificitu a aktivitu protilátky M75. Tento fragment byl použit pro strukturní studie osvětlující, jak protilátka M75 interaguje se s rozpoznávaným epitopem v PG doméně CAIX [58, 59]. Obecně je výhodou fragmentů protilátek jejich malá velikost, díky níž lépe pronikají do tkání či preparátů [60].

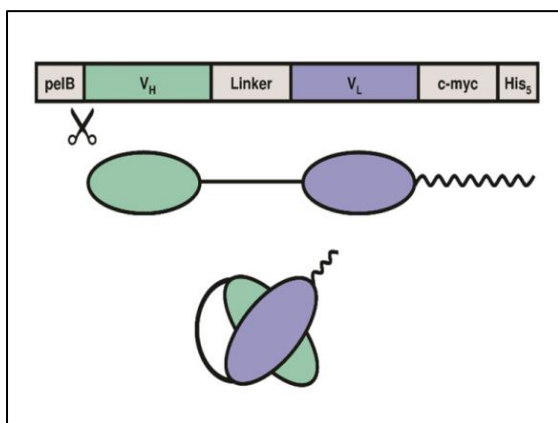
Protilátkový fragment Fv je složen z variabilních domén lehkého a těžkého řetězce a ve většině případů si zachovává schopnost vazby antigenu [61]. Fv fragment je možné připravit proteolytickým štěpením molekuly imunoglobulinu, jak je ukázáno na obrázku 8, ale tento postup má své limity. Jde například o malou stabilitu výsledného fragmentu či špatný přístup k místům proteolytického štěpení [62]. Rekombinantní technologie umožňují připravit nejmenší protilátkové fragmenty s větší stabilitou. Variabilní domény VH a VL jsou propojeny spojovacím segmentem [63], který je většinou tvořen aminokyselinovými zbytky glycinu a serinu. Tím je pro výsledný jednořetězcový fragment zaručena flexibilita spojovacího linkeru, rozpustnost i odolnost k proteolytickým enzymům [64], [65]. Do scFv konstruktů pro rekombinantní expresi lze též zakomponovat sekvence využitelné pro jeho čištění a detekci protilátkami.



Obrázek 8: Schéma imunoglobulinu IgG, fragmentů a štěpení IgG

Nahoře v centrální části obrázku je schematicky znázorněna celá molekula imunoglobulinu (IgG) s jednotlivě vyznačenými částmi, dole jsou typy fragmentů (Fab, scFv, VH/VL) imunoglobulinu. HC - těžký řetězec; LC - lehký řetězec; CH1,2,3 - konstantní těžké řetězce (různé odstíny modré); CL1 - konstantní lehký řetězec (tmavě modrá); Fv - variabilní fragment; Fc - krystalizující fragment; Fab - fragment vázající antigen; VH - variabilní těžký řetězec (světle červená); VL - variabilní lehký řetězec (tmavě červená); scFv - jednořetězcový variabilní fragment propojený spojovacím segmentem (zelená); VH - variabilní těžký řetězec; VL - variabilní lehký řetězec. Po stranách obrázku jsou jednoduchá schémata štěpení molekuly Ig: vlevo pepsinem na $F(ab')_2$ a Fc fragment (Fc není znázorněn), $F(ab')_2$ fragment lze následující redukcí rozdělit na jednořetězcový fragment Fab' a ten dalším štěpením pepsinem na nejmenší protilátkový fragment Fv. Na pravé straně je schéma štěpení IgG papainem na dva fragmenty Fab a Fc. *Obrázek převzat a upraven z [66].*

Jednořetězcový scFv fragment protilátky M75 byl připraven v laboratoři Strukturní biologie ÚMG AV ČR [67]. Schéma konstrukt protilátkového fragmentu scFv M75 je ukázáno na obrázku 9. Gen pro expresi scFv M75 obsahuje kódující sekvence pro variabilní domény těžkého a lehkého řetězce propojené sekvencí $(Gly_4Ser)_4$. Sekvence pelB na N-konci směřuje rekombinantní produkt do periplasmy bakteriálních buněk a je odštěpena při průchodu membránou. ScFv M75 má na C konci epitop c-myc, který je rozpoznáván myší monoklonální protilátkou klon 9E10 (Exbio), která je pro účely detekce konjugovaná např. s FITC nebo křenovou peroxidázou. C-koncová His₅ kotva (histidinový pentapeptid) slouží k purifikaci rekombinantního produktu pomocí chelatační chromatografie na niklové koloně, popřípadě lze i tuto sekvenci použít k detekci specifickou protilátkou.

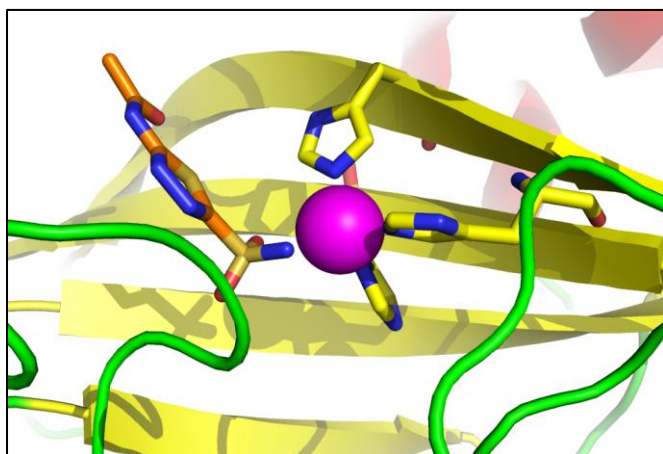


Obrázek 9: Konstrukt pro expresi scFv M75

Konstrukt scFv fragmentu protilátky M75 obsahuje (nahore z leva): pelB – signální peptid pro transport proteinu do periplasmy *E. coli*, V_H – variabilní lehký řetězec protilátky M75, linker – spojovací fragment, V_L – variabilních těžkého řetězce protilátky M75, c-myc – epitop rozpoznávaný myší monoklonální protilátkou konjugovanou s FITC a His₅ – histidinový pentapeptid, tzv. His₅-kotva, pro purifikaci vzorku chelatační chromatografi na niklové koloně.

3.5.2. Inhibitory CAIX

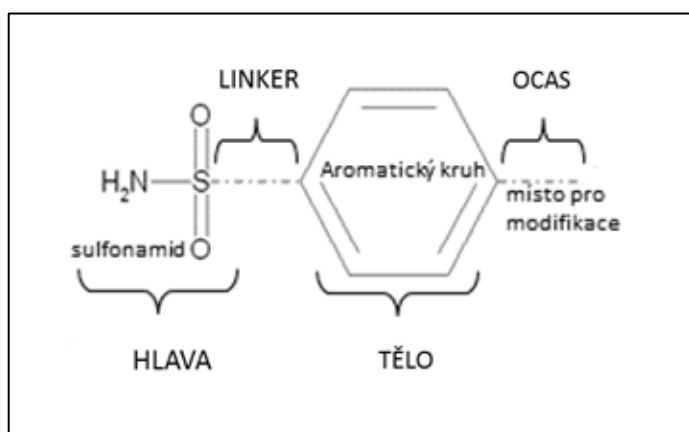
Inhibitory CA (CAI) jsou již mnoho let používány v léčbě glaukomu (inhibice izoforem CAII, CAIV, CAXII), vysokého tlaku (CAII, CAVII, CAXIV) a obezity (CAVa a CAVb) [68]. Mezi první úspěšně používané CAI patří acetazolamid (obrázek 10) působící jako antiglaukomatikum a diuretikum. Obsahuje sulfonamid, který interaguje s Zn²⁺ v aktivním místě CA, a tím znemožňuje konverzi substrátu (CO₂, obrázek 10) [69, 70].



Obrázek 10: Detail vazby inhibitoru acetazolamidu v aktivním místě CAII

Uprostřed obrázku je znázorněn kation Zn²⁺ (fialová kulička), koordinovaný třemi zbytky His94, His96 a His119 (atomy uhlíků žlutě, dusíky modře, kyslíky červeně) a molekulou acetazolamidu (atomy uhlíku oranžově, atomy síry žlutě). β skládané listy jsou obarveny žlutě a α helixy červeně. Zeleně jsou obarvené oblasti bez pravidelné struktury (smyčky). Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. [14], souřadnice krystalových struktur 3HS4 [71] byly získány z databáze proteinových struktur PDB [16].

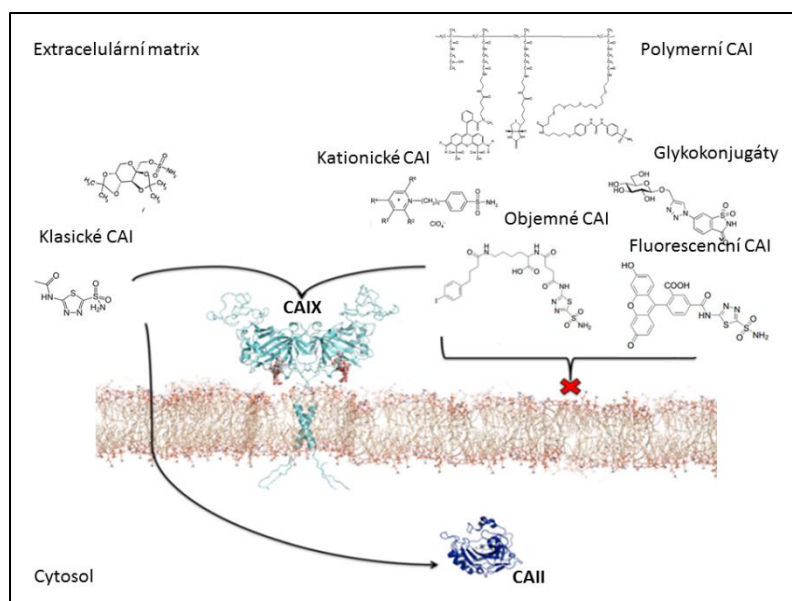
Sulfonamidy (obecný vzorec – RXSO_2NH_2) patří mezi nejvýznamnější a také nejpoužívanější inhibitory různých izoform CA. Obrazně řečeno jsou tyto inhibitory složeny z hlavy, těla a ocasu (obrázek 11). Hlavu sloučeniny tvoří sulfonamid, který je přes krátký linker (X) spojen nejčastěji s aromatickým či s arylovým jádrem, tělem inhibitoru (R). Další skupina, která tvoří ocas sloučeniny, pak slouží k modulaci a zlepšení vlastností inhibitoru [71].



Obrázek 11: Obecné schéma stavby inhibitorů odvozených od sulfonamidů

Hlavní inhibující sloučenina (sulfonamid) tvoří hlavu inhibitoru, následuje spojovací část (linker) napojený na tělo sloučeniny (aromatický kruh), poslední část tvoří ocas sloučeniny, který je variabilní částí sulfonamidových inhibitorů a slouží jako modifikační oblast.

Sulfonamidy a jejich deriváty (sulfamáty, sulfamidy) patří mezi klasické inhibitory CA, které nejsou příliš specifické a vykazují velké množství vedlejších účinků [6]. Jde o poměrně malé molekuly, které snadno projdou do dutiny aktivního místa a interagují s jeho konzervovanými strukturami. Okolní aminokyselinové zbytky, které jsou pro jednotlivé izoenzymy specifické, nejsou do interakcí zapojeny [24]. Cesta k vytvoření vysoce selektivních inhibitorů vede přes návrhy mnoha sloučenin, které jsou postupně testovány a poté modifikovány, aby získaly co nejlepší inhibiční vlastnosti. Sloučeninám, které vykazují dobré inhibiční aktivity, ale malou selektivitu, jsou navrhovány takové substituenty, které mohou vytvářet nové interakce ve štěrbině katalytické domény, s různými hydrofobními a hydrofilními strukturami, které jsou specifické pro každou izoformu CA [72].



Obrázek 12: Klasické inhibitory CA v porovnání s inhibitory CA navrženými pro cílení CAIX
 Porovnání chování klasických inhibitorů (levá strana obrázku nahoře acetazolamid, dole topiramát) s jejich modifikacemi (pravá strana), které zajistí nepostupnost inhibitoru do buňky. Mohou to být deriváty inhibitorů s objemnou chemickou skupinou (albumin-acetazolamid), fluorescenčně značené sulfonamidy, kationtové deriváty sulfonamidů a sulfonamidy se sacharidovým přívěškem nebo také a polymerní konjugáty inhibitorů. Zatímco malá molekula acetazolamidu a topiramátu projde do buňky, kde mohou tyto nescifická inhibitory reagovat i s nežádoucím cílem, jako je CAII, objemný konjugát inhibitoru do buňky neprojde a stává se tak specifitější k extracelulárně umístěné CAIX. *Obrázek převzat a upraven [24].*

Snaha zacílit inhibici na určitý izoenzym, jako je v případě nádorového onemocnění právě CAIX, vede k různým modifikacím stávajících inhibujících sloučenin a také k intenzivnímu vývoji nových, vysoce specifických látek (obrázek 12).

Velký potenciál má spojení inhibitorů CAIX a polymerních konjugátů, které lze díky jejich široké variabilitě použít na četné spektrum biomedicínských aplikací. Taková multivalentní syntetická makromolekula, jakou je polymer, může sloužit jako nosič pro různé nízkomolekulární sloučeniny, reaktivní skupiny, zobrazovací sondy, bílkoviny, oligonukleotidy i terapeutika a další ligandy [73]. Právě tato diplomová práce zkoumá možnost modifikace klasických CAI pomocí polymerů, tak aby bylo dosaženo specifické inhibice nádorové CAIX.

Tento princip byl nejprve ověřen na dobře dostupném inhibitoru JS-570, který nevykazuje velkou selektivitu vůči CAIX, ale tuto selektivitu zajistí polymer, který zabrání prostupu do buňky a interakci s intracelulárními CA izoformami.

Paralelně byly pro následné studie vytipovány další dva strukturně odlišné inhibitory s vyšší afinitou vůči CAIX: látka FD4 odvozená od heteroaryl-N-karbonylbenzenesulfonamidů a látka CB23 sulfonamidový derivát karboranu. V rámci této diplomové práce byly připraveny

krystaly komplexů těchto sloučenin s CAII pro následné strukturní studie. Tyto ukázaly, jakým způsobem se inhibitory vážou do aktivního místa, a kde by bylo možné je modifikovat připojením na polymer pro vývoj druhé generace polymerních konjugátů.

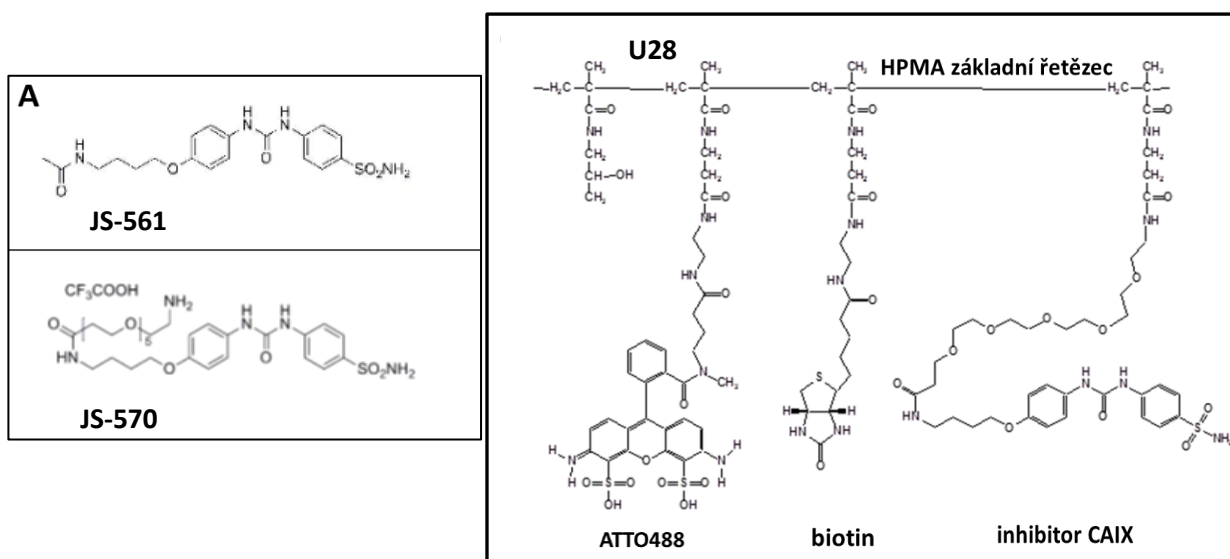
Jednotlivé inhibitory používané v této diplomové práci jsou popsány v následujících kapitolách.

3.5.2.1. Polymerní konjugát U28

Biologicky kompatibilní kopolymer cílicí na CAIX byl vyvinut v laboratoři doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc., na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR. Jako makromolekulární nosič je použit polymerní N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid. Na tento nosič jsou připojeny molekuly fluorescenční sondy (ATTO488) a afinitní kotvy (biotin) a taktéž specifické cílicí ligandy (tj. inhibitory CAIX)[74].

V této diplomové práci byl jako specifický ligand využit inhibitor CAIX (JS-561), který byl nejprve modifikován propojením inhibitoru s linkerem (JS-570) a posléze byl takto upravený inhibitor napojen na výše popsaný kopolymer do výsledného polymerního konjugátu (U28). Strukturní vzorce použitých sloučenin jsou ukázány na obrázku 13. Konjugát U28 se skládá z polymerního prekurzoru (85900 Da), přičemž na jednu molekulu prekurzoru připadá 33 molekul biotinu, 5 molekul ATTO488 a 15 molekul inhibitoru.

Jako negativní kontrola byl připraven i konjugát U23, který obsahuje pouze ATTO488 a biotin, ale postrádá molekuly inhibitoru CAIX.



Obrázek 13: Strukturní vzorec inhibitorů JS-561, JS-570 a polymerního konjugátu U28

A: strukturní vzorec inhibitoru JS-561, **B:** inhibitor s připojeným linkerem (JS-570), **obrázek C:** strukturní vzorec polymerního konjugátu (U28).

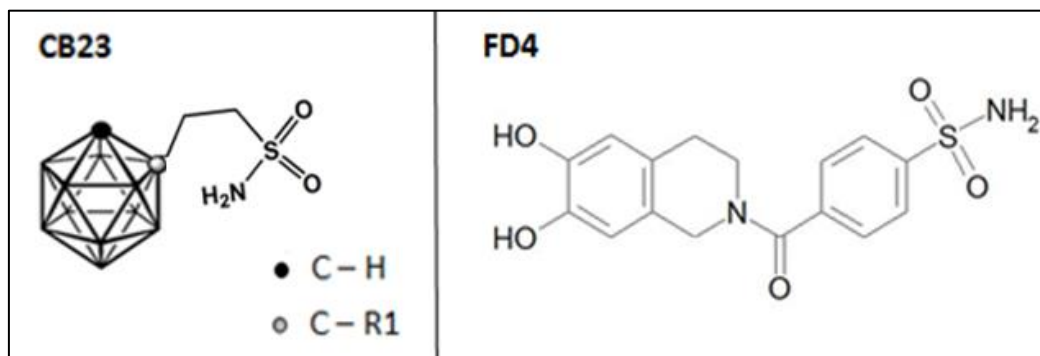
3.5.2.2. Inhibitory FD4 a CB23

Sloučenina FD4 patří k sulfonamidovým inhibitorům odvozených od heteroaryl-N-karbonylbenzenu.

Jak již bylo zmíněno, u nových inhibitorů odvozených od sulfonamidů či jejich derivátů dochází k modifikacím v místě tzv. ocasu molekuly. Také inhibitor FD4 patří k takovým testovaným derivátům. Základem této molekuly je stále sulfonamid, následuje benzenové jádro a jeho „ocasní“ modifikací tvoří substituovaný dihydroizochinolin. Strukturní vzorec této molekuly je ukázán na obrázku 14. Tato látka byla připravena v laboratoři Alba Chimirri (Univerzita Messina, Itálie) v rámci spolupráce se školicí laboratoří.

Inhibitor CB23 se svou strukturou odlišuje od běžných sulfonamidových inhibitorů. Sulfonamidová skupina je v tomto inhibitoru napojena přes krátký linker na dvacetistěnný útvar (karboran), složený z atomů bóru, uhlíku a vodíku. Karborany jsou objemné abiotické klastry, které se používají k nahrazení různých hydrofobních struktur v biologicky aktivních molekulách [75, 76]. Jde o biologicky dobře dostupné molekuly, *in vivo* jsou stabilní vůči katabolismu a degradaci enzymy [77]. Pro tuto třídu látek byl potvrzen inhibiční účinek na různé CA izoformy [78]. Specifické vlastnosti karboranů, mezi něž patří i možnost četných modifikací, umožňují v molekule inhibitoru nezařazovat další tzv. ocasní část a ovlivňovat tak

jejich specifitu k jednotlivým CA izoformám [78]. Strukturální vzorec molekuly inhibitoru CB23 je na obrázku 14. Tato látka byla připravena v laboratoři B. Grůnera (ÚACH AV ČR, Praha–Řež) v rámci spolupráce se školicí laboratoří.



Obrázek 14: Strukturální vzorec inhibitorů CB23 a FD4

Vlevo na obrázku je strukturální vzorec inhibitoru CB23. Inhibitor CB23 je sestaven z klastru o dvanácti vrcholech, linkeru a sulfonamidového zbytku. Klástr je složen z atomů bóru, uhlíku a vodíku (nejsoú zobrazeny). Klástr tvoří 10 atomů bóru a dva atomy uhlíku, jeden bez substituce (černý bod na špici klece), druhý uhlík se substituentem. Sulfonamidová skupina je na klástr napojena přes etylový linker. Celý chemický název tohoto inhibitoru je 1-sulfonamidethyl-1,2-closo-dikarbadodekaboran.

V pravé části obrázku je strukturální vzorec inhibitoru FD4, celý chemický název tohoto inhibitoru je 4-[(6,7- dihydroxy-3,4-dihydroisoquinolin- 2(1H)-yl) karbonyl] benzene sulfonamid.

3.6. Cíl práce

Tato práce je řešena v rámci dlouhodobého projektu školicí laboratoře, který je součástí společného projektu několika laboratoří. Dlouhodobým cílem tohoto projektu je vývoj inhibitorů karbonátlyázy IX, které by mohly být využitelné při terapii a diagnostice nádorových onemocnění. Konkrétní cíle této diplomové práce jsou uvedeny níže.

Cíle diplomové práce:

- zpracování literárního přehledu problematiky dostupného v literatuře
- příprava a purifikace rekombinantního proteinu CAII a jeho charakterizace
- ověření inhibičních vlastností polymerního inhibitoru karbonátlyázy IX
- ověření vazby polymerního inhibitoru na karbonátlyázu IX v buněčných kulturách
- porovnání vazby polymerního inhibitoru na karbonátlyázu IX s vazbou monoklonální protilátky M75 a jejího fragmentu scFv M75
- krystalizace nových selektivních inhibitorů v komplexu s CAII pro RTG studii
- návrh druhé generace polymerních inhibitorů na základě znalosti 3D struktury

4. MATERIÁL

4.1. Chemikálie

ACCUTASE	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Fluka, Švýcarsko
Albumin	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Biotika, Slovenská republika
Azid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, USA
BIS-TRIS	Serva, Německo
Bromfenolová modř	P - LAB
Citrát sodný	Sigma-Aldrich, USA
d-Biotin; $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	Merck, Česká republika
D-glukosa	Sigma-Aldrich, USA
D-Glukosa monohydrát	Lachema, Česká republika dusičnan
dihydrogenfosforečnan draselný; KH_2PO_4	Lachema, Česká republika
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Lachema, Česká republika
DMEM (kultivační médium)	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan stříbrný; AgNO_3	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Penta, Česká republika
Ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Lachema, Česká republika
FBS	Sigma-Aldrich, USA
Fenolčerveň	Lachema, Česká republika
Formaldehyd	Lachema, Česká republika
Glycerol; $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Penta, Česká republika
Glycin; $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
HOECHST 34580	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogefosforečnan sodný (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, USA

Chlorid kobaltnatý (dihydrát); $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Lachema, Česká republika
Chlorid manganatý; MnCl_2	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid měďnatý (dihydrát); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	P - LAB
Chlorid sodný; NaCl	Lachema, Česká republika
Chlorid vápenatý (dihydrát); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fluka, Švýcarsko
Chlorid zinečnatý; ZnCl_2	Fluka, Švýcarsko
Chlorid železitý (hexahydrát); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Lachema, Česká republika
IPTG	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina boritá; H_3BO_3	Lachema, Česká republika
Kyselina chlorovodíková; HCl	Lachema, Česká republika
Kyselina octová; CH_3COOH	Lachema, Česká republika
Kyselina sírová; H_2SO_4	Lachema, Česká republika
Lysozym	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Penta, Česká republika
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-metylen-bis(akrylamid) (BIS)	Fluka, Švýcarsko
PBS	Sigma-Aldrich, USA
Persíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Sigma-Aldrich, USA
Propidium jidid	Sigma-Aldrich, USA
Síran amonný; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Lachema, Česká republika
Síran hořečnatý; MgSO_4	Sigma-Aldrich, USA
Síran sodný (dekahydrát); $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Fluka, Švýcarsko
Síran zinečnatý; ZnSO_4	Sigma-Aldrich, USA
Thiamin	Sigma-Aldrich, USA
Thiosíran sodný; $\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3$	Sigma-Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
Uhličitan sodný; Na_2CO_3	Penta, Česká republika

4.2. Expresní plazmidy a bakteriální kmeny

Escherichia coli **BL21 (DE3)** (Novagen, USA) *E. coli* s DE3 profágem λ , nesoucím gen T7 RNA polymerasy pod transkripční kontrolou promotoru P_{lacUV5} ; postrádá membránovou proteasu OmpT a cytoplasmatickou proteasu lon; je uzpůsoben k expresi rekombinantních proteinů)

Plazmid pro expresi CAII byl laskavě poskytnut Dr. McKennou [79]

4.3. Protilátky a syntetické oligonukleotidy

Monoklonální protilátka M75 byla připraven ve školici laboratoři

GAM/FITC Goat anti Mouse IgG-FITC Jackson Laboratories (115-095-164)

Fragment scFvM75 byl připraven ve školici laboratoři [59]

anti-c-myc/FITC; klon 9E10 (Exbio Praha, Česká republika)

4.4. Buněčné kultury

HT29 linie lidského kolorektálního karcinomu [80]

NIH3T3 linie lidských fibroblastů [81]

C33 CAIX a C33 neo linie odvozené od lidské linie rakoviny děložního čípku [82]

4.5. Použitá média a pufry

Transformace plazmidovou DNA a rekombinantní exprese

LB (*Luria-Bertani*) médium: 10 mg/ml Bacto Trypton (Difco, USA); 5 mg/ml Yeast Extract (Difco, USA); 5 mg/ml chlorid sodný; pH 7,4 (nastaveno Tris bází)

Živný agar: 3,5% LB agar, selekční marker ampicilin (0,1 mg/ml mg/ml) a 1% glukosa

Minimální médium (MM): 7,6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 19mM Na_2HPO_4 ; 22mM KH_2PO_4 ; 8,6mM NaCl; 0,13mM Na_2SO_4 ; 0,17mM EDTA; 0,13mM MnCl_2 ; 18um FeCl_3 ; 4nM ZnCl_2 ; 0,6ul CuCl_2 ; 0,78ul CoCl_2 , 1,6mM HBO_3 ; 0,98mM MgSO_4 ; 0,3M CaCl_2 ; 4nM d-Biotin; 3,8mM tiamin

Izolace rozpustného proteinu

WI pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM NaCl, 5mM EDTA

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek

Elektrodový pufr: 20mM Tris-HCl, pH 8,3; 200mM glycin, 0,1% (w/v) SDS

Dělicí gel: 15% (w/v) AA (akrylamid) a BIS (bis-akrylamid) poměru BIS:AA 1:29; 375mM Tris pH 8,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný k iniciaci polymerace

Zaostřovací gel: 5% (w/v) AA a BIS v poměru BIS:AA 1:29; 125mM Tris pH 6,8; 1mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný

Vzorkový pufr: 125mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (v/v) bromfenolová modř

Barvení stříbrem

Fixační roztok: 12% (v/v) CH₃COOH, 50% (v/v) methanol, 0,05% (v/v) formaldehyd

Barvicí roztok: 12mM AgNO₃, 0,075% (v/v) formaldehyd

Vyvolávací roztok: 570mM Na₂CO₃, 0,05% (v/v) formaldehyd, 16μm Na₂S₂O₃

Afinitní chromatografie na sulfonamidové koloně a dialýza:

Lyzační pufr 1 (W1) pufr: 0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 0.2 M Na₂SO₄

Lyzační pufr 2(W2) pufr: 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 0.2 M Na₂SO₄

Eluční (EB) pufr: 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.4 M NaN₃

Dialyzační pufr: 50 mM Tris baze pH 7.8

4.6. Ostatní materiál

- 96amková polypropenová destička (Thermo Scientific, německo)

-
- dialyzační membrána (Sigma-Aldrich, USA) celulosová, mezní velikost 10 kDa
 - chromatografický nosič p-aminomethylbenzenesulfonamid–agarosa (Sigma-Aldrich, USA)
 - koncentrátoři Microcon nebo Amicon Ultra (Millipore, USA)
 - krystalizační destičky: Easy Xtal Tool (Quiagen, Německo)
 - laboratorní sklo (P-LAB, Česká republika)
 - podložní sklíčka (P-LAB, Česká republika)
 - přírodní celofán na sušení gelů po SDS-PAGE (Pemar, Česká republika)
 - standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Broad range (Bio-Rad, USA)

4.7. Přístroje

centrifugy	Hettich Zentrifugen EBA 12R, Německo (rotor 1412) Mini Spin (Eppendorf, Německo) Hermle Z 323 K, Německo Heraeus Multifuge 3S-R (Thermo Electron Corporation, Německo) Beckman, USA J-21M (rotory JA-14, JA-21)
spektrofotometry	Ultrospec 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Velká Británie) Unicam UV 540, USA NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
souprava pro elektroforézu	Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, USA) zdroj EV243 (Consort, Belgie) souprava pro horizontální agarosovou elektroforézu (vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
rotační inkubátory	INR-401 (Gallenkamp, Velká Británie) Orbital Incubator (Sanyo, Japonsko)
optický mikroskop	Nikon SMZ600 Olympus SZX 10
konfokální mikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Německo
laminární box	BSB 4A Gelaire Flow Laboratories, Austrálie
termostaty	TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) Sanyo CO2 Incubator MCO-ATAI, Japonsko
předvážky	PRS 620-3 (Kern, Německo) Adventur TM Pro AV2102CM (Ohaus, USA)
váhy	Owa labor (VEB Wägetechnik Rapido, Německo) Adventur TM Pro AV213CM (Ohaus, USA)
pH metr	GMH 3530 (Greisinger Electronic, Německo)
průtokový cytometr	BD FACS Aria, Biosciences, USA BD FACS Calibur, Biosciences, USA
sonikátory	Soniprep 150 MSE (Sanyo, Velká Británie) Sonic Dismembrator (Dynatech, Francie)
Stopped flow	Applied photophysic, RX2000 Rapid kinetics Spectrometer accessory

třepačka	Rotamax 120 (Heidolph Instruments, Německo)
flow box	BSB 4A (Gelaire, Austrálie)
fotoaparát	Nikon Colpix P6000, Japonsko Olympus E-620 (software Quic PHOTO CAMERA 2.3), Německo Zeiss LSM 780, Německo
vodní lázeň	GRANT (P-lab, Česká republika)
vortex	MS2 Minishaker (Schoeller instruments, Česká republika) vortex (vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
magnetická míchačka	Jenway 1000 (Hotplate and Stirrer, Velká Británie)
centrifugační koncentrátor	Speed Vac Concentrator Savant (Thermo Scientific, USA)

5. METODY

5.1. Příprava CAII

5.1.1. Rekombinatní exprese

5.1.1.1. Transformace bakterií plazmidovou DNA

Kompetentní buňky druhu *E. coli* BL21 (DE3) byly transformovány příslušnou plazmidovou DNA metodou teplotního šoku. Při transformaci bylo smícháno 100 µl bakteriální suspence s 1 µl (cca 50-100 ng) plazmidové DNA. Tento CAII expresní plazmid byl laskavě poskytnut Dr. McKeena [83] a je odvozen od pET expresních vektorů. Kmen *E. coli* BL21(DE3) je standardně používaný pro vektory umožňující indukovatelnou expresi pod kontrolou promotoru z fága T7. Kmen obsahuje gen pro T7 RNA-polymerasu, která byla do hostitelského kmene vnesena transdukcí derivátem fága λ. T7 promotor je následně specificky rozpoznáván T7 RNA-polymerasou, která pak syntetizuje RNA až pětkrát rychleji než RNA-polymerasa *E. coli* [130]. Během transkripce je gen pro T7 RNA-polymerasu v genomu hostitelského kmene kontrolován promotorem p_{lacUV5} a transkripce genu je reprimována prostřednictvím produktu genu *lacI*. Transkripci lze snadno indukovat laktosou, IPTG nebo ETG. Zmíněná represe promotoru p_{lacUV5} je v bakteriích zodpovědná za nízkou hladinu T7 RNA-polymerasy před indukcí exprese rekombinantního proteinu. Gen pro represor *lacI* je přítomen kromě bakteriálního genomu, ale také v sérii pET plazminů, a to v mutované formě s účinnější formou promotoru *lacI*^q

Takto upravená směs byla nejdříve inkubována 45 min na ledu, poté následoval teplotní šok, kdy byla směs ponechána 45 s ve vodní lázni při 42 °C a opět 2 min na ledu. Následovalo naočkování směsi do 900 µl LB média bez přidaných antibiotik. Vzniklá buněčná suspence byla za stálého třepání (150 ot. /min) inkubována 1 hodinu při 37 °C.

Po inkubaci byla bakteriální suspence naočkována na Petriho misky obsahující živný agar, selekční marker ampicilin (100 µg/ml) a 1% glukosu. Na dvě misky o průměru 20 cm bylo rozetřeno vždy 300 µl bakteriální suspence. Misky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

5.1.1.2. Kultivace *E.coli* BL21 (DE3)

Následující den byly kolonie z Petriho misek smyty minimálním médiem (vždy 15 ml na misku), do kterého byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml, dále MgSO₄ do výsledné koncentrace 0,98mM, CaCl₂ do výsledné koncentrace 0,3M, d-Biotin do výsledné koncentrace 4nM a Tiamin do výsledné koncentrace 3,8mM, čímž bylo získáno inokulum. Inokulum bylo naočkováno vždy po 2,5ml do tří Erlenmayerových baněk s 500 ml minimálního média.

Bakteriální kultury byly inkubovány v rotačním inkubátoru Gallenkamp při teplotě 37 °C a 200 ot./min. Během kultivace byla kontrolována rychlost buněčného růstu měřením OD_{550nm} každou hodinu. Po dosažení požadované hodnoty absorbance (OD_{550nm} přibližně 0,6) byly Erlenovy baňky přemístěny do třepačky Sanyo předem vytemperované na 15°C. Po vychlazení byla provedena indukce exprese přidavkem IPTG do finální koncentrace 0,42mM a dále byl přidán 1M ZnSO₄ do finální koncentrace 1mM. Bakteriální kultury byly dále kultivovány za stejných podmínek přes noc. Následující den byla kultivace ukončena centrifugací (4000×g, 20 min, 4 °C). Biomasa byla zvážena a zamražena.

5.1.2. Izolace proteinu

Biomasa získaná rekombinantní expresí (viz kap. 5.1.1.) byla resuspendována v lyzačním pufru W1 (0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 0.2 M Na₂SO₄; na každý litr média bylo přidáno 10 ml W1 pufru a 40 mg lysozymu). Resuspendovaná biomasa byla následně 1 hodinu míchána při 4 °C a poté ještě 3 hodiny při laboratorní teplotě. Bakteriální lyzát (celkem 30 ml) byl za intenzivního chlazení sonikován sonikátorem Dynatech Sonic Dismembrator. Následně byl upraven objem W1 pufru (vždy na 1 litr média 50 ml W1 pufru) a rozpustná frakce byla oddělena od nerozpustných zbytků buněk centrifugací (12 000 rpm, 60 minut, 4 °C, Beckmann J-21M). Supernatant byl posléze použit k purifikaci.

5.1.3. Purifikace CAII afinitní chromatografií na sulfonamidové koloně

Afinitní chromatografie je metoda založená na specifických interakcích mezi ligandem a substrátem, mezi něž můžeme zařadit interakce antigenu s protilátkou, receptoru s ligandem nebo enzymu se substrátem. Pro afinitní chromatografii bývají často proteiny geneticky modifikovány tak, že jsou exprimovány ve fúzi s proteinem schopným takto specificky interagovat. Pro purifikaci CA je však využívána přirozená vlastnost aktivního místa enzymu

vázat sulfonamidovou skupinu, přičemž zinečnatý iont, který se nachází v samotném středu aktivního místa, je deprotonovanou formou sulfonamidu silně vázán [84], [24]. Kolona byla nejdříve naplněna 50% suspenzí p-aminomethylbenzenesulfonamid–agarozy v 20% ethanolu. Po usazení kolony na 4 ml sloupec byla promyta desetinásobkem destilované vody a poté ekvilibrována W1 pufrém. Následně byl na kolonu nanesen supernarant rychlostí cca 0,5 ml/min. Proteklá frakce byla jímána. Po nanesení vzorku byla kolona promývána desetinásobkem W1 pufru a opět byla proteklá frakce jímána. Následně byla kolona promývána desetinásobkem W2 pufru (0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 0.2 M Na₂SO₄) a proteklá frakce též jímána.

Pro eluci rekombinantního proteinu byl použit eluční pufr EB (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.4 M NaN₃) a jednotlivé frakce byly jímány po 6–8 ml. Objem jímaných frakcí odpovídal 1–2 násobku objemu kolony, standardně se pohyboval kolem 6–8 ml. Eluované frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.1.4.1.). Poté byly čisté frakce spojeny a následovalo převedení spojených frakcí obsahujících rekombinantní protein pomocí dialýzy do pufru vhodného pro další použití (50mM Tris - HCl pH 7,8).

5.1.4. Kontrola čistoty proteinu pomocí SDS-PAGE

5.1.4.1. Příprava gelu, vzorku a elektroforetická separace

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) [85] byla prováděna podle Laemmliho [86]. Metoda slouží k oddělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Vzorky byly před nanesením na zaostřovací gel smíchány v poměru 2:1 se vzorkovým pufrém (125mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) bromfenolová modř) a povařeny 5 minut ve vodní lázni a krátce centrifugovány (12 000 ×g, 30 s, laboratorní teplota; centrifuga Eppendorf MiniSpin). Tím dojde k denuraci proteinu a zároveň k navázání molekul SDS a proteinu je udělen uniformní záporný náboj přímo úměrný jeho hmotnosti. Působením elektrického pole dochází posléze k separaci jednotlivých frakcí vzorku na principu molekulového síta. Elektroforéza byla prováděna na aparatuře Mighty Small II SE 250 za laboratorní teploty při výkonu 1,5 W na zaostřovací gel a 3 W na dělicí gel. Rozměry deskových gelů byly 80x70x0,75 mm. Dělicí gel obsahoval 15% (w/v) AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:29; 375mM Tris pH 8,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný pro iniciaci polymerace. Zaostřovací gel obsahoval 5% (w/v) AA a BIS ve stejném poměru jako dělicí gel; 125mM Tris pH 6,8; 1mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v)

SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný. Elektrodový pufr obsahoval 20mM Tris pH 8,3; 200mM glycin a 0,1% (w/v) SDS.

Jako standard molekulových hmotností byla používána směs proteinů Broad Range, obsahující myosin (200 kDa), β -galaktosidasu (116,3 kDa), fosforylasu b (97,4 kDa), sérový albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonickou anhydru (31 kDa), trypsinový inhibitor (21,5 kDa), lysozym (14,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa).

5.1.4.2. Barvení stříbrem

Proteiny byly na SDS-PAGE gelu vizualizovány stříbrem. Nejdříve byly proteiny v gelu fixovány 1 hodinu fixačním roztokem (12% (v/v) CH_3COOH , 50% (v/v) methanol, 0,05% (v/v) formaldehyd). Následně byl gel třikrát postupně po dobu 3, 5 a 15 min omýván 50% (v/v) roztokem methanolu, poté byl 20 sekund omýván 1,3mM roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a třikrát krátce opláchnut destilovanou vodou. Poté byl gel ponechán 20 minut v barvicím roztoku (12 mM AgNO_3 , 0,075% (v/v) formaldehyd), důkladně několikrát opláchnut destilovanou vodou a přenesen do vyvolávacího roztoku (570 mM Na_2CO_3 , 0,05% (v/v) formaldehyd, 16 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Barvení gelu bylo zastaveno roztokem 12% (v/v) kyseliny octové a 50% (v/v) methanolu. Nakonec byl gel omyt a uchován v 50% (v/v) methanolu, aby nedošlo k jeho odbarvení [87].

5.1.4.3. Sušení gelů

Pro dokumentační účely byly gely 20 minut máčeny v sušicím roztoku (20% metanol a 3% glycerol) [88] a sušeny v celofánu napnutém v plastovém rámečku.

5.1.5. Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance

Pro stanovení koncentrace proteinů v roztoku se využívá schopnosti postranních řetězců některých aminokyselinových zbytků specificky absorbovat při vlnové délce 280 nm ($\text{OD}_{280\text{nm}}$) [89].

OD_{280} bylo měřeno při pokojové teplotě pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (z kapky vzorku o objemu 2 μl) nebo pomocí přístroje Ultrospec 3100*pro* (v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm). Ze změřené absorbance byla zjištěna koncentrace vzorku. Hodnota teoretického absorpčního koeficientu při 280 nm používaného pro výpočet koncentrace (1,73 $\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro CAII) byla získána programem ProtParam [90] ze sekvence proteinu.

5.1.6. Dialýza a ultrafiltrace

Dialýza je proces, který lze použít k separaci látek o různých molekulových hmotnostech. Roztok bílkovin, polysacharidů nebo nukleových kyselin je od anorganických solí či jiných nízkomolekulárních látek oddělen pomocí semipermeabilní membrány o specifické velikosti pórů (tzv. cut-off). Ty procházejí pomocí koncentračního gradientu na porézní membráně do roztoku za membránou.

Veškeré dialyzační pokusy probíhaly s dialyzační membránou s mezní velikostí pórů 10 kDa pro globulární proteiny, při 4 °C proti vhodnému pufru (50 mM Tris baze pH 7.8) za stálého míchání magnetickým míchadlem. Pufir byl vždy 3× v průběhu dialýzy vyměněn za čerstvý. Po dialýze byl získaný roztok centrifugován (12 000 ot./min, 30 min, 4 °C centrifuga Beckman, rotor JA-14; nebo 12 000 ot./min, 20 min, 4 °C; centrifuga Hermle Z 323 K) pro odstranění případných agregátů.

K zakoncentrování vzorku pro krystalizační pokusy byla provedena ultrafiltrace. Hnací silou ultrafiltrace je tlak vyvíjený na retentát nad porézní membránou. Přes membránu následně přechází voda a menší molekuly a ionty.

Proteinové roztoky byly zahušťovány ultrafiltrací při 4 °C v koncentrátorech Amicon Ultra (větší objemy roztoků; 4000×g centrifuga Hermle Z 323 K) nebo Microcon (Millipore, menší objemy vzorků; 14 000×g, centrifuga Hettich EBA 12 R) s membránami o mezní propustnosti 10 kDa pro globulární proteiny [91].

5.2. Testování inhibiční aktivity a vazby inhibitoru

Inhibiční aktivita jednotlivých testovaných látek byla ověřována na CAII a CAIX enzymu. Enzym CAII byl připraven rekombinantní expresí v *E. coli* v rámci této diplomové práce. Enzym CAIX byl ve školící laboratoři připraven RNDr. V. Králem, Ph.D. K expresi tohoto enzymu byla použita specifická buněčná linie HEK 293 6E WCB, odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk, která byla během kultivace transfekována plazmidem pTT5, který nese gen pro expresi CAIX [92]. Rekombinantní produkt tohoto genu obsahuje extracelulární část CAIX, tj. PG a CA domény, aminokyselinové zbytky 52-390.

Kromě inhibičních studií byla vazba inhibitorů do aktivního místa enzymu studována i na strukturní úrovni. RTG strukturní analýza byla provedena na komplexech inhibitorů s enzymem CAII, jelikož krystalizace enzymu CAIX je velice obtížná.

5.2.1. Měření inhibice enzymové aktivity CA

Inhibice aktivity enzymů CAIa CAIX byla měřena technikou stopped-flow v provedení popsaném Barbarou Gibbons [93]. Roztok substrátu byl získán sycením odvdzdušněné vody plynným oxidem uhličitým přibližně po dobu 1 až 2 hodin před začátkem měření, dokud nebyl připraven nasycený roztok CO₂ o koncentraci 34mM. Poté byl roztok naředěn 1:3 odvdzdušněnou vodou a aplikován do přístroje. Měřicí roztok obsahoval: 40mM síran sodný (Na₂SO₄), indikátor reakce 400um fenol červeň a pufr 40mM HEPES pH 7,5. Pro enzym CAIX byl ještě do měřicího roztoku přidán detergent 0,005% DDM (Dodecyl-β-D-maltopyranosid) pro zlepšení stability enzymu. Enzymy (CAII a CAIX) byly před aplikací do měřicího roztoku drženy na ledu. Měřicí roztok byl temperován na laboratorní teplotu. Těsně před nástřikem na aparaturu přístroje byl k roztoku enzymu přidán inhibitor v rozpětí výsledných koncentrací v roztoku (0,1nM–500μM). Reakce byla zahájena rychlým smícháním roztoku substrátu s roztokem enzymu v poměru 1:1 v aparatuře stopped – flow (Applied photophysical, RX2000 Rapid kinetics Spectrometer accessory). Přístroj byl temperován na 25 °C. Enzym v reakční směsi katalyzuje reverzibilní hydrataci CO₂ na H₂CO₃ a změna pH způsobí změnu barvy acidobazického indikátoru. Fenol červeň (pK = 7,5) má oblast barevného přechodu (žlutá/červená) při pH 6,4–8,2. Průběh reakce byl sledován spektrofotometricky při λ = 557nm (Spectometr Unicam UV 540). Byla sledována iniciální rychlost reakce v lineární oblasti pro konverzi substrátu do 5% pro nejméně 8 různých koncentrací inhibitoru. Rychlost spontánní přeměny CO₂ byla měřena stejným způsobem (bez přidavku enzymu) a následně byla odečtena od celkové měřené reakční rychlosti. Až na výjimky byla měření prováděna ve třech sériích. Všechna data byla pak simultánně proložena pomocí nelineární regrese a metody nejmenších čtverců s užitím rovnice Williams-Morrisona:

$$v_I = v_0 \frac{[E] - [I] - K_I^{app} + \sqrt{([E] - [I] - K_I^{app})^2 - 4[E]K_I^{app}}}{2[E]}$$

kde v_I je počáteční rychlost inhibované reakce, v_0 počáteční rychlost neinhibované reakce, $[E]$ aktivní koncentrace enzymu, $[I]$ koncentrace inhibitoru, K_I^{app} zdánlivá inhibiční konstanta

5.2.2. Příprava krystalu pro RTG studie

Pro krystalizaci CAII v komplexu s inhibitory byla použita metoda difuze vodních par za využití techniky visící kapky [94]. Pokusy probíhaly při teplotě 18 °C a průběh krystalizace byl sledován pomocí optických mikroskopů Nikon SMZ660 a Olympus SZX10 a zaznamenány fotoaparáty Nikon Coolpix P6000 a Olympus E-620 (software Quick PHOTO CAMERA 2.3).

Roztok CAII proteinu o koncentraci 24–26 mg/ml v pufru o složení 50mM Tris – HCl pH 7,8 byl smíchán s roztokem inhibitoru rozpuštěném v DMSO. Inhibitor byl přidán v 1 až 3,5násobném molárním přebytku. Po dvacetiminutové inkubaci na ledu byla směs centrifugována pro odstranění případných nečistot či precipitátů. Kapky o celkovém objemu 3–4 μ l byly nasazovány na 15jamkové destičky EasyXtal Tool. Na kapku komplexu proteinu s inhibitem byla navrstvena kapka precipitačního roztoku (1,6 M citrát sodný, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8) v poměru 2:1 nebo 1:1. Objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 1000 μ l. Finální koncentrace DMSO v krystalizační směsi nepřekročila 1,5% (v/v). Při sběru krystalů byly krystaly namáčeny po dobu 30 sekund v precipitačním roztoku s přídávkem 20 % (v/v) sacharózy a poté byly zamrazeny a uchovány v tekutém dusíku až do vlastního pro snímání difrakčních dat.

5.2.3. Snímání difrakčních dat a určení trojrozměrné struktury

Krystaly komplexu CAII s FD4 a CB23 byly použity k nasnímání kompletní sady difrakčních dat při teplotě 100 K na zdroji synchrotronového záření BESSY, v Berlíně (Německo). Struktury byly vyřešeny metodou molekulárního nahrazení a upřesněny na rozlišení 1,35 Å (CAII v komplexu s FD4) a 1,37 Å (CAII v komplexu s CB23). RTG analýza byla provedena doc. Jiřím Bryndou, Ph.D., na školicím pracovišti.

5.3. Testování vazby značeného inhibitoru na buněčných kulturách

Vazba značeného inhibitoru byla testována na několika buněčných liniích. První pokusy byly provedeny na liniích lidského kolorektálního karcinomu (HT29) s přirozenou expresí znaku CAIX a jako linie bez exprese tohoto znaku byla použita linie myších fibroblastů (NIH3T3). Vazba inhibitoru byla též testována na liniích lidské rakoviny děložního čípku C33-A, do nichž byl gen pro expresi CAIX vnesen. Buněčné linie C33 CAIX byly připraveny kontrtransfekcí rekombinantním plazminem pSG5C-CA9 (plazmid zajišťující expresi CAIX) a

pSV2neo (zajišťuje selekci pro G418). Směs klonů pozitivních na CAIX byly separovány přes CA IX specifickou protilátku M75 navázanou na magnetické kuličky. Selektovaná směs byla ověřena na expresi karbonátlyázy CAIX. C33 neo byly kontrasekrovány čistým plazmidem pSG5C a pSV2neo. Bylo použito selekční antibiotikum 900 µg/ml G418 (Geneticin). Uvedené transfektanty byly připraveny ve Virologickém ústavu SAV, Bratislava a darovány ÚMTM, LF UPOL.

Použité buněčné linie byly pěstovány v médiu DMEM s 10% FBS při 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého (inkubátor Sanyo CO₂, MCO-ATAI) a pasážovány byly standardním způsobem [90]. Adherentní buněčné linie byly nejprve promyty PBS a následně inkubovány s ACUTTASE po dobu několika minut, než se buňky uvolnily ze dna. Následně byly buňky opláchnuty médiem, převedeny do 50 ml zkumavky a centrifugací (300 g, 5 min, 4 °C; centrifugovány Heraeus Multifuge 3S-R, výkyvný rotor). Po odstranění supernatantu byla peleta omyta vychlazeným puřem PBS a po centrifugaci za stejných podmínek a odstranění supernatantu suspendována ve vychlazeném 1% (w/v) BSA v PBS.

5.3.1. Průtoková cytometrie

Pro průtokovou cytometrii byla použita 96jamková polypropylenová mikrotitrační destička s kulatým dnem. Do destičky bylo odpipetováno přibližně $2 \cdot 10^5$ buněk v 10 µl suspence na jamku a do příslušných jamek 10 µl primární protilátky (fragmenty scFv o koncentraci 7–14 µg/ml a mateřský imunoglobulin M75 o koncentraci 14 µg/ml) ředěné do vychlazeného 1% (w/v) BSA v PBS. Do zbylých jamek bylo pro doplnění objemu přidáno 10 µl 1% (w/v) BSA v PBS. Destička byla krátce protřepána a inkubována 20 min na ledu. Následně byla destička dvakrát promyta. Byl přidán vychlazený 1% (w/v) BSA v PBS a po centrifugaci za stejných podmínek byl supernatant odstraněn. Po promytí buněk byly do jamek s protilátkou M75 a jejím fragmentem scFv přidány sekundární protilátky (polyklonální GAM/FITC o koncentraci 0,02 mg/ml pro mateřský imunoglobulin M75 a anti-c-myc/FITC o koncentraci 0,02 mg/ml pro fragmenty scFv, vždy po 10 µl), do jamek pro kontrolu sekundárních protilátek a dále bylo přidáno 10 µl inhibitorů U23 (negativní kontrola) a testovaný U28 vždy ve shodné koncentraci (0,1nm až 1000nm). Inkubace (20 minut na ledu) probíhala bez přístupu světla, protože sekundární protilátky i testované polymerní konjugáty nesly fluorescenční značku (sekundární protilátky FITC a konjugáty ATT0488) [95]. Buňky na destičce byly po inkubaci opět omyty stejným způsobem 1% (w/v) BSA v PBS a následně byly z destičky uvolněny suspendováním ve 200 µl vychlazeného PBS s propidium jodidem

o výsledné koncentraci 0,5-1 µg/ml. Vzniklá buněčná suspenze byla přenesena do zkumavek. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru BD FACS Aria (argonový laser 488 nm – 530/30) za odborné asistence Dr. Vlastimila Krále na pracovišti RNDr. Heleny Mertlíkové – Kaiserové, Ph.D., ÚOCHB AV ČR a BD FACS Calibur (argonový laser 488 nm – 530/30) za odborné asistence za odborné asistence Mgr. Petra Konečného na pracovišti doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D.; ÚMTM, LF UPOL. K analýze a přípravě obrázků byl použit program FlowJo (7.6.5; Tree Star, USA).

5.3.2. Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie byla prováděna na buněčných liniích HT29 a NIH3T3. Buněčná suspenze v médiu o objemu 250 µl byla odpipetována na podložní sklička, která byla umístěna v Petriho miskách a ponechána 24 hodin při 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-ATAI). Po kontrole správného nárůstu buněčné monovrstvy byla na jednotlivá sklička postupně aplikována příslušná činidla: 2,5 µl primární protilátky M75 (protilátka předem naředěna v 1% (w/v) BSA v PBS a výsledná koncentrace na skličku byla 14 µg/ml) jako pozitivní kontrola, polymerní konjugát U23 jako negativní kontrola a testovaný polymerní konjugát U28 (konjugáty předem naředěny v PBS a u obou byla výsledná koncentrace na skličku 0,1µM). Následovala hodinová inkubace při 37 °C ve tmě a poté bylo u sklička s pozitivní kontrolou odebráno médium s primární protilátkou (M75) a přidáno 250 µl PBS se sekundární protilátkou (polyklonální GAM/FITC do výsledné koncentrace na skličku 0,02 mg/ml). Následovala další inkubace (2 hodiny). Poté byl obsah sklíček odebrán a na všechna sklička bylo přidáno modré fluorescenční barvivo pro barvení DNA - HOECHST 34580 (10 µg/ml roztok v PBS). Po patnáctiminutové inkubaci bylo barvivo odebráno a na všechna sklička bylo nanášeno 250 µl PBS.

Fluorescenční obrazy buněk byly získány pomocí Zeiss LSM 780 konfokálního mikroskopu (Carl Zeiss Microscopy) za použití olejového imerzního objektivu (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27). Obrazy byly snímány při pokojové teplotě za použití 405 nm laserové diody (4,5%; max. výkon 25mW) pro excitační emisi sbíranou od 410 do 585 nm (napětí na detektoru 570 V) pro HOECHST 34580 a 488 nm argonového laseru (4,0%; max. výkon 25 mW) pro excitační emisi sbíranou od 517 do 534 nm (napětí na detektoru 870 V) pro ATTO488. Všechny snímky byly pořízeny se stejným nastavením. Operační systém

mikroskopu software ZEN 2011 (Carl Zeiss Microscopy) byl použit i pro zpracování výsledných obrázků.

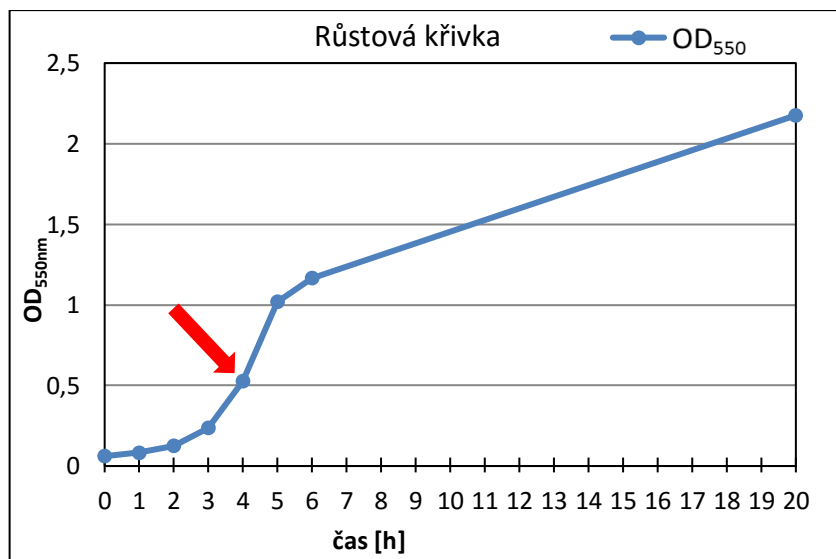
6. VÝSLEDKY

6.1. Příprava rekombinantní CAII

6.1.1. Expres rekombinantní CAII

K expresi byl použit kmen *E. coli* BL21(DE3), standardně používaný pro vektory umožňující indukovatelnou expresi řízenou T7 promotorem. Plazmid, v němž je gen pro CAII (pod kontrolu T7 promotoru) umístěn, obsahuje kromě jiného také geny pro represor lacI^q a β-laktamázu (viz kapitola 5.1.1.1.). Protokol pro expresi rekombinantního proteinu CAII je popsán v kapitole 5.1.

Kultivace probíhala celkem 20 hodin, první čtyři hodiny při teplotě 37°C a od provedení indukce dále pokračovala při 19°C. Indukce exprese rekombinantního proteinu byla provedena v exponenciální fázi růstu, konkrétně při dosažení OD_{550nm} 0,5. Indukce byla prováděna přidáním indukčního činidla (IPTG) a zároveň byl do média přidán síran zinečnatý, jako zdroj Zn²⁺, který je součástí aktivního místa CAII. Jak je patrné z průběhu růstové křivky (obrázek 15), růst bakterií po přidání indukčního činidla nebyl zastaven, ale dále pokračoval až do ukončení kultivace. Produkce CAII a její akumulace v cytosolu tedy nebyla pro bakterie výrazně toxická.

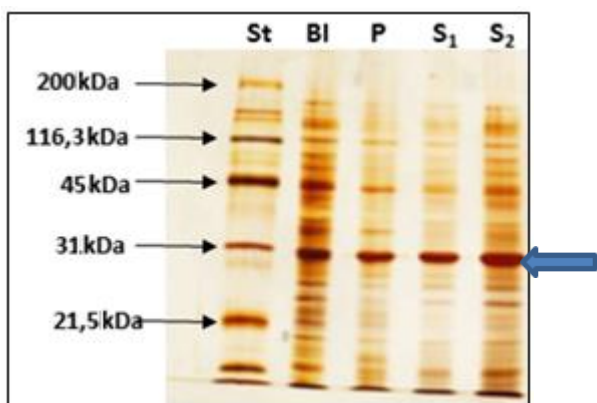


Obrázek 15: Růstová křivka

Průběh kultivace bakteriální kultury *E. coli* BL.21 (DE3) produkující CAII. Šipka ukazuje čas indukce exprese přidáním IPTG.

Průměrný výtěžek bakteriální kultivace činil 7,6 g vlhké biomasy na 1 l kultivačního média. Bakteriální buňky byly rozbity a postup uvedeným v kapitole 5.1.2 byla separována nerozpustná a rozpustná cytosolická frakce. Přítomnost rekombinantního proteinu CAII o molekulové hmotnosti 29,2 kDa byla potvrzena SDS-PAGE analýzou (obrázek 16), a to jak v rozpustné, tak i v nerozpustné cytosolické frakci (dráhy P a S na obrázku 16). Z obrázku je také patrné, že určité množství rekombinantního proteinu bylo tvořeno bakteriemi *E. coli* ještě před indukcí (dráha BI na obrázku 16).

Jelikož množství produktu v rozpustné frakci bylo dostatečné, pro další zpracování byla použita pouze frakce rozpustná.



Obrázek 16: SDS-PAGE analýza vzorků bakteriální kultury odebraných při expresi CAII

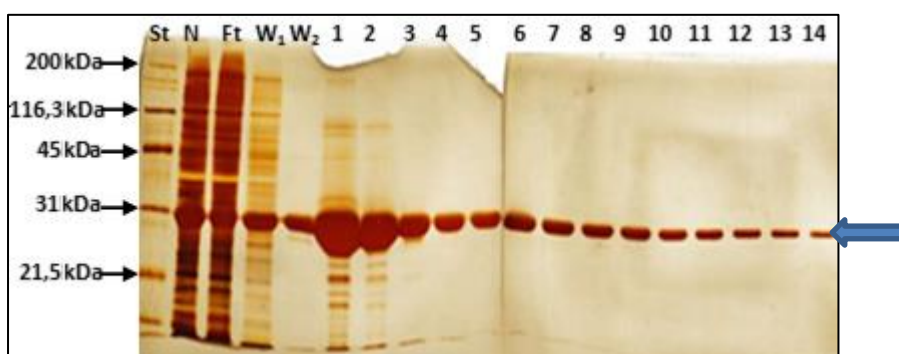
Separace proteinů buněčných lyzátů bakterií *E. coli* na 15% gelu. Sloupec **St** – standardy molekulových hmotností; **BI** – bakteriální buňky před indukcí; **P** – peleta po centrifugaci buněk, tj. nerozpustná frakce; **S₁** a **S₂** – buněčný supernatant, tj. rozpustná frakce ve dvou koncentracích nanášky. Modrá šipka ukazuje produkt o velikosti odpovídající molekulové váze CAII. Požadovaný produkt se nachází v buňkách před indukcí (**BI**), v nerozpustné frakci (**P**) i ve frakci rozpustné (**S₁** a **S₂**).

6.1.2. Purifikace a příprava vzorku pro krystalizaci

Purifikace CAII z rozpustné frakce byla prováděna afinitní chromatografií na sulfonamidové koloně. Tato metoda se používá pro purifikaci CA enzymů a využívá přirozenou vlastnost těchto enzymů vázat sulfonamidovou skupinu, přičemž deprotonovaná forma sulfonamidu při vazbě do středu aktivního místa enzymu vytěsňuje přítomný zinečnatý kationt [84]. Protein se na sulfonamidovou kolonu naváže za podmínek optimálních pro vazbu, poté jsou při nižším pH z kolony odmyty případné navázané kontaminanty a nakonec je CA protein vytěsněn z vazby na sulfonamid přidáním azidu sodného.

Konkrétně byl pro vazbu na kolonu použit pufr W1 o složení 0.1 M Tris-HCl pH 9.0 a 0.2 M Na₂SO₄, k omytí byl použit pufr o stejném složení s pH 7.0 (W2 pufr) a pro eluci byl použit pufr EB (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.4 M NaN₃). Přesný postup je popsán v kapitole 5.1.3.

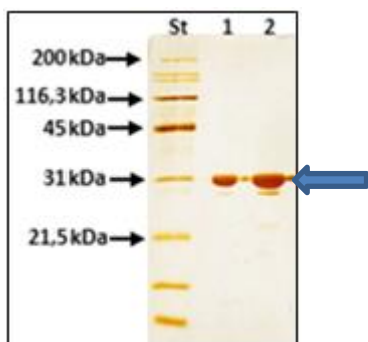
Výskyt produktu v jednotlivých frakcích byl monitorován pomocí SDS-PAGE. Jak je možno vidět na obrázku 17, během izolačních procesů, část rekombinantního proteinu byla z kolony odmyta nižším pH s ostatními kontaminantami (dráhy W₁ a W₂ na obrázku 17). Většina proteinu však byla eluována azidem sodným ve 14 frakcích o objemu 6–8ml (dráhy 1–14 na obrázku 17). Frakce 1–14 byly spojeny a množství proteinu bylo určeno z absorbance vzorku (viz kapitola 5.1.5.). Množství proteinu po tomto purifikačním kroku byl celkem 285 mg, tj. výtěžek z 11 bakteriální kultury byl 85 mg.



Obrázek 17: SDS-PAGE analýza vzorků jednotlivých frakcí při purifikaci CAII

Separace proteinů po purifikaci na sulfonamidové koloně na 15% gelu. **St** – standardy molekulových hmotností; **N** – nános na kolonu; **Ft** – proteklý nános, **W1** – sbíraný průtok lyzačního pufru 1, **W2** – sbíraný průtok lyzačního pufru 2, **1–14** jednotlivé frakce

Pro následné experimenty byl protein dialýzou převeden do pufru o složení 50 mM Tris baze pH 7.8 a byla ověřena enzymatická aktivita metodou popsanou v kapitole 5.2.1. Výsledná čistota vzorku > 95% byla odhadnuta za pomoci SDS - PAGE analýzy (obrázek 18). Vzorek byl dále zahuštěn ultrafiltrací na koncentraci proteinu 25 mg/ml a byl zamražen při –80°C pro další využití. Celkový výtěžek činil 250,2 mg proteinu, tedy 83,4 mg proteinu na 1 l média.



Obrázek 18 SDS-PAGE analýza čistoty CAII

Analýza čistoty purifikovaného produktu na 15% gelu.

St – standardy molekulových hmotností. 1 – nanáška proteinu 10 ng, 2 – nanáška proteinu 20 ng

6.2. Vazba polymerního konjugátu U28 na CAIX

Látka uváděná zde pod označením U28 je biologicky kompatibilní kopolymer cílicí na CAIX. Byl navržen a připraven ve spolupráci s laboratoří doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc., (ÚOCHB AV ČR) a s laboratoří RNDr. Tomáše Etrycha, Ph.D., (ÚMCH AV ČR) v návaznosti na jejich nedávno publikovanou práci o využití konjugátů polymerů ve spojení s inhibitory různých enzymů [74]. Struktury polymerního konjugátu i cílicího inhibitoru jsou blíže popsány v úvodu této diplomové práce (kapitola 3.5.2.1.).

Vazba inhibitoru U28 byla testována jednak *in vitro*, kde byl sledován inhibiční účinek na enzymovou aktivitu rekombinantních enzymů CAIX a CAII. Dále pak byla testována vazba inhibitoru na CAIX na povrchu buněk, a to metodami průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie.

6.2.1. Inhibiční účinek polymerního konjugátu U28

Schopnost specifických inhibitorů zpomalovat katalytickou aktivitu enzymu byla testována metodou popsanou v kapitole 5.2.1. na spektrofotometru, který je spojen s aparaturou stopped – flow, zajišťující optimální průběh reakce. Enzym v reakční směsi katalyzuje reakci $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ a v důsledku zvyšování koncentrace vodíkových iontů dochází k poklesu pH v reakční směsi a tato změna je zviditelněna díky barevné reakci acidobazického indikátoru (v reakční směsi fenol červeň s barevným přechodem při pH 6,4–8,2).

Průběh reakce byl sledován spektrofotometrem, kdy byla snímána změna absorbance při vlnové délce 557 nm. Reakce byla zaznamenávána po dobu 30 sekund. Nejprve byla ověřena

aktivita vzorku enzymu získaného rekombinantní expresí. Byla proměřena rychlost samovolné přeměny substrátu na produkt bez přidaného enzymu a poté rychlost reakce s enzymem. Byl pozorován velmi rychlý průběh reakční přeměny u reakce katalyzované enzymem oproti reakci bez přidaného enzymu. Následně byly stanoveny rychlosti reakce v přítomnosti různých koncentrací inhibitorů U28, JS-570 a JS-561. Inhibiční profily testovaných sloučenin byly zjištěny jak pro rekombinantní enzym CAII připravený, tak i pro enzym CAIX, který byl získán v rámci školicí laboratoře a je stručně popsán v kapitole 5.2. Inhibiční konstanty byly získány nelineární regresní analýzou s využitím metody nejmenších čtverců pomocí programu EXCEL. Hodnoty inhibičních konstant jednotlivých inhibitorů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Inhibiční účinky látek na CAII a CAIX

	K_I [μM]	
	CAII	CAI
JS-570	$0,02 \pm 0,013$	$0,41 \pm 0,025$
JS-561	$0,13 \pm 0,009$	$0,17 \pm 0,012$
U28	neměřena	$0,6 \pm 0,014$

Jak je patrné z hodnot inhibičních konstant, výchozí inhibitor JS-561 inhibuje obě izoformy CA s nízkou submikromolární inhibiční konstantou a nevykazuje specifitu vůči CAIX. Připojení linkeru k inhibitoru způsobilo mírné zhoršení inhibičních vlastností inhibitoru JS-570, a to 1.5 násobné zvýšení K_I pro CAII a 2.5 násobné zvýšení K_I pro CAIX. Testování U28 ověřilo schopnost polymerního inhibitoru vázat se do aktivního místa CAIX a inhibovat tak katalytickou aktivitu enzymu s inhibiční konstantou $0.6 \mu\text{M}$.

6.2.2. Vazba polymerního konjugátu U28 na CAIX v buněčných kulturách

Testovaný konjugát U28 je složen z polymerního nosiče, na který jsou napojeny kromě molekul inhibitoru CAIX i molekuly biotinu a ATTO488. Zatímco inhibitor navádí konjugát na cílovou strukturu a molekula biotinu slouží jako afinitní značka, umožňuje molekula fluorochromu ATTO488 přímou detekci, například konfokální mikroskopií a průtokovou cytometrií. Po excitaci fluorochromu prostřednictvím světla o vlnové délce 488 nm dochází k absorpci excitační energie a následně je část přijaté energie vzápětí uvolněna ve formě emisního záření o vyšší vlnové délce a nižší energii (530) a zaznamenána detekčními systémy.

První pokusy byly provedeny na linii lidského kolorektálního karcinomu HT29 s přirozenou expresí CAIX a k této linii byly vybrány jako negativní kontrola primární myší fibroblasty linie NIH3T3, které CAIX znak neexprimují. V následném experimentu bylo průtokovou cytometrií zjišťováno, zda rozdíly ve vazbě polymerního konjugátu na dvě různé buněčné linie nejsou způsobeny jinými znaky, kterými se tyto linie liší, ale že vazba závisí pouze na výskytu CAIX. Toto ověření bylo provedeno na modifikované dvojici linií rakoviny děložního čípku, které jsou identické a liší se pouze v expresi CAIX.

6.2.2.1. Vazba U28 na buňky s přirozenou expresí CAIX

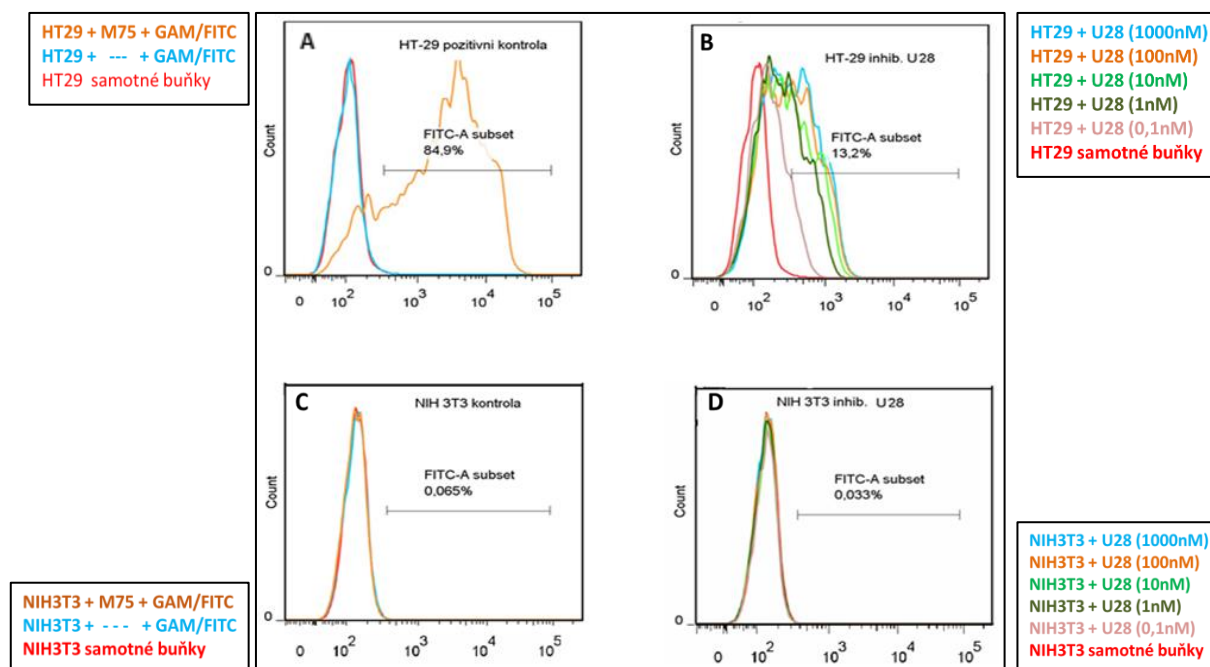
Vazba polymerního konjugátu U28 na buňky lidského kolorektálního karcinomu HT29, které na svém povrchu exprimují ve velkém množství CAIX, byla testována pomocí fluorescenčních technik, průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie.

Metoda provedení analýzy průtokové cytometrie je detailně popsána v kapitole 5.3.1. Na obou liniích byla testována vazba inhibitoru U28 v různých koncentracích (1000-0,1nM). Jako pozitivní kontrola byla použita monoklonální protilátka M75, specifická pro CAIX, v kombinaci se sekundární protilátkou polyklonální GAM/FITC a jako negativní kontrola neznačené buňky. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru BD FACS Aria na pracovišti RNDr. Heleny Mertlíkové – Kaiserové, Ph.D., ÚOCHB AV ČR. Byla analyzována pouze data z populace živých buněk. Tato buněčná populace byla odlišena pomocí propidium jodidu, barviva, které barví pouze mrtvé buňky.

Na obrázku 19 jsou ukázány histogramy z experimentu provedeného na buněčné linii HT29 a NIH3T3. Na CAIX pozitivní buněčné linii HT29 polymerní konjugát U28 (obrázek 19B) vykazuje zřetelný posun v úrovni fluorescenčního signálu oproti neznačeným buňkám od 1nM koncentrace až k 1000nM. Intenzita signálu pozitivní kontroly mAb M75 vykazuje jasný posun oproti neznačeným buňkám (obrázek 19A). Odlišná intenzita signálů fluorescence u pozitivní kontroly M75 a u polymerního inhibitoru U28 je způsobena několika faktory, které jsou v rámci diskuze probírány.

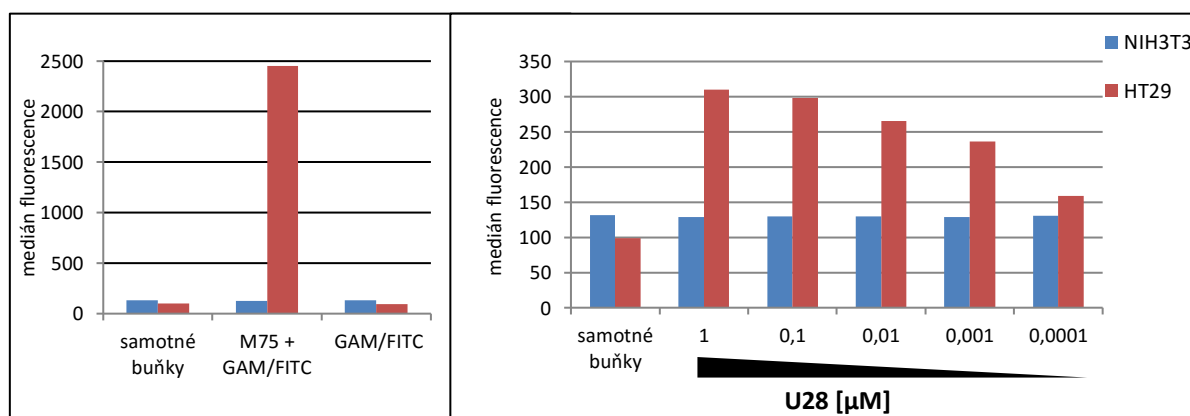
Na negativní buněčné linii NIH3T3 u testovaného polymerního inhibitoru U28 (obrázek 19D) nebyl zaznamenán posun v intenzitě fluorescenčního signálu v porovnání s neznačenými buňkami, a to ani u nejvyšší použité koncentrace polymerního konjugátu U28 (1000nM). Stejně tak nebyl tento posun patrný ani u CAIX specifické protilátky M75 (obrázek 19C).

V grafu na obrázku 20 jsou ukázány mediány fluorescenčních signálů z první průtokové cytometrie na buněčných liniích HT29 a NIH 3T3, kde je jasně patrná závislost intenzitě fluorescenčního signálu na množství U28.



Obrázek 19: Průtoková cytometrie – relativní četnost buněk vůči intenzitě fluorescence FITC

Na obrázku jsou ukázány histogramy fluorescence buněk linie HT29 - pozitivní exprese CAIX (**A, B**) a linie NIH3T3 - bez exprese CAIX (**C, D**). **A a C**: pozitivní kontrola - CAIX specifická primární protilátka M75 (oranžově), kontrola samotné sekundární protilátky GAM/FITC (modře), neznačené buňky (červeně), **B a D**: U28 1000nM (modře), 100nM (oranžově), 10nM (světle zelená), 1nM (tmavě zelená), 0,1nM (růžová), autofluorescence neznačených buněk (červeně).



Obrázek 20: Průtoková cytometrie – medián hodnot intenzit fluorescenčního signálu

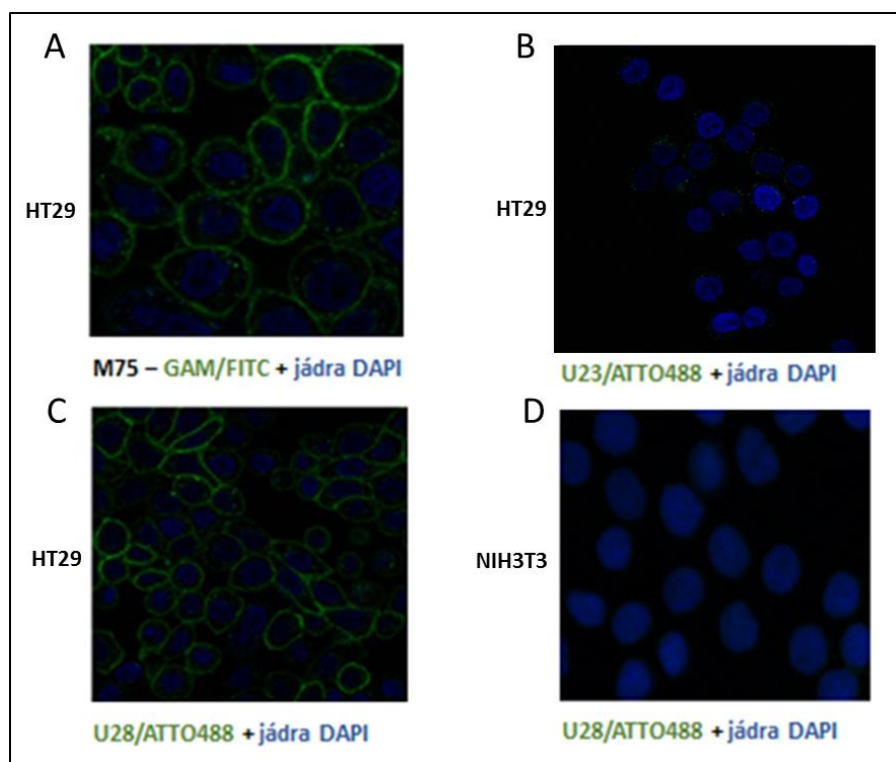
Na obrázku je graf, který porovnává mediány fluorescenčního signálu u buněk CAIX pozitivní linie HT29 (červeně), u buněk CAIX negativní linie NIH3T3 (modře) a medián autofluorescenčního signálu buněk těchto linií. **A**: zleva neznačené buňky, buňky inkubované s protilátkou M75 a kontrola sekundární protilátky — buňky inkubovány pouze s GAM/FITC. **B**: zleva neznačené buněčné linie, buňky inkubované s polymerním inhibitorem U28 v různých koncentracích (1000nM, 100nM, 10nM, 1nM, 0,1nM).

Ačkoliv je hodnota fluorescenčního signálu u protilátky M75 a polymerního inhibitoru U28 kvantitativně zcela odlišná, je u polymerního konjugátu patrný dostatečný posun v úrovni fluorescenčního signálu mezi liniemi s CAIX pozitivní expresí (HT29) a CAIX negativní expresí (NIH3T3), a to při inkubaci buněk s U28 v 1000nM až 1nM koncentraci. Průtokovou cytometrií byla tedy prokázána schopnost polymerního konjugátu vázat se na CAIX pozitivní buněčné linie. Pro potvrzení této vazby byla na stejných buněčných liniích provedena konfokální mikroskopie.

Postup konfokální mikroskopie je detailně popsán v kapitole 5.3.2. Byly opět použity linie lidského kolorektálního karcinomu (HT29) s pozitivní expresí znaku CAIX a linie myších fibroblastů (NIH3T3) bez exprese CAIX. Na obou liniích byl testován konjugát U28 v různých koncentracích (100nM, 1000nM) a polymerní konjugát U23 jako negativní kontrola ve stejných koncentracích. Polymerní konjugát U23 se od U28 odlišuje pouze tím, že nemá připojen inhibitor specifický pro CAIX, zatímco ostatní složky polymerního konjugátu (biotin a fluorescenční značka ATTO488) jsou zachovány. Jako pozitivní kontrola byla, podobně jako pro průtokovou cytometrii, použita primární monoklonální protilátka M75 spolu se sekundární protilátkou polyklonální GAM/FITC. Jádra byla nabarvena modře fluorescenčním DNA barvivem HOECHST 34580. Přípravené preparáty byly snímány konfokálním mikroskopem Carl Zeiss Microscopy.

Jak je vidět na mikrofotografiích (obrázek 21), mají buňky linie HT29 s pozitivní expresí CAIX po aplikaci specifické protilátky M75 a polymerního U28 kolem modrých jader znatelný, zeleně fluoreskující prstenec. Naproti tomu jsou u těchto buněk po použití polymerního konjugátu U23, který na sobě nese CAIX specifický inhibitor, obarvena pouze jádra a zelený prstenec cytoplazmatické membrány zde patrný není. Také u buněk bez exprese CAIX (NIH3T3) po inkubaci s polymerním konjugátem U28 není zeleně fluoreskující prstenec znatelný a jsou zde obarvena opět pouze jádra buněk modře.

Pokud nedochází k nescifické vazbě polymerního inhibitoru U28 na HT29 buněčných liniích, můžeme říci, že polymerní konjugát U28 se specificky váže na karbonátlyázu IX buněčných linií. Abychom potvrdili toho tvrzení, byl proveden další experiment průtokové cytometrie, tentokrát však na identické buněčné linii, která se odlišuje pouze v expresi CAIX znaku.



Obrázek 21: Testování vazby U28 na buňky HT29 a NIH3T3

Mikrofotografie buněk linie HT29 (pozitivní exprese CAIX) a linie NIH3T3 (bez exprese CAIX) z fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Jádra buněk jsou barvena modrým fluorescenčním DNA barvivem (HOECHST 34580 - 10 $\mu\text{g/ml}$). **A:** buňky linie HT29 inkubované s primární protilátkou M75 a sekundárně značenou GAM/FITC (pozitivní kontrola), **B:** buňky linie HT29 inkubované s 1 μM polymerním konjugátem U23, který nemá CAIX specifický inhibitor (negativní kontrola), **C:** buňky linie HT29 inkubované s 1 μM polymerním konjugátem U28, **D:** buňky linie NIH3T3 inkubované s 1 μM polymerním konjugátem U28.

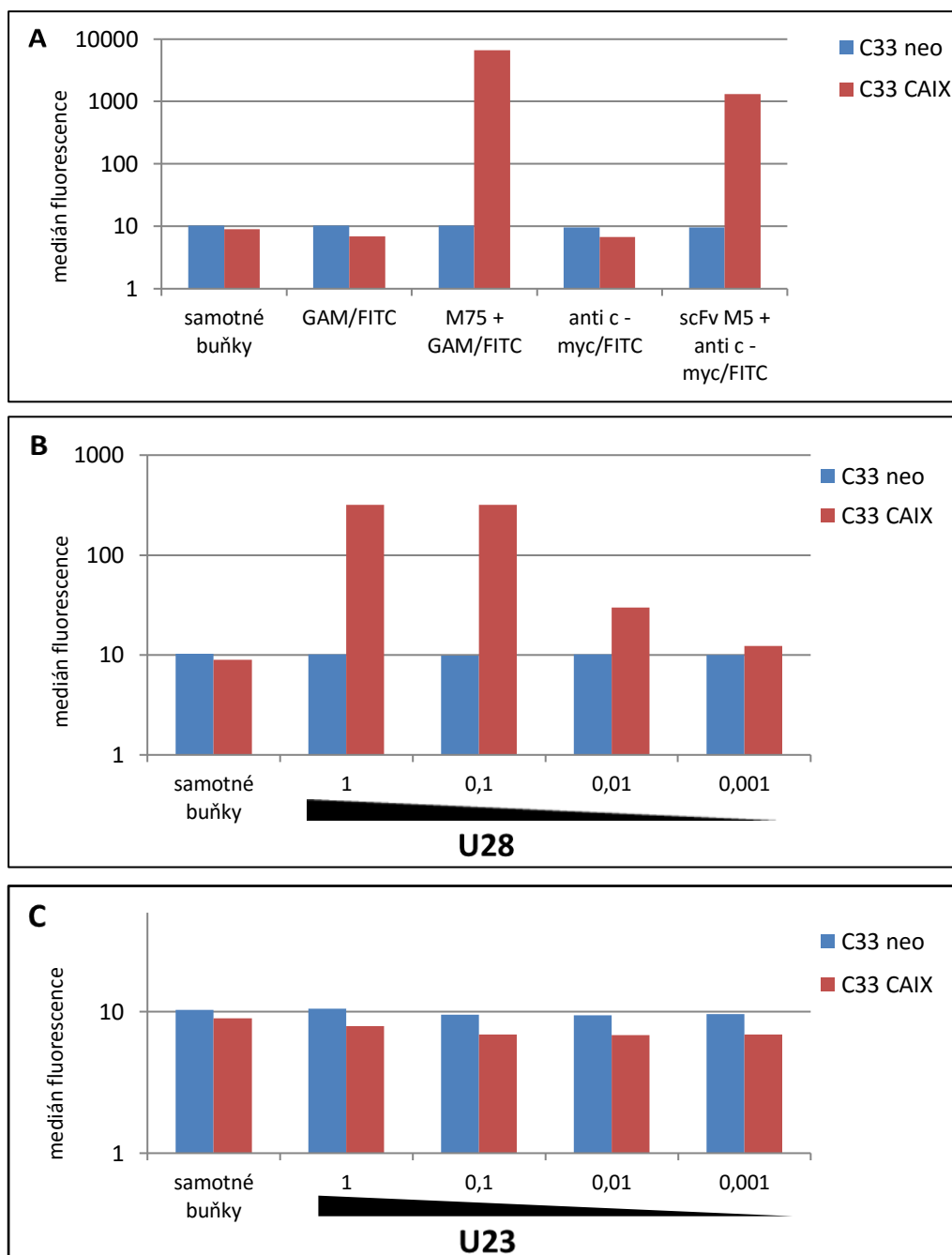
6.2.2.2. Vazba U28 na buňky s vneseným znakem CAIX

Pro potvrzení specifické interakce U28 s CAIX na povrchu buněk byla vybrána upravená linie lidské rakoviny děložního čípku C-33A. Tyto buňky na svém povrchu neexprimují CAIX a gen pro expresi CAIX byl do nich vnesen kotransfekcí za vzniku C33 CAIX linie a kontrolní C33 neo linie bez exprese CAIX [82]

Experiment průtokové cytometrie byl proveden podle protokolu popsánoho v kapitole 5.3.1. Testovaný polymerní konjugát U28 byl aplikován v různých koncentracích (1-1000 nM). Jako pozitivní kontrola byla aplikována primární protilátka specifická pro CAIX v kombinaci se sekundární protilátkou polyklonální GAM/FITC a jako druhá pozitivní kontrola byl použit scFv fragment M75 protilátky sekundárně značený protilátkou anti-c-myc/FITC. Negativní kontrola polymerní konjugát U23 (bez inhibitoru CAIX) byla aplikována ve stejných koncentracích jako U28 a dále byla též sledována autofluorescence na neznačených buňkách, podobně jako v předchozím experimentu na HT29 a NIH3T3 liniích. Měření bylo provedeno na průtokovém

cytometru BD FACS Calibur na pracovišti doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D., (ÚMTM, LF UPOL). Analyzována byla pouze data z populace živých buněk, která byla definovaná jako negativní populace při značení propidium jodidem.

Na obrázku 22 je graf porovnávající mediány fluorescenčního signálu u buněk linie C33 CAIX a C33 neo. Zatímco na buňkách C33 CAIX můžeme pozorovat signifikantní rozdíl v hodnotě fluorescenčního signálu při použití polymerního konjugátu U28 o koncentracích $1\mu\text{M}$ a $0,1\mu\text{M}$ a nepatrný rozdíl signálů u koncentrace $0,01\mu\text{M}$ v porovnání s buňkami C33 neo bez exprese CAIX (obrázek 22B), není pozorován žádný rozdíl fluorescenčního signálu u polymerního konjugátu U23, ať už v porovnání se signálem buněk C33 neo, či s autofluorescenčním signálem neznačených buněk (obrázek 22C). U pozitivních kontrol je vidět opět značný rozdíl v kvalitě signálu na CAIX pozitivních a negativních buňkách (obrázek 22A). Průtoková cytometrie na transfekovaných liniích C33-A jasně prokázala, že polymerní konjugát U28 je schopen specifické vazby na buněčné linie, a to právě prostřednictvím molekuly CAIX.



Obrázek 22: Průtoková cytometrie linie C33-A: medián hodnot intenzit fluorescenčního signálu

Tento graf, který porovnává mediány fluorescenčního signálu u buněk C33 CAIX s pozitivní CAIX expresí (červeně), u buněk C33 neo s negativní expresí CAIX (modře) a medián autofluorescenčního signálu buněk těchto linií. **A:** zleva neznačené buňky, kontrola sekundární protilátky (buňky inkubovány pouze s GAM/FITC), buňky inkubované s primární protilátkou (M75) a sekundární protilátkou (GAM/FITC), kontrola sekundární protilátky (buňky inkubovány pouze s anti-c-myc/FITC) buňky inkubované s primární protilátkou (scFv M75) a sekundární protilátkou (anti-c-myc/FITC) **B:** zleva neznačené buněčné linie, buňky inkubované s polymerním inhibitorem U28 v různých koncentracích (1000nM, 100nM, 10nM, 1nM). **C:** zleva neznačené buněčné linie, negativní kontrola – buňky inkubované s polymerním konjugátem U23 v různých koncentracích (1000nM, 100nM, 10nM, 1nM).

6.3. Testování inhibiční aktivity a vazby inhibitorů CB23 a FD4

Díky výsledkům popsaným v předchozích kapitolách, které prokázaly schopnost polymerního konjugátu U28 vázat a inhibovat aktivitu CAIX, bylo možné dále uvažovat o zlepšování kvality specifického inhibitoru pro vývoj polymerní konjugátu druhé generace. Inhibitor JS-570, který byl vybrán pro prvotní studie, má hodnotu inhibiční konstanty pro CAIX 400nM. Proto jsme se pokusili navrhnout takové inhibitory, které by vykazovaly nižší hodnoty K_I a zároveň by jejich struktura a interakce s aktivním místem enzymu umožňovala připojení kopolymeru.

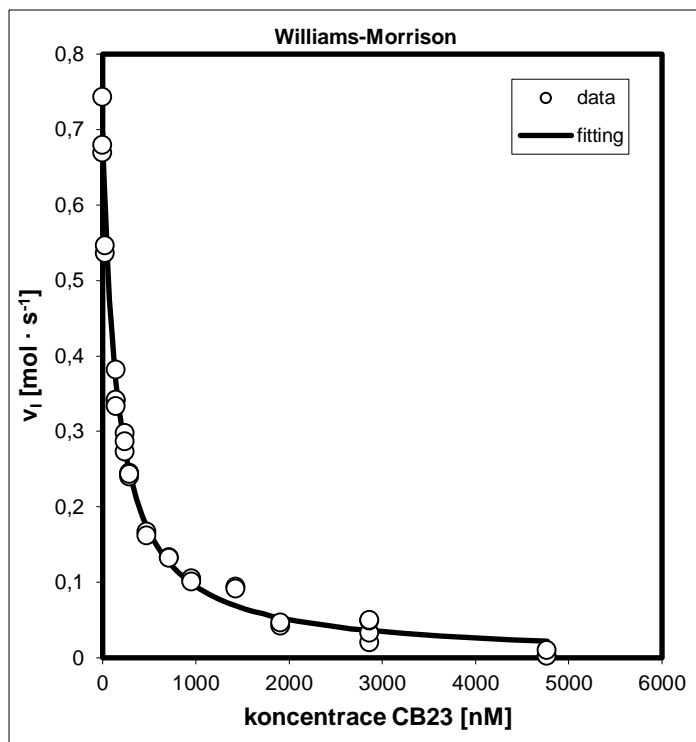
Byly vybrány dvě sloučeniny, deriváty sulfonamidů, které jsou ve školicí laboratoři k dispozici. Konkrétně se jedná o sloučeniny s kódovým označením FD4 (látka připravena v laboratoři prof. Chimirri na universitě v italské Messině) a CB24 (látka připravena v laboratoři RNDr. B. Grúnera, CSc., ÚACH AV ČR). Strukturální vzorce jsou ukázány na obrázku 14.

Schopnost inhibice byla opět zjišťována pomocí testů enzymové kinetiky a dalším cílem v této diplomové práci bylo připravit krystaly komplexu těchto látek CAII, tak aby způsob připojení inhibitorů k molekule polymeru bylo možné navrhnout na základě znalosti 3D struktury.

Výsledky testů inhibice enzymové aktivity CAII a CAIX látkami CB23 i FD4 jsou shrnuty v tabulce 2. Hodnoty K_I ukázaly výrazné zlepšení inhibičního účinku v porovnání s pilotním inhibitorem JS-570. Zatímco pro inhibitor JS-570 byla hodnota K_I pro CAIX enzym 0,41 μ M, pro CB23 je 23 nM a pro FD4 dokonce pouze 5 nM. Nedošlo ke zlepšení specifity vůči CAIX, ale pro objemné polymerní inhibitory je specifita zaručena neprostupností do buňky, a tak byly oba inhibitory CB23 a FD4 vybrány jako možní kandidáti na připojení k polymeru. Obrázek 23 ukazuje graf použitý pro odhad inhibiční konstanty pro inhibitor CB23. Pro inhibitor FD4 byla inhibiční konstanta změřena v laboratoři Alba Chimirri (Univerzita Messina, Itálie).

Tabulka 2: Inhibiční účinky látek na CAII a CAIX

K_I [nM]		
	CAII	CAIX
CB23	21 \pm 2,2	23 \pm 3,4
FD4	5 \pm 0,15	5 \pm 0,21



Obrázek 23: Inhibice katalytické aktivity CAIX látkou CB23

Záznam z průběhu měření inhibiční konstanty pro inhibitor CB23 ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci přidaného inhibitoru. **Osa x:** koncentrace inhibitoru CB23 [nM]; **osa y:** v_i – počáteční rychlost inhibované reakce [mol·s⁻¹]. Každé měření bylo provedeno ve třech opakováních.

6.3.1. Příprava krystalů komplexu CAII

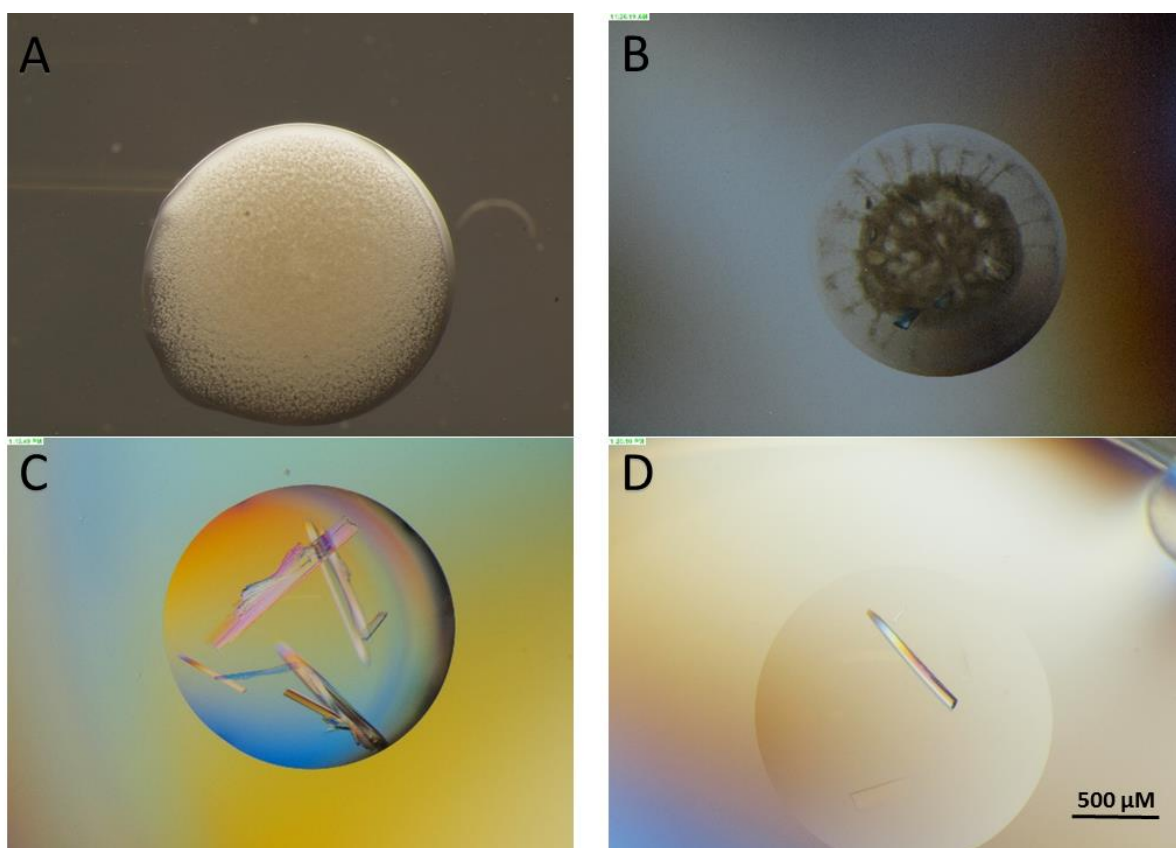
Schopnost látek CB23 a FD4 vázat se do aktivního místa karbonátlyáz byla potvrzena enzymatickými testy, kdy byla prokázána účinná inhibice enzymu oběma inhibitory. Pro zjištění strukturní informace nutné pro porozumění způsobu vazby a interakcí byla zahájena rentgenová strukturní analýza komplexů CB23 a FD4 s CAII a CAIX. Cílem této diplomové práce bylo připravit krystaly vhodné pro následnou difrakční analýzu, což se podařilo pro komplexy obou látek s izoenzymem CAII.

Komplex pro krystalizaci byl připraven smícháním rekombinantní CAII s 1 až 3,5 násobným molárním přebytkem inhibitoru. Jako precipitační roztok byl zvolen 1,6 M roztok citrátu sodného s 50 mM Tris-HCl o pH 7.8. Podmínky krystalizace byly zvoleny podle publikovaného postupu z [83], ale pro získání krystalů vhodných pro difrakční analýzu bylo nutné postup optimalizovat. Konkrétně bylo nutné optimalizovat výchozí koncentraci proteinu a molární přebytek přidávaného inhibitoru.

První krystalizační pokusy ukázaly, že ekvimolární poměr inhibitoru a proteinu není dostatečný, jelikož RTG analýza prokázala, že krystaly obsahují CAII bez navázaného

inhibitoru. Proto byl pro další krystalizační experimenty molární poměr protein:inhibitor zvyšován až na 1:3. Od více než trojnásobného molárního přebytku inhibitoru již docházelo k precipitaci proteinu (obrázek 24 A, B).

Individuální optimalizací krystalizačních podmínek byly získány krystaly pro komplex CAII s oběma inhibitory, které byly vhodné pro RTG analýzu. Konkrétně, krystal CAII (12 mg/ml) s navázaným inhibitorem FD4 byl připraven v podmínkách trojnásobného molárního přebytku inhibitoru a komplex s CB23 s dvojnásobným molárním přebytkem inhibitoru za použití krystalizačního roztoku (1,6 M roztok citrátu sodného s 50 mM Tris-HCl o pH 7.8) při teplotě 18 °C.

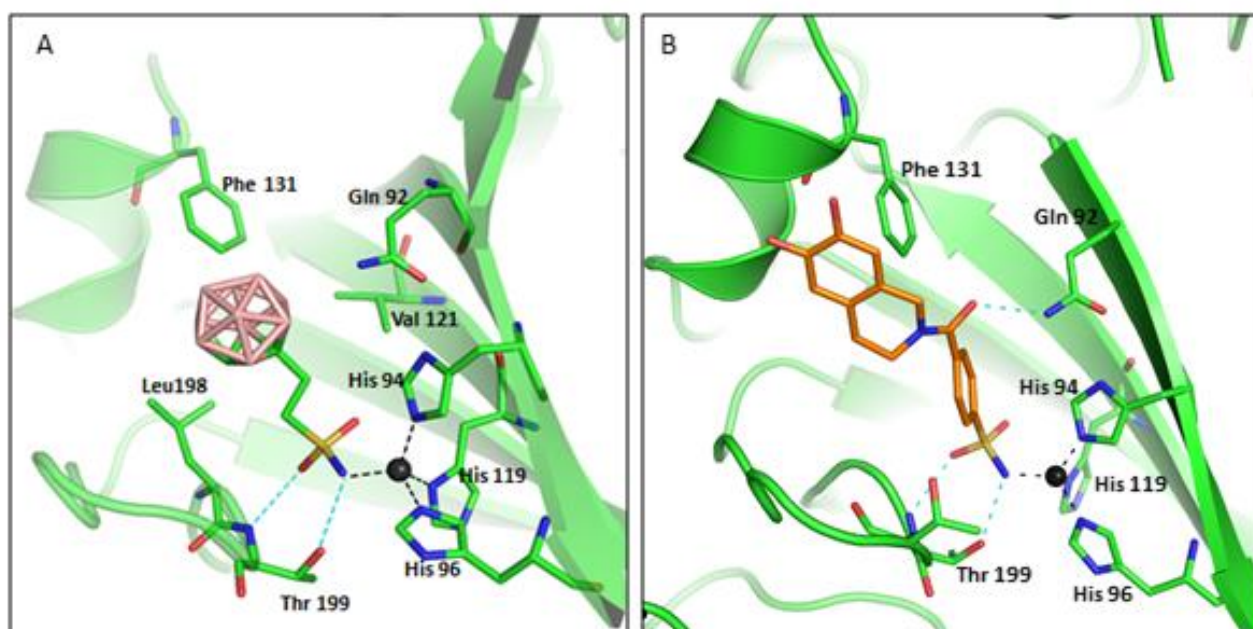


Obrázek 24: Krystalizační experimenty CAII v komplexu s inhibitorem CB23

Na obrázcích **A** a **B** je vidět precipitace proteinu způsobená vysokou koncentrací inhibitoru v kapce. **A:** poměr koncentrace CAII:CB23 byl 0,41:1,63mM, **B:** poměr koncentrace CAII:CB23 byl 0,36:1,26mM. Na obrázcích C a D jsou ukázány krystaly získané pro poměr koncentrace CAII:CB23 0,4:1mM (**C**) a 0,4:0,8mM (**D**). Přítomnost inhibitoru CB23 v krystalu byla ověřena pomocí RTG analýzy.

Krystaly komplexu CAII s FD4 a CB23 byly použity k nasnímání kompletní sady difrakčních dat na zdroji synchrotronového záření BESSY v Berlíně a posléze byly určeny krystalové struktury metodou molekulárního nahrazení a upřesněny na rozlišení 1,35 Å (komplex CAII s FD4) a 1,37 Å (komplex CAII s CB23). RTG analýza, která byla provedena doc. Jířím Bryndou, CSc., ve školící laboratoři a poskytla informace o způsobu vazby inhibitorů CB23 a FD4 do kapsy aktivního místa enzymu. Struktura CAII v komplexu s FD4 byla uložena do databáze proteinových struktur PDB [16] pod kódem 4Z1K a stala se součástí publikace o vývoji CA inhibitorů, která je uvedena jako Příloha 1 této práce [96].

Na obrázku 25 je znázorněn detail aktivního místa CAII s navázanými inhibitory připravený ze souřadnic výsledných krystalových struktur.



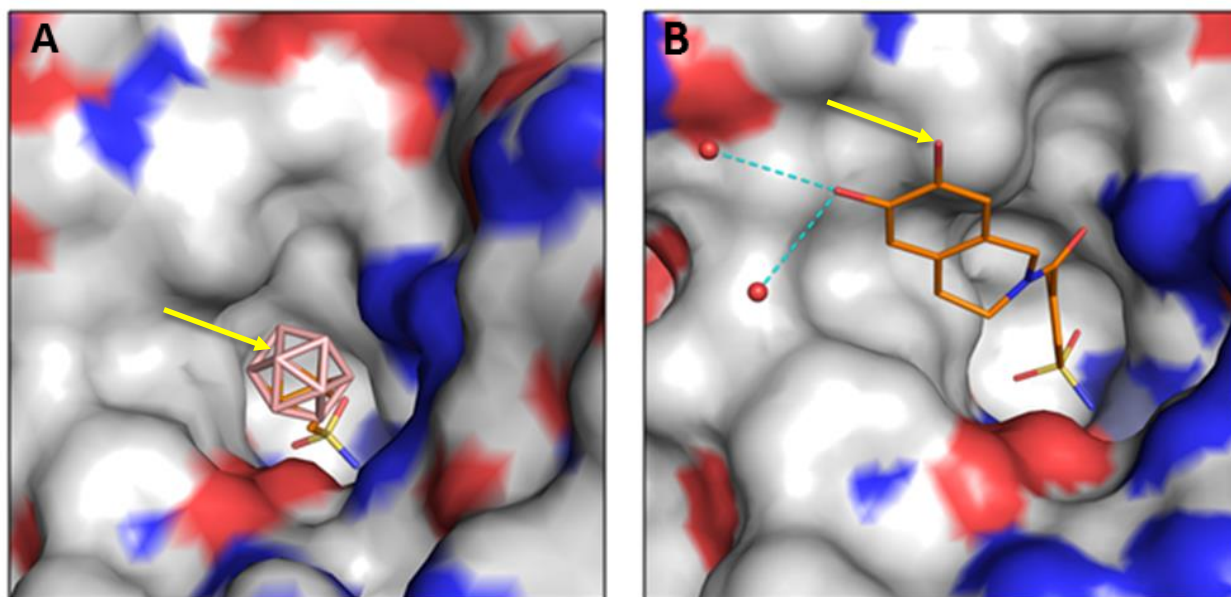
Obrázek 25: Krystalové struktury CAII v komplexu s CB23 anebo FD4

Detail aktivního místa enzymu CAII (kationt Zn^{2+} jako černá kulička je koordinovaný třemi histidinovými zbytky His94, His96, His119; atomy uhlíků zeleně; dusíky modře; kyslíky červeně). Na obrázku A je vázán v aktivním místě enzymu inhibitor CB23 (atomy bóru růžově, uhlíku zeleně, atomy síry žlutě). Na obrázku B je vázán v aktivním místě enzymu inhibitor FD4 (atomy uhlíku oranžově, atomy síry žlutě). Aminokyselinové zbytky, které jsou v interakci s inhibičním ligandem, jsou popsány. Vodíkové můstky jsou znázorněny přerušovanými čarami tyrkysové barvy. Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. [14].

Oba inhibitory obsahují jako hlavní inhibiční složku zbytek molekuly sulfonamidu, která velmi podobně interaguje s kationtem Zn^{2+} v aktivním místě. Jak je vidět na obrázku 20, zinečnatý kationt je v aktivním místě enzymu koordinován třemi histidinovými zbytky, konkrétně jsou to histidin 94, histidin 119 a histidin 96, přičemž každý tvoří s kationtem Zn^{2+} jednu koordinační vazbu. Čtvrtou interakcí v koordinační sféře iontu po navázání inhibitoru do

aktivního místa je interakce Zn^{2+} s amidovou skupinou sulfonamidu. Tato polární interakce je bez navázaného inhibitoru vyhrazena pro vazbu substrátu. Druhý vodíkový ion amidové skupiny inhibitoru dále vytváří polární interakci s postranním řetězcem aminokyselinového zbytku treoninu 199. Aminoskupina hlavního řetězce treoninu 199 dále interaguje prostřednictvím dalšího vodíkového můstku se zbytkem sulfonamidu na molekule obou inhibitorů. Molekula FD4 navíc tvoří vodíkový můstek s aminokyselinovým zbytkem glycinu 92. Kromě polárních interakcí tvoří těla inhibitorů řadu nepolárních interakcí s aminokyselinovými zbytky v aktivním. Tyto nepolární interakce jsou hojnější v interakci molekuly inhibitoru CB23. Jedná se především o zbytky aminokyselin fenylalaninu 131, leucinu 198, ale také valinu 121, které interagují s bórovým klastrem.

Trojrozměrné struktury byly podrobeny strukturní analýze s cílem vytipovat na molekulách inhibitorů místa vhodná pro připojení linkeru, tak aby stericky nebránil vazbě do aktivního místa enzymu. Na obrázku 26, kde je aktivní místo znázorněno jako vodě přístupný povrch proteinu, je vidět aktivní místo enzymu, které obsahuje ve své dutině inhibitory CB23 (obrázek 26A) a FD4 (obrázek 26B).



Obrázek 26: Strukturou inspirovaný návrh pro připojení kopolymeru na látky CB23 a FD4

Povrch proteinu CAII je vybarven podle typu povrchových atomů (uhlík bíle, kyslík červeně, dusík modře). V kónické dutině aktivního místa je vidět umístění inhibitorů. A v aktivním místě enzymu je navázán inhibitor CB23 (atomy bóru růžově, uhlíku zeleně, atomy síry žlutě). V aktivním místě je navázán inhibitor FD4 (atomy uhlíku oranžově, atomy síry žlutě). Žluté šipky směřují k místu možného napojení pro molekulu kopolymeru. Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1 [14].

Na rozdíl od inhibitoru CB23 vyplňuje inhibitor FD4 dutinu aktivního místa až k jejímu vstupu, kde je zapojen do polárních interakcí se dvěma molekulami vody (na obrázku 26B znázorněny jako červené kuličky). Molekula inhibitoru CB23 naopak sedí v kapse aktivního místa (obrázek 26B). Žluté šípky na obrázku 26 znázorňují místa vhodná pro možnou modifikaci molekuly kopolymerem. U inhibitoru CB23 se jako nejvhodnější ukázal atom bóru na špici klece. Pro molekulu FD4 je tímto možným kandidátem kyslík hydroxylové skupiny na uhlíku 6.

7. DISKUZE

V první části diplomové práce byl podle optimalizovaného expresního a purifikačního protokolu popsaného v kapitole 5.1 připraven rekombinantní protein CAII kapitola 6.1. K expresi byl použit kmen *E. coli* BL21(DE3), indukce exprese rekombinantního proteinu byla provedena přidáním indukčního činidla (IPTG). Následná produkce CAII a její akumulace v cytosolu nebyla pro bakterie výrazně toxická, a tak růst bakterií pokračoval až do ukončení kultivace (obrázek 15).

Rekombinantní produkt byl v bakteriálních buňkách přítomen jak v rozpustné, tak v nerozpustné frakci (obrázek 17). Protein byl ale izolován pouze z frakce rozpustné. Důvodem tohoto rozhodnutí byl fakt, že v rozpustné frakci se nachází správně sbalený protein, zatímco v nerozpustné frakci je protein ve formě nerozpustných agregátů, tzv. inkluzních tělísek. Izolace rekombinantního produktu z nerozpustné frakce zahrnuje solubilizaci těchto tělísek v denaturačním činidle a následnou renaturaci proteinu *in vitro*. Tento postup má zpravidla nízkou výtěžnost a je experimentálně i časově náročnější.

Purifikace CAII z rozpustné frakce byla prováděna afinitní chromatografií na sulfonamidové koloně, a poté byl produkt dialýzou dále přečištěn a převeden do pufru vhodného pro následné analýzy. Celkový výtěžek byl 83,4 mg proteinu na 1 l bakteriální kultury. Byl tak získán produkt v dostatečném množství pro testování inhibiční aktivity tak pro krystalizační pokusy. Výtěžek získaného proteinu je srovnatelný s výtěžky publikovanými v literatuře pro expresi rekombinantní CAII v bakteriálním expresním systému [97–99].

V druhé části práce byla testována specifická vazba polymerního konjugátu U28 na nádorově specifickou izoformu CAIX. Nejprve byly provedeny *in vitro* testy, při kterých byl sledován inhibiční účinek konjugátu na enzymovou aktivitu rekombinantních enzymů CAIX a CAII (kapitola 6.2.). Polymerní konjugát U28 je do aktivního místa karbonátlyáz cílen pomocí sulfonamidového inhibitoru CAII, sloučeniny JS-561. Pro připojení na polymer byla sloučenina JS-561 modifikována linkerem za vzniku JS-570 (vzorci sloučenin jsou na obrázku 13). Pro tyto dvě výchozí látky byl též sledován jejich inhibiční účinek na CAIX a CAII.

Inhibiční konstanta byla pro JS-561 byla 0,13 a 0,17 μM pro izoenzymy CAII a CAIX (tabulka 1). Po modifikaci linkerem došlo k mírnému zhoršení hodnot K_i látky JS-570 na 0,2 a 0,41 μM pro izoenzymy CAII a CAIX. Polymerní konjugát U28 inhiboval CAIX s inhibiční konstantou 0,6 μM . Výsledky ukázaly u konjugátu U28 schopnost vazby do aktivního místa CAIX. Důvod zhoršené inhibiční aktivity konjugátu oproti mateřskému inhibitoru není objasněn a předpokládá se především vliv reakčních podmínek *in vitro* testu.

Pro ověření vazby konjugátu U28 na CAIX na buněčném povrchu bylo využito fluorochromu ATTO488 přítomného v konjugátu U28 pro přímou detekci fluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrií. Vazba konjugátu U28 byla porovnávána s vazbou CAIX specifické monoklonální protilátky M75 a jejího jednořetězcového fragmentu scFv M75.

U buněk lidského kolorektálního karcinomu HT29 byla konfokální mikroskopii prokázána vazba U28 na plasmatickou membránu, kde je CAIX v této linii přirozeně exprimována. Stejná lokalizace fluorescenčního signálu byla pozorována pro protilátku M75 (v kombinaci se sekundární protilátkou značenou FITC). Naopak U28 ani protilátka M75 se nevázaly na buněčné linie myších fibroblastů NIH3T3 bez exprese CAIX (obrázek 21).

Vazba U28 na buněčný povrch byla dále sledována průtokovou cytometrií, a to jak na dvojici buněčných linií přirozeně exprimující a neexprimující CAIX (výše zmíněné linie HT29 a NIH3T3), tak na dvojici identických buněčných linií odvozených od karcinomu děložního čípku C33-A, které se odlišují pouze v expresi CAIX znaku, jehož gen byl do buněk uměle vnesen [82].

Testy prokázaly specifickou schopnost U28 vázat CAIX na CAIX pozitivní linie HT29 i C33 CAIX a ne na linie bez exprese CAIX. Podobný výsledek byl pozorován pro protilátku M75 a její fragment scFv M75 (obrázky 19, 20 a 22).

Porovnání úrovně signálů konjugátu U28 a protilátky M75 ukázalo velký rozdíl (obrázek 20 a 22), který je způsoben několika faktory. Jde jednak o použití odlišných fluorescenčních značek: ATTO488 v případě polymerního inhibitoru U28 a FITC v případě protilátek. Další rozdíl je i ve způsobu detekce fluorescenčního signálu. Zatímco polymerní konjugát U28 obsahuje fluorescein přímo ve své molekule a značí cílovou strukturu primárně, je pro detekci vazby kontrolní protilátky nutné aplikovat také sekundární protilátku. Jako sekundární protilátka pro M75 bylo použito polyklonální sérum proti celému IgG M75 GAM/FITC, tudíž není znám přesný počet molekul, které interagují s M75 a dále dochází ke značné amplifikaci signálu. Epitop protilátky M75 se nachází v PG doméně molekuly zatímco polymerní konjugát U28 je inhibitorem JS-570 cílen do aktivního místa katalytická domény. Protilátka M75 na PG doménu váže na více míst, protože se zde motiv epitopu několikrát opakuje a dochází tak dalšímu zesílení signálu. Uvedené rozdíly naznačují, že fluorescenční signál polymerního konjugátu U28 a protilátky M75 nelze porovnávat kvantitativně, ale pouze kvalitativně.

Po prokázání CAIX zprostředkované vazby polymerního konjugátu U28 na CAIX buněčné linie se naše pozornost zaměřila na výběr specifického inhibitoru pro vývoj

polymerního konjugátu druhé generace. Byly provedeny *in vitro* enzymatické testy (kapitola 6.3) a vybrány dvě látky CB23 a FD4 (vzorce na obrázku 14) které obě prokázaly řádové zlepšení inhibiční konstanty v porovnání s pilotním inhibitorem JS-570 polymerního konjugátu U28 (tabulka 2). Ačkoli vybrané inhibitory nevykazují specifitu pro CAIX oproti CAII enzym, očekává se, že tuto specifitu zajistí polymer, který nedovolí vstup do buňky.

Pro návrh vhodného místa připojení inhibitorů CB23 a FD4 na polymerní konjugát je výhodou znalost trojrozměrné struktury. Tato ukáže, které atomy na inhibitoru nejsou zapojeny do interakce s aktivním místem enzymu a kde by případná modifikace nebránila vazbě a nezhoršovala tak vazebnou afinitu. V rámci této diplomové práce byly připraveny krystaly komplexu inhibitorů CB23 a FD4 s rekombinantní CAII. Krystaly vhodné pro snímání difrakčních dat pro RTG analýzu byly připraveny modifikací publikovaného postupu [83]. Jako zásadní faktor, který bylo nutno optimalizovat, se ukázal poměr proteinu a inhibitoru (viz kapitola 6.3.1).

Krystalové struktury poskytly informace o způsobu vazby inhibitorů CB23 a FD4 do kapsy aktivního místa CAII (obrázek 24). Strukturální analýza identifikovala důležité interakce, a tak díky tomu bylo možné navrhnout místa vhodná pro připojení polymerního konjugátu k inhibitorům CB23 a FD4 (obrázek 26). Tento návrh bude v budoucnu využit k přípravě druhé generace polymerních konjugátů cílících na CAIX pro fluorescenční značení rakovinných buněk.

8. ZÁVĚR

V literární rešerši byly shrnuty informace o lidských karbonátlyázách. Byl uveden fyziologický výskyt, funkce a dále účast jednotlivých izoenzymů v různých patologických procesech. Zvláštní pozornost byla zaměřena na karbonátlyázy II a IX, kdy u obou izoenzymů byly uvedeny informace o jejich trojrozměrné struktuře. CAIX izoenzym byl dále popsán jako nádorový marker a možný cíl pro nádorovou diagnostiku a terapii. Dále byly shrnuty informace o současných možnostech nádorové léčby, známých protilátkách a o inhibitorech CAIX a jejich modifikacích.

V experimentální části byl vypracován postup exprese a izolace rekombinantního proteinu CAII z rozpustné cytosolické frakce *E. coli*. Pomocí afinitní chromatografie na sulfonamidové koloně byl získán rekombinantní produkt v dostatečném množství a čistotě,

kteřá byla více než 95%. Získaný protein byl charakterizován pomocí SDS-PAGE analýzy a aktivita enzymu byla ověřena testem enzymatické aktivity. Rekombinantní expresí bylo získáno celkem 250,2 mg nativního enzymu CAII (na 11 bakteriální kultury 83,4g proteinu).

Byly provedeny testy inhibičních vlastností polymerního konjugátu U28 a jeho komponent pro enzym CAII a CAIX. Bylo zjištěno, že testovaný konjugát je schopen inhibice enzymu CAIX, a tak byla prokázána jeho vazba do aktivního místa.

Dále byla testována schopnost vazby polymerního konjugátu na CAIX v buněčných kulturách. Vazba byla testována na různých buněčných liniích pomocí průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie. Nejprve byly provedeny obě techniky na odlišných liniích, a to na linii HT29 (lidský kolorektální karcinom s pozitivní expresí znaku CAIX) a linii NIH3T3 (myší fibroblasty bez exprese CAIX). Byla prokázána vazba testovaného konjugátu U28 pouze na linii s pozitivní expresí CAIX, tedy na linii kolorektálního karcinomu, ale ne na linii myších fibroblastů. Stejně linie byly použity i pro konfokální mikroskopii. Také touto metodou byla potvrzena vazba U28 pouze na buňky linie HT29. Druhý experiment průtokové cytometrie podpořil hypotézu, že polymerní konjugát U28 se váže na buněčné linie právě prostřednictvím CAIX znaku. Tento experiment byl proveden na linii lidského karcinomu děložního čípku, která byla transfekcí upravena na linii C33 CAIX (pozitivní exprese CAIX) a linii C33 neo (bez exprese CAIX). Tímto experimentem byla prokázána pouze vazba U28 na linii s expresí CAIX (C33 CAIX). Během průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie byla vazba U28 kvalitativně porovnávána s vazbou monoklonální protilátky M75 a jejího fragmentu scFv M75.

Potvrzením vazby U28 na CAIX se otevřela cesta k vývoji polymerních konjugátů s lepšími inhibičními vlastnostmi. V rámci této práce byly proto testovány nové inhibitory CAIX a byly vybrány dvě látky, CB23 a FD4, které vykazovaly výrazně lepší hodnoty inhibičních konstant než inhibitor, který je součástí polymerního konjugátu U28. Obě látky byly následně ko-krystalizovány s CAII pro RTG studii a díky úspěšným krystalizačním experimentům byla vyřešena struktura, která umožnila navrhnout způsob připojení kopolymeru k látkám CA23 a FD4.

Diplomová práce je řešena v rámci dlouhodobého projektu školicí laboratoře, jehož cílem je vývoj inhibitorů karbonátlyázy IX. V této práci byla ověřena možnost modifikovat specifické inhibitory CAIX pomocí kopolymeru a poskytuje strukturní informace pro budoucí návrh takové modifikace.

9. SEZNAM LITERATURY

- [1] MELDRUM, N & ROUGHTON, F J. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J Physiol* [online]. 1933, roč. 80, č. 2, s. 113–142. ISSN 0022-3751. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16994489>
- [2] SUPURAN, C. T. & SCOZZAFAVA, A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry [online] 2007, ISBN 0968-0896 Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2007.04.020
- [3] SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [online]. 2010, roč. 20, č. 12, s. 3467–74. ISSN 1464-3405. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.009
- [4] PASTOREKOVA, S & ZAVADA, J. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer-therapy*. 2004, roč. 2, s. 245–262.
- [5] ZAVADA, J., ZAVADOVA Z., PASTOREKOVA, Z., CIAMPOR F., PASTOREK J. & ZELNIK, V. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. In: *International Journal of Cancer*. 1993, s. 268–274.
- [6] ALTERIO, V., DI FIORE A., D'AMBROSIO, K., SUPURAN T. & DE SIMONE, G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? [online]. 2012. ISBN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr200176r
- [7] EICHHORN, M. Mode of action, clinical profile and relevance of carbonic anhydrase inhibitors in glaucoma therapy. *Klin Monbl Augenheilkd* [online]. 2013, roč. 230, č. 2, s. 146–149. Dostupné z: doi:10.1055/s-0032-1328163
- [8] WINUM, J. Y., THIRY, A., EL CHEIKH, K., MONTERO, J., VULLO, D., SCOZZAFAVA, A., MASEREEL, B. & SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of isoforms I, II, IV, VA, VII, IX, and XIV with sulfonamides incorporating fructopyranose-thioureido tails. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007, roč. 17, č. 10, s. 2685–2691.
- [9] PARKKILA, S, KAUNISTO, K., RAJANIEMI., KUMPULAINEN, T., JOKINEN, J. & RAJANIEMI, H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* [online]. 1990, roč. 38, č. 7, s. 941–7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113069>
- [10] DAVENPORT H. W. Gastric carbonic anhydrase. *Journal of Physiology*. 1939, č. s. 32–43.

-
- [11] CAMMER, W. B., BRION, L. P., Carbonic anhydrase in the nervous system. *Experientia Supplementum*. 2000, s. 475–489.
- [12] LEHENKARI, P., HENTUNEN A., LAITALA-LEINONEN, T., JUHA TUUKKANEN & VÄÄNÄNEN, K. Carbonic Anhydrase II Plays a Major Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Effecting the Steady State Intracellular pH and Ca²⁺. *Experimental Cell Research* [online]. 1998, roč. 242, č. 1, s. 128–137. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448279894071X>
- [13] KRISHNAMURTHY, V. M., KAUFMAN, G.K., WEIBEL, D.B., Whitesides, G.M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem Rev.* 2008, roč. 3, č. 108, s. 946–1051.
- [14] DELANO W. L. PyMOL www.pymol.org [online]. Dostupné z: <https://www.pymol.org/>
- [15] BRYNDA, J. & REZACOVA, P. Carborane-based carbonic anhydrase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, roč. 52, č. 51, s. 13760–13763.
- [16] HAMILTON, W., PDB www.pdb.org [online]. Dostupné z: <http://www.pdb.org/pdb>
- [17] PASTOREKOVÁ, S., ZÁVADOVÁ Z, KOSTÁL, M., BABUSBUSIKOVÁ, O. & ZÁVADA, J. UOCHB. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology*. 1992, roč. 187, č. 2, s. 620–626.
- [18] PASTOREKOVA, S., PARKKILA, J., Pastorek. Carbonic Anhydrase IX, MN/CA IX: Analysis of Stomach Complementary DNA Sequence and Expression in Human and Rat Alimentary Tracts. *Gastroenterology*. 1997, roč. 112, č. 2, s. 398–408.
- [19] SAARNIO, J., PARKKILA, S., Parkkila, A. K. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *Histochem Cytochem.* 1998, č. 46, s. 497–504.
- [20] KIVELÄ, J., PARKKILA, S., SAARNIO, J., KARTTUNEN, T. J. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochemistry and cell biology*. 2000, roč. 114, s. 197–204.
- [21] IVANOV, S., LIAO S., IVANOVA A., DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A., TARASOVA, N., WEIRICH, G, MERRILL, M. J., PROESCHOLDT, A. Expression of Hypoxia-Inducible Cell-Surface Transmembrane Carbonic Anhydrases in Human Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2001, roč. 158, č. 3, s. 905–919.
- [22] DE SIMONE, G, & SUPURAN, C. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochimica et Biophysica*

Acta - Proteins and Proteomics [online]. 2010, roč. 1804, č. 2, s. 404–409. ISSN 15709639 (ISSN). Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2009.07.027

[23] ALTERIO, V., HILVO, M., DI FIORE, A., SUPURAN C. T., PAN, Seppo, P., PARKKILA, SCALONI, A., PASTOREK, J., PASTOREKOVA, S., PEDONE, C., SCOZZAFAVA, A., MONTI S. & DE SIMONE, G. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, roč. 106, č. 38, s. 16233–16238.

[24] MAHON, B. P., PINARD, A. a & MCKENNA, R. Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2015, roč. 20, č. 2, s. 2323–48. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20022323

[25] WARBURG, O., POSENER, K., Negelein E. ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem Z*. 1924, roč. 152, s. 319–344.

[26] BRAHIMI-HORN, M., CHICHE J., & POUYSSÉGUR, J. Hypoxia and cancer. 2007

[27] Dongjun, L., WANG, Z., WU, J., JIANG, CH. & WU, J. The role of hypoxia inducible factor-1 in hepatocellular carcinoma. B.m.: Hindawi Publishing Corporation. 2014

[28] PORPORATO, P. E., DHUP, S., DADHICH, R. K., COPETTI, T. & SONVEAUX, P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*. 2011, roč. AUG.

[29] STUBBS, M., MCSHEEHY, P., GRIFFITHS J., & BASHFORD, C. J. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today*. 2000, roč. 6, č. 1, s. 15–19.

[30] POULSEN, S. A. Carbonic anhydrase inhibition as a cancer therapy: a review of patent literature, 2007 - 2009. *Expert opinion on therapeutic patents* [online]. 2010, roč. 20, č. 6, s. 795–806. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2010.484803

[31] BENEJ, M., PASTOREKOVA, S. & PASTOREK, J. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. *Subcell Biochem* [online]. 2014, roč. 75, s. 199–219. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7359-2_11

[32] ZÁVADA, J., ZÁVADOVÁ, Z., Pastorek, J. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer*. 2000, roč. 82, č. 11, s. 1808–1813.

[33] SVASTOVÁ, E., ZILKA, N., ZAT'OVICOVÁ, M. & PASTOREKOVÁ, S. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-

-
- catenin. *Experimental cell research* [online]. 2003, roč. 290, č. 2, s. 332–45. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:S0014482703003513 [pii]
- [34] IVANOV, S. V., KUZMIN, I., WEI, M. H., PACK, S., GEIL, L., JOHNSON. B., STANBRIDGE, E. J., & LERMAN, M. I. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1998, roč. 95, č. 21, s. 12596–601. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [35] PARKKILA, S., RAJANIEMI, H., PARKKILA, A., KIVELA, J., WAHEED, A., PASTOREKOVA, S., PASTOREK, J. & SLY W. S. Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2000, roč. 97, č. 5, s. 2220–4. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [36] TANAKA, N., KATO, H., INOSE, H., KIMURA & FARIED, M. Expression of carbonic anhydrase 9, a potential intrinsic marker of hypoxia, is associated with poor prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2008, roč. 99, č. 9, s. 1468–1475.
- [37] CHIA, S. K., WYKOFF, C., WATSON, P., HAN, C., LEEK, R. D., PASTOREK, J., & HARRIS, A. L. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2001, roč. 19, č. 16, s. 3660–3668.
- [38] KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., SIVRIDIS, E., SIMOPOULOS, K., PASTOREK, J., WYKOFF, C. C., GATTER K. C. & HARRIS, A. L. Hypoxiaregulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2001, roč. 7, č. 11, s. 3399–3403.
- [39] LONCASTER, J. A., HARRIS, A. L., DAVIDSON, S. E., LOGUE, J. P., HUNTER, R. D. , WYCOFF, C. C., PASTOREK, J., & WEST, M. L. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: Correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Research*. 2001, roč. 61, č. 17, s. 6394–6399.

-
- [40] BUI, M., SELIGSON, D., HAN, D., PANTUCK, A. J., DOREY, F. J., HUANG, Y., HORVATH, S., LEIBOVICH, B. C, & BELLDEGRUN, A. S. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003, roč. 9, č. 2, s. 802–811. ISSN 1078-0432.
- [41] HAAPASALO, J., Kristiina A., NORDFORS. M., HILVO, M., RANTALA, I. J.. SOINI, Y., PARKKILA, A. K., PASTOREKOVÁ, S., PASTOREK, J., PARKKILA, S., & HAAPASALO, H. K. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clinical Cancer Research*. 2006, roč. 12, č. 2, s. 473–477.
- [42] BRENNAN, D. J., JIRSTROM, K., KRONBLAD. R. C., MILLIKAN, A., LANDBERG, & O'BRIEN, S. CA IX is an independent prognostic marker in premenopausal breast cancer patients with one to three positive lymph nodes and a putative marker of radiation resistance. *Clinical Cancer Research*. 2006, roč. 12, č. 21, s. 6421–6431.
- [43] BELLDERGUN, A., CHAMIE, K., KLOEPHER, P. A randomized double blind phase III study to evaluate adjuvant cG250 treatment versus placebo in patients with high-risk RCC-Results and implications for adjuvant clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013, roč. 31, s. 450–457.
- [44] MURRI - PLESKO, M. T., HULIKOVA, A., OOSTERWIJK, E., SCOTT, A., ZORTEA, A, HARRIS, L., RENNER, C. Antibody inhibiting enzymatic activity of tumourassociated carbonic anhydrase isoform IX. *European Journal of Pharmacology*. 2011, roč. 657, č. 1-3, s. 173–183.
- [45] XU, Ch., LO, A., YAMMANURU, A., TALLARICO, A. S., BRADY, K., MURAKAMI, A., & MARASCO, W. A. Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology. *PLoS ONE*. 2010, roč. 5, č. 3.
- [46] AHLKOG, J. K., SCHLIEMANN, J. C., MÅRLIND, J., QURESHI, U., AMMAR, A., PEDLEY, R. B. & NERI, D. Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *British journal of cancer*. 2009, roč. 101, č. 4, s. 645–657.
- [47] OOSTERWIJK, E. D., RUITER, J., HOEDEMAEKER, P. J., PAUWELS, E. K., JONAS, U., ZWARTENDIJK, J. & WARNAAR, S. O. Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 1986, roč. 38, č. 4, s. 489–494.

-
- [48] ZATOVICOVA, M., JELENSKA, L., HULIKOVA, A., DITTE, P., DITTE, Z., & PASTOREKOVA, S. Monoclonal antibody G250 targeting CA IX: Binding specificity, internalization and therapeutic effects in a non-renal cancer model. *International Journal of Oncology*. 2014, roč. 45, č. 6, s. 2455–2467. ISSN 1019-6439.
- [49] GRABMAIER, K., VISSERS, J. L., Mirjam, M., DE WEIJERT, C., Jeannette A., OOSTERWIJK-WAKKA, C. & OOSTERWIJK, E. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *International Journal of Cancer*. 2000, roč. 85, č. 6, s. 865–870.
- [50] BELLDEGRUN A., CHAMIE, K., STÖRKEL, S., et al. ARISER: A randomized double blind phase III study to evaluate adjuvant cG250 treatment versus placebo in patients with high-risk RCC-Results and implications for adjuvant clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013, roč. 31 (Suppl).
- [51] ZÁVADOVÁ, E., et al. *Onkologická imunologie*. Aeskulab. Praha: Mladá fronta, 2015. ISBN 9788020437563.
- [52] [HTTP://WWW.WILEX.DE/TECHNOLOGIES/ANTIBODIES/](http://www.wilex.de/technologies/antibodies/). WILEX radiolabelled the antibody Girentuximab with iodine-124 and developed under the product name REDECTANE®. 2001.
- [53] ZAVADOVA, Z. & ZAVADA, J. Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. *Oncology Reports*. 2005, roč. 13, č. 5, s. 977–982.
- [54] CHRASTINA, A., ZÁVADA, J., PARKKILA, S., KALUZ, S., KALUZOVÁ, M., RAJČÁNI, J., PASTOREK, J. & PASTOREKOVÁ, S. Biodistribution and pharmacokinetics of ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma. *International Journal of Cancer* [online]. 2003, roč. 105, č. 6, s. 873–881 [vid. 2016-07-18]. ISSN 00207136. Dostupné z: [doi:10.1002/ijc.11142](https://doi.org/10.1002/ijc.11142)
- [55] MCDONALD, P.C., WINUM, J., T., SUPURAN, C.T., & DEDHAR, S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget* [online]. 2012, roč. 3, č. 1, s. 84–97. ISSN 1949-2553. Dostupné z: [doi:10.18632/oncotarget.422](https://doi.org/10.18632/oncotarget.422)
- [56] SAARNIO J., PARKKILA, S., Karttunen TJ. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol*. 1998, roč. 153, č. 1, s. 279– 85.

-
- [57] IVANOV S., SY, L., MI, L., EJ, S. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001, roč. 158, č. 3, s. 905–19.
- [58] MADER, P. ; ŠTOURACHOVÁ, R. ; BRYNDA, J. ; ZÁVADA, J. Structural Studies of anti-CA IX Monoclonal Antibody M75 Fab Fragment in Complex with its Epitope Peptide No Title. In: Meeting of the Czech and Slovak structural biologists /3. /2004.
- [59] KRÁL, V., MADER, P., COLLARD, R., FÁBRY, M., HOŘEJŠÍ, M., ŘEZÁČOVÁ, P., KOŽÍŠEK, M., & BRYNDA, J. Stabilization of antibody structure upon association to a human carbonic anhydrase IX epitope studied by X-ray crystallography, microcalorimetry, and molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function and Genetics* [online]. 2008, roč. 71, č. 3, s. 1275–1287. ISSN 08873585. Dostupné z: doi:10.1002/prot.21821
- [60] JAIN, R. K. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. In: *Cancer Research* 1990.
- [61] GIVOL, D. The minimal antigen-binding fragment of antibodies--Fv fragment. *Molecular immunology* [online]. 1991, roč. 28, č. 12, s. 1379–86 [vid. 2016-07-18]. ISSN 0161-5890. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1749387>
- [62] VAN OSS, Chapter Fourteen Carel Jan – Specific Interactions in Water. In: *Interface Science and Technology* [online]. 2008, s. 187–205. ISBN 9780123743039. Dostupné z: doi:10.1016/S1573-4285(08)00214-7
- [63] DECANNIERE, K., MUYLDERMANS, S. & WYNS, L. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *Journal of molecular biology.* 2000, roč. 300, č. 1, s. 83–91.
- [64] TRAMONTANO, A. & LESK, A. M.. Common features of the conformations of antigen-binding loops in immunoglobulins and application to modeling loop conformations. *Proteins: Structure, Function and Genetics.* 1992, roč. 13, č. 3, s. 231–245.
- [65] SHIRAI H., KIDERA, A., Nakamura, H. H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Lett.* 1999, roč. 16, č. 455(1-2), s. 188–97.
- [66] NELSON, A. L. Antibody fragments: hope and hype. *mAbs* [online]. 2010, roč. 2, č. 1, s. 77–83 [vid. 2016-07-18]. ISSN 1942-0870. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093855>
- [67] KRÁL, V. ; FÁBRY, M. ; H SEDLÁČEK, J. Molecular cloning E.coli expression and purification of SCFV antibody fragments of diagnostic/therapeutic interest. In: Meeting of the Czech and Slovak Structural Biologists /2. /2003.

-
- [68] SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases as drug targets--an overview. *Current topics in medicinal chemistry* [online]. 2007, roč. 7, č. 9, s. 825–33. ISSN 1873-4294. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504127>
- [69] D'AMBROSIO, K., SMAINE, F. Z., CARTA, F., DE SIMONE & SUPURAN, C.T. Development of potent carbonic anhydrase inhibitors incorporating both sulfonamide and sulfamide groups. *Journal of medicinal chemistry* [online]. 2012, roč. 55, č. 15, s. 6776–83 [vid. 2016-07-19]. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm300818k
- [70] CARTA, F., SCOZZAFAVA, A., & SUPURAN C.T. Sulfonamides: a patent review (2008 - 2012). *Expert opinion on therapeutic patents* [online]. 2012, roč. 22, č. 7, s. 747– 58 [vid. 2016-07-19]. ISSN 1744-7674. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2012.698264
- [71] SIPPEL, K., Arthur, H., ROBBINS, H., DOMSIC, J., GENIS, C., AGBANDJEMCKENNA, M. & MCKENNA, R. High-resolution structure of human carbonic anhydrase II complexed with acetazolamide reveals insights into inhibitor drug design. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* [online]. 2009, roč. 65, č. 10, s. 992–995. ISSN 17443091. Dostupné z: doi:10.1107/S1744309109036665
- [72] MOEKER, J., MAHON, B. P., BORNAGHI, L. F., VULLO, D., SUPURAN, C.T., MCKENNA, R. & POULSEN, S. A. Structural Insights into Carbonic Anhydrase IX Isoform Specificity of Carbohydrate-Based Sulfamates. *Med. Chem* [online]. 2014, roč. 57, s. 8635–8645. Dostupné z: doi:10.1021/jm5012935
- [73] ŠUBR V., KOSTKA, L., Ulbrich J. & Ulbrich, K. Synthesis of Well-Defined Semitelechelic Poly[N -(2-hydroxypropyl)methacrylamide] Polymers with Functional Group at the α -End of the Polymer Chain by RAFT Polymerization. *Macromolecules*. 2013, roč. 46, č. 6, s. 2100–2108.
- [74] ŠÁCHA, P., KNEDLKÍK, T. & KONVALINKA, J. Antibody Mimetics iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew Chem*. 2016, roč. 55, č. 7, s. 2356–2360.
- [75] GRIMES, R. N. *Carboranes*. B.m.: Academic Press, 2011. ISBN 9780123741707.
- [76] LESNIKOWSKI, Z., Boron, J. Units as Pharmacophores - New Applications and Opportunities of Boron Cluster Chemistry. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* [online]. 2007, roč. 72, č. 12, s. 1646–1658 [vid. 2016-07-21]. ISSN 0010-0765. Dostupné z: doi:10.1135/cccc20071646

-
- [77] ISSA, F., KASSIOU, M. & RENDINA L. M. Boron in Drug Discovery: Carboranes as Unique Pharmacophores in Biologically Active Compounds. *Chem. Rev.* [online]. 2011, roč. 111, s. 5701–5722. Dostupné z: doi:10.1021/cr2000866
- [78] BRYNDA, J., MADER, P., ŠÍCHA, V., FÁBRY, M., K. & Pavlína ŘEZÁČOVÁ. Carborane-Based Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2013, roč. 52, č. 51, s. 13760–13763 [vid. 2016-07-21]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201307583
- [79] PINARD, M. A. BOONE, Ch. D., RIFE, B. D., SUPURAN, C. T. & MCKENNA, R. Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. *Bioorganic & medicinal chemistry* [online]. 2013, roč. 21, č. 22, s. 7210–5 [vid. 2016-08-01]. ISSN 1464-3391. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2013.08.033
- [80] ATCC: The Global Bioresource Center [online]. Dostupné z: doi:HT-29 (ATCC® HTB38TM)
- [81] ATCC: The Global Bioresource Center [online]. Dostupné z: doi:NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658TM)
- [82] CSADEROVA, L., DEBREOVA, M., RADVAK, P., STANO, M., VRESTIAKOVA, M., KOPACEK, J., PASTOREKOVA S. & SVASTOVA, E. The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Frontiers in Physiology*. 2013, roč. 4 OCT.
- [83] MCKENNA, R. & SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors drug design. *Subcellular biochemistry* [online]. 2014, roč. 75, s. 291–323. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146385>
- [84] OSBORNE, W. R., Tashian, R. E. An improved method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Anal Biochem*. 1975, roč. 64, č. 1, s. 297–303.
- [85] SHAPIRO, A. L. & MAIZEL, J. Molecular weight estimation of polypeptides by SDSpolyacrylamide gel electrophoresis: Further data concerning resolving power and general considerations. *Analytical Biochemistry* [online]. 1969, roč. 29, č. 3, s. 505–514. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269769903352>
- [86] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, roč. 227, č. 5259, s. 680–685.

-
- [87] OAKLEY, B. R., KIRSCH, D. R. & MORRIS, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* [online]. 1980, roč. 105, č. 1, s. 361–363. ISSN 10960309. Dostupné z: doi:10.1016/00032697(80)90470-4
- [88] TOWBIN, H. & STAEBLIN, T. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody. *Anal. Biochem* [online]. 1979, roč. 112, s. 195–203. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5
- [89] WHITAKER, J. R. & GRANUM P. E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Analytical Biochemistry* [online]. 1980, roč. 109, č. 1, s. 156–159. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/00032697(80)90024-X [90] [HTTP://WWW.EXPASY.ORG/TOOLS/PROTPARAM.HTML.](http://www.expasy.org/tools/protparam.html), Available from: ExPASy Proteomics Server. 2008.
- [91] SCOTT, K a HUGHES, R. *Industrial membrane separation technology* [online]. 1997. ISBN 0751403385. Dostupné z: doi:10.1016/S0376-7388(96)00350-X
- [92] DUROCHER, Y., PERRET, S. & KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic acids research* [online]. 2002, roč. 30, č. 2, s. E9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788735>
- [93] GIBBONS, B. H. & EDSALL J. T. Kinetic Studies of Human Carbonic Anhydrases B and C. *The Journal of biological chemistry*. 1964, roč. 239, s. 2539–2544. ISSN 00219258.
- [94] DUCRUIX, A. a GIEGÉ, R. *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*. B.m.: Oxford University Press, 1999. ISBN 9780199636785.
- [95] BD BIOSCIENCES. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide* [online]. 2000. ISBN 0471560952. Dostupné z: doi:10.1136/jcp 45.3.275-d.
- [96] BUEMI, M. R., DE LUCA, L., FERRO, S., BRUNO, E., CERUSO, M., SUPURAN, C. T., POSPÍŠILOVÁ, K., BRYNDA J., ŘEZÁČOVÁ, P. & GITTO, R. Carbonic anhydrase inhibitors: Design, synthesis and structural characterization of new heteroarylN-carbonylbenzenesulfonamides targeting druggable human carbonic anhydrase isoforms. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, roč. 102, s. 223– 232. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2015.07.049
- [97] TAO, H., BAUSCH, C., RICHMOND, C., BLATTNER, F. R. & CONWAY, T. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich

media. *Journal of bacteriology* [online]. 1999, roč. 181, č. 20, s. 6425–40 [vid. 2016-08-01]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515934>

[98] MERLIN, Ch., MASTERS, M., MCATEER S. & COULSON, A. Why Is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*? *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* [online]. 2003, roč. 185, č. 21, s. 6415–6424. Dostupné z: doi:10.1128/JB.185.21.6415– 6424.2003

[99] VENTERS, R., CALDERONE, T. L., SPICER L. D. & FIERKE, C. Uniform ¹³C isotope labeling of proteins with sodium acetate for NMR studies: application to human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* [online]. 1991, roč. 30, č. 18, s. 4491–4. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902380>.

10. PŘÍLOHA 1

Článek otištěný v European Journal of Medicinal Chemistry.