

## Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2115 / 2018

**Název projektu:** Zavedení a rozvoj biochemických metod ke studiu rekombinantních enzymů a in vitro testování jejich modulátorů

### Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: RNDr. Lucie Vinklářová, prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: RNDr. Lucie Vinklářová, Mgr. Radomír Jůza

Studenti magisterského studia na PŘF UHK: Mgr. Michaela Melíková, Mgr. Petr Bzonek, Mgr. Nikola Nováková, Bc. Anežka Novotná Bc. Eliška Chaloupková

Další výzkumní pracovníci: doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D., Mgr. Monika Schmidt, Ph.D., PharmDr. Rudolf Andrys, Ph.D., Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D., RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D., PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.

**Celková částka přidělené dotace: 396871 Kč**

Datum zahájení řešení projektu: 6. 3. 2018

Datum ukončení řešení projektu: 30. 11. 2019

**Stručný popis postupu při řešení projektu (max. 2 strany).**

Projekt specifického výzkumu se zabýval širokým spektrem metod dle zaměření diplomových a dizertačních prací zúčastněných studentů. Studenti (NMgr., Ph.D.) se zabývali tématy přípravy a testování nových sloučenin modulujících enzymy s potencionálním účinkem na nervovou soustavu.

Projekt navazuje na předchozí projekt SV (2103-2017), kde byly zavedeny metody přípravy, exprese, a purifikace rekombinantních enzymů včetně jejich testování. Tyto metody byly nyní dále rozvíjeny, optimalizovány a použity v přípravě a testování dalších enzymů. V současné době jsou úspěšně připraveny tyto enzymy: 17 $\beta$ -HSD10 (ABAD) a jeho mutanty, 17 $\beta$ -HSD1, 17 $\beta$ -HSD5, 17 $\beta$ -HSD8, MAO-A a MAO-B pro expresi v prokaryontních expresních systémech (*E. coli*); lidská butyrylcholinesterasa a acetylcholinesterasa pro expresi v savčích expresních systémech (HEK293) a komáří acetylcholinesterasa pro expresi ve hmyzích expresních systémech (SF9). Tyto enzymy byly úspěšně produkovány, purifikovány a stanovena jejich enzymová aktivita. Tyto enzymy jsou dále využívány k testování nových sloučenin modulujících jejich enzymovou aktivitu.

Rekombinantní mitochondriální enzym 17 $\beta$ -HSD-10, který byl úspěšně připraven a purifikován byl použit k testování nových molekul s inhibičním potenciálem. Vybrané sloučeniny byly podrobně zkoumány a byly změřeny inhibiční konstanty IC<sub>50</sub> vybraných molekul a určena kinetika jejich inhibice. Byly provedeny SAR (structure-activity relationship) studie vybraných skupin inhibitorů. Výsledky jsou nyní zpracovávány do publikace, která by měla být odeslána do konce roku 2019. Dále je dokončován přehledový článek o tomto enzymu, jeho roli v organismu a patogenezi neurodegenerativních onemocnění.

Na začátku roku 2018 byla navázána spolupráce s výzkumným centrem BIOCEV ve Vestci u Prahy, kde byly provedeny experimenty metodou HDX (hydrogen-deuterium exchange) zkoumající interakci enzymu 17 $\beta$ -HSD10 s vybranými látkami.

Dále byla navázána spolupráce s Fraunhofer Institute v Hamburku,

Průběžné výsledky práce byly prezentovány formou posteru na mezinárodní konferenci „43rd FEBS Congress“ v Praze a na „XVIII. International meeting of young life scientists“ v Milovech, a formou přednášky na konferenci FaF UK V Hradci Králové („9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK“).

Dále je prováděna příprava nových sloučenin cílených na nervovou soustavu s potencionálním duálním účinkem na dopaminergní a serotoninergní receptory a nižším rizikem extrapyramidových a hematologických vedlejších účinků. Tyto látky by mohly mít vhodný terapeutický efekt u schizofreních onemocnění. Jsou používány metody chemické syntézy, dělení reakčních směsí pomocí sloupcové chromatografie a NMR pro určení chemické struktur a čistoty připravených sloučenin.

Studenti NMgr. studijních programů vypracovávali své DP na různých typech enzymů, které jsou rekombinantně produkovány a jejichž modulátory jsou testovány.

Pro studium a tvorbu homologních modelů orexinového receptoru 2, molekulárně-dynamickou relaxací těchto modelů zanořených do membrány a dynamického dokování do takto získaných struktur se zahrnutím flexibility ligandu a částečně i receptoru byly použity metody výpočetní chemie a *in silico* modelování. Ze získaných dat Mgr. Melíková vypracovala diplomovou práci na téma "Molekulárně dynamické simulace receptorů spřažených s G-proteinem v počítačovém návrhu léčiv", která byla v srpnu 2019 úspěšně obhájena.

Byla stanovena farmakokinetika a farmakodynamika oximu K870 u potkanů. Sledována byla koncentrace léčiva a jeho metabolitů v plazmě, moči, játrech, žluči a ledvinách. K řešení této problematiky byly využívány metody homogenizace biologických tkání, liquid-liquid extrakce a byla vytvořena metoda pro LC-MS/MS stanovení tohoto oximu a jeho metabolitů. Ze získaných dat Mgr. Bzonek vypracoval diplomovou práci na téma „Analýza obsahu oximu K870 a jeho metabolitů v biologických vzorcích metodou HPLC-MS“, která byla v srpnu 2019 úspěšně obhájena.

Dále byla provedena inhibiční studie dvou typů enzymu monoaminoxidázy (MAO-A a MAO-B) s nově připravenými látkami s potencionálním inhibičním účinkem. Byl proveden screeningu těchto látek a u vybraných látek s nejvyšší mírou inhibice byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ . Využity byly metody stanovení enzymové aktivity a LC-MS analýza vzniklých metabolitů. Ze získaných dat Mgr. Nováková vypracovala diplomovou práci na téma „Stanovení inhibičních účinků nově připravených látek vůči lidským monoaminoxidázám“, která byla v srpnu 2019 úspěšně obhájena.

Obhájené diplomové práce jsou součástí plánovaných publikačních výstupů v rámci projektu.

## Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Cíle projektu byly splněny. Byly optimalizovány již zavedené metody práce s enzymy a tyto metody použity pro přípravu a práci s dalšími typy rekombinantních enzymů. U nově připravených enzymů byly zavedeny metody exprese, purifikace a stanovení enzymové aktivity těchto enzymů, které jsou dále využívány k testování nových inhibitorů.

Získané výsledky jsou nyní zpracovávány do publikačních výstupů.

V roce 2019 byly publikovány nebo přijaty do tisku články:

- Aitken, L.\*; Benek, O.\*; McKelvie, B.; Hughes, R.; Hroch, L.; Schmidt, M.; Major, L.L.; Vinklarova, L.; Kuca, K.; Smith, T.K.; Musilek, K.; Gunn-Moore, F. Novel benzothiazole-based ureas as 17 $\beta$ -HSD10 inhibitors, a potential Alzheimer's disease treatment. *Molecules*. **2019**, vol. 24, no. 15, p. 2757. DOI: 10.3390/molecules24152757. IF<sub>2018</sub> = 3.060, Q2 136/299, Q2 67/172
- Gorecki, L.; Andrys, R.; Schmidt, M.; Kucera, T.; Psotka, M.; Svobodova, B.; Hrabcova, V.; Hepnarova, V.; Bzonek, P.; Jun, D.; Kuca, K.; Korabecny, J.\*; Musilek, K.\* Cysteine-Targeted Insecticides against *A. gambiae* Acetylcholinesterase are neither Selective nor Reversible Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. **2020**, in press. DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00477. IF<sub>2018</sub> = 3.737, Q2 17/61 (dle AIS Q1 8/61)

V roce 2019 byly odeslány do tisku články:

- Schmidt, M.\*; Vinklarova, L.; Hrabinova, M.; Zemanova, L.; Chribek, M.; Kralova, V.; Hroch, L.; Dolezal, R.; Prchal, L.; Jun, D.; Aitken, L.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K.; Musilek, K.; Benek, O.\* Benzothiazolyl ureas are low micromolar and uncompetitive inhibitors of 17 $\beta$ -HSD10 with implications to mitochondrial related diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, submitted. IF<sub>2018</sub> = 4.833, Q1 5/61

Abstrakta posterů na konferencích byla publikována ve sbornících:

- L. Vinklarova, M. Schmidt, O. Benek, M. Hrabinova, K. Musilek; Modulation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 activity as a potential target in neurodegenerative disorders; Czech Chem. Soc. Symp. Ser 16, 1-48 (2018)
- L. Vinklarova, M. Schmidt, O. Benek, M. Hrabinova, L. Zemanova, K. Musilek; Study of 17 $\beta$ -HSD10 inhibitors with implications in neurodegenerative disorders; FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1), 256 (2018), DOI: 10.1002/2211-5463.12453
- L. Vinklarova, M. Schmidt, O. Benek, L. Zemanova, K. Musilek; 17 $\beta$ -HSD10 inhibitors as a potential therapy in neurodegenerative disorders; 9<sup>th</sup> Postgraduate and 7<sup>th</sup> Postdoc Conference Book of Abstracts, Faculty of Pharmacy n Hradec Kralove



### Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Uvedte jen výstupy, které vznikly na základě řešení tohoto projektu. Dále uveďte, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV.

**Tab. 1** Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán 1. rok	Plán 2. rok	Plán 3. rok	Poznámka
<b>Hodnocené výstupy projektu</b>	2	1		
Jimp (databáze WoS)	0	2	1	publikováno Molecules, ACS Med. Chem. Lett. in press, odesláno Eur. J. Med. Chem.
Jsc (databáze Scopus)				
B (recenzovaná odborná kniha) <sup>1*</sup>				
C (kapitola v recenzované odborné knize)*				
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)				
P (patent)				
<b>Počet výsledků</b>	0	2	1	
<b>Nehodnocené výstupy projektu</b>				
Počet obhájených dizertačních prací				
Počet obhájených diplomových prací	1	2		Mgr. Melíková obhájila 08/2018 Mgr. Bzonek a Mgr. Nováková obhájili 08/2019
<b>Počet výsledků</b>	1	2		

#### Ke zprávě přiložte:

- kopie publikačních výstupů,
- výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem.

Datum: 28. 11. 2019

  
Podpis odpovědného řešitele:

\* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.

## Seznam literatury podle šablony ID záznamu

[1] Aitken, L., Benek, O., McKelvie, BE., Hughes, RE., Hroch, L., Schmidt, M., Major, LL., Vinklářová, L., Kuča, K., Smith, TK., Musílek, K., Gunn-Moore, FJ. Novel Benzothiazole-Based Ureas as 17 beta-HSD10 Inhibitors, A Potential Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules*. MDPI-Molecular diversity preservation international, 2019. 23s. ISSN: 1420-3049. Kód UT ISI: 000482441100080.  
Granty: CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_069/0010054.  
Spec. výzkum: S.  
Forma: J\_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU  
(ID: 43875319) (RIV ID: 50015709)

---