

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2113/2019

Název projektu: Enzymové modulátory pro výzkum neurodegenerativních onemocnění

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Žofia Chrienová, prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

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

Studenti magisterského studia na PŘF UHK: Bc. Petr Bzonek, Bc. Nikola Nováková, Bc. Anežka Novotná, Bc. Zuzana Kohoutová, Bc. Eliška Prchalová, Bc. Vojtěch Schmeiser

Další výzkumní pracovníci: prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D., Mgr. Monika Schmidt, Ph.D., Mgr. Eugenie Nepovimová, Ph.D., doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D., RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D., PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D., PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 481 600 Kč

Datum zahájení řešení projektu: 19.2.2019

Datum ukončení řešení projektu: 19.11.2020

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

Naviazaním na predošlý výskum pracovných skupín Katedry chémie, sa projekt špecifického výskumu zaoberal štúdiom enzýmov, ktorých nesprávna funkcia prispieva k vývinu neurodegeneratívnych ochorení.

Rekombinantný enzým 17 β -HSD10 (ABAD), ktorého príprava a základné testovanie boli súčasťou špecifického výskumu 2115-2018, boli testované vo vzťahu ku svojim potenciálnym inhibítorm. Bola vyvinutá spektrofleurimetrická aktivná esej s využitím 17 β -estradiolu ako substrátu. Táto esej bude využívaná k testovaniu nových inhibítorm tohto enzýmu a ich kinetík. 17 β -HSD10 bol ďalej študovaný metódou DSF (differential scanning fluorimetry) k zisteniu vhodných podmienok pre prácu s ním.

V roku 2019 bola naviazaná spolupráca s Fraunhofer Institut v Hamburgu, kde je plánované prevedenie high-throughput screening knihovní inhibítorm 17 β -HSD10.

Plánovaný prehľadový článok o úlohe 17 β -HSD10 (ABAD) v organizme a v patogenéze neurodegeneratívnych ochorení bol v roku 2020 vydaný v časopise Journal of Neurochemistry. Priebežné výsledky boli prezentované RNDr. Luciou Vinklářovou jednak formou prednášky na 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandské vedecké konferenci Farmaceutické fakulty UK a jednak formou posteru na medzinárodnej konferencii „44th FEBS Congress“ v Krakove.

Metódami molekulárnej biológie bola vyprodukovaná a purifikovaná rekombinantná forma mitochondriálneho enzýmu cyklofilin D. Zároveň bola vyvinutá *in vitro* metóda stanovenia

aktivity pre cyklofilin D. Nová spektrofotometrická esej využíva „refolding“ aktivitu cyklofilinu D za použitia substrátu RNAzy T1. Táto metóda je v kombinácii s ďalšími metódami, napríklad DSF, použiteľná pri stanovení ligand-proteínovej interakcie a inhibičnej aktivity nových látok zameraných na cyklofilin D. Článok so získanými dátami bol publikovaný v časopise Biochemistry.

Za použitia metód chemickej syntézy boli pripravené zlúčeniny s duálnym účinkom na dopaminergné a serotonergné receptory, ktoré by potencionálne niesli antipsychotický efekt v kombinácii s nižším rizikom vzniku extrapyramídových a hematologických vedľajších účinkov. Prehľadový článok k tejto problematike bol publikovaný v časopise Medicinal Research Reviews.

Zároveň boli pripravované hybridné molekuly látok spájajúce inhibičný účinok na glutamátové NMDA receptory s gabanergným účinkom. Tieto látky by mohli zohrávať novú úlohu vo výskume patogenézy neurodegeneratívnych ochorení a vplyvu rôznych molekulárnych cieľov pri týchto ochoreniach.

Diplomové práce študentov NMgr. programov sa venovali tematike rôznych enzýmov. Boli otestované pripravené potencionálne inhibítory MAO-A a MAO-B. Po skríningu látok boli u vybraných látok stanovené hodnoty IC_{50} a prevedené inhibičné štúdie za využitia metód stanovenia enzýmovej aktivity a LC-MS analýzy vzniknutých metabolitov. Dáta o inhibičnej aktivite niektorých látok na cholinesterázach a MAO boli publikované v časopise International Journal of Molecular Sciences.

Použitím metód homogenizácie biologických tkanív, liquid-liquid extrakcie a vytvorenou metódou pre LC-MS/MS boli stanovené farmakologické parametre oximu K870 u potkanov. Koncentrácia liečiva a jeho metabolitov boli sledované v plazme, játrach, žlči, v moči a v ledvinách. Zo získaných dát boli vypracované diplomové práce, ktoré boli v roku 2019 úspešne obhájené.

Ďalej študenti pracovali na príprave látok s účinkom na rôzne molekulové ciele. Viackrokovou syntézou boli pripravované monooximové bispyridinové zlúčeniny s potenciálnym účinkom na butyrylcholinesterázu. U týchto štúdií bol článok publikovaný v časopise Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry s vročením 2020 a boli vypracované a úspešne obhájené diplomové práce.

Spojením inhibičného účinku na acetylcholinesterázu s protizánětlivými účinkami boli pripravované hybridné molekuly zamerané na ciele patogenézy Alzheimerovej choroby. Na prípravu a purifikáciu boli využité metódy organickej syntézy, na analýzu získaných produktov a medziproduktov boli využité metódy NMR a hmotnostná spektrometria. Získané dáta boli spracované do diplomovej práce, ktorá bola v roku 2020 úspešne obhájená. U tohto výskumu bol článok odoslaný do časopisu Bioorganic Chemistry.

Splnění cílů řešení a přínos projektu:

Ciele projektu boli splnené. Úspešne sa naviazalo na zavedené biochemické metódy pre charakterizáciu rekombinantných foriem ľudských enzýmov. Pre novo pripravený enzým boli zavedené metódy exprese a purifikácie a metóda stanovenia jeho aktivity, ktorá je využívaná k testovaniu nových inhibítorov.

Boli pripravené nové zlúčeniny s modulačnou aktivitou na vybrané molekulárne ciele, ktorých aktivita bude testovaná a na základe získaných dát bude štruktúra vybraných látok upravená pre získanie lepších farmakokinetických i farmakodynamických vlastností.

Získané výsledky boli spracované do publikačných výstupov.

Abstrakt posteru so získanými dátami bol publikovaný v zborníku:

- L. Vinklarova, M. Schmidt, O. Benek, L. Zemanova, K. Musilek; Novel 17 β -HSD10 inhibitors as small molecules for neurodegenerative disorders or cancer; FEBS Open Bio 9 (Suppl. 1), 295 (2019), DOI: 10.1002/2211-5463.12675

Články publikované v časopisoch (študenti podčiarknutie):

1. Vinklarova L.; Schmidt, M.*; Benek, O., Kuca, K.; Gunn-Moore, F.; Musilek, K.*; Friend or enemy? Review of 17 β -HSD10 and its role in human health or disease. *Journal of Neurochemistry*, **2020**, vol. 155, no. 3, p. 231-249. <https://doi.org/10.1111/jnc.15027> IF₂₀₁₉ = 4.066, Q2 101/297 (Biochemistry & Molecular Biology), Q2 85/272 (Neurosciences)
2. Zemanova, L.*; Vaskova, M.; Schmidt, M.; Roubalova, J.; Haleckova, A.; Benek, O.; Musilek, K. Determination of mitochondrial cyclophilin D activity in vitro using RNase T1 refolding assay. *Biochemistry*, **2020**, vol. 59, no. 17, p. 1680-1687. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b01025> IF₂₀₁₉ = 2.865, Q3 169/297 (Biochemistry & Molecular Biology)
3. Juza, R.; Vlcek, P.; Mezeiova, E.; Musilek, K.; Soukup, O.*; Korabecny, J.* Recent Advances with 5-HT₃ Modulators for Neuropsychiatric and Gastrointestinal Disorders. *Medicinal Research Reviews*, **2020**, vol. 40, no. 5, p. 1593-1678. <https://doi.org/10.1002/med.21666> IF₂₀₁₉ = 9.300, D1/Q1 2/61 (Medicinal Chemistry), D1/Q1 8/271 (Pharmacology & Pharmacy)
4. Malinak, D.*; Dolezal, R.; Hepnarova, V.; Hozova, M.; Andrys, R.; Bzonek, P.; Racakova, V.; Korabecny, J.; Gorecki, L.; Mezeiova, E.; Psocka, M.; Jun, D.; Kuca, K.; Musilek, K.* Synthesis, in vitro screening and molecular docking of isoquinolinium-5-carbaldoximes as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase reactivators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2020**, vol. 35, no. 1, p. 478-488. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1710501> IF₂₀₁₉ = 4.673, Q1 9/61 (Medicinal Chemistry), Q2 72/297 (Biochemistry & Molecular Biology)
5. Bautista-Aguilera, O. M.; Ismaili, L.; Chioua, M.; Andrys, R.; Schmidt, M.; Bzonek, P.; Martinez-Grau, M. A.; Beadle, C. D.; Vetman, T.; Lopez-Munoz, F.; Iriepa, I.; Refouvelet, B.; Musilek, K.*; Marco-Contelles, J.* Acetylcholinesterase Inhibition of Diversely Functionalized Quinolinones for Alzheimer's Disease Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, vol. 21, no. 11, p. 3913. <https://doi.org/10.3390/ijms21113913> IF₂₀₁₉ = 4.556, Q1 74/297 (Biochemistry & Molecular Biology), Q2 48/177 (Chemistry Multidisciplinary)

Články odeslané do časopisov (študenti podčiarknutie):

6. Nepovimova, E.; Svobodova, L.; Dolezal, R.; Hepnarova, V.; Junova, L.; Jun, D.; Korabecny, J.; Kucera, T.; Gazova, Z.; Motykova, K.; Kubackova, J.; Bednarikova, Z.; Janockova, J.; Jesus, C.; Cortes, L.; Pina, J.; Rostohar, D.; Serpa, C.; Soukup, O.; Aitken, L.; Hughes, R.E.; Musilek, K.; Muckova, L.; Jost, P.; Chvojikova, M.; Vales, K.; Valis, M.; Chrienova, Z.; Chalupova, K.; Kuca, K.* *Bioorganic Chemistry*, submitted. IF₂₀₁₉ = 4.831, Q1 8/57 (Organic Chemistry), Q1 66/297 (Biochemistry & Molecular Biology)

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	1. rok	2. rok	3. rok	Poznámka
Hodnocené výstupy projektu				
Jimp (databáze WoS)	0	5		5 Jimp vyšlo, 1 odeslaný do časopisu typu Jimp
Jsc (databáze Scopus)				
B (recenzovaná odborná kniha)*				
C (kapitola v recenzované odborné knize)*				
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)				
P (patent)				
Počet hodnocených výsledků	0	5		původní plán 3 Jimp
Nehodnocené výstupy projektu				
Počet obhájených dizertačních prací				
Počet obhájených diplomových prací	2	3		
Počet nehodnocených výsledků	2	3		původní plán 3

Ke zprávě přiložte:

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

Datum: 30. 11. 2020

Podpis odpovědného řešitele:

* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.