

A szénsavanhidráz IX szerepe a malignus daganatok progressziójában – lehetséges terápiás célpont?

MATOLAY ORSOLYA^{1,2}, BÁDON EMESE SAROLTA^{1,2}, BALÁZS LÍDIA¹, JUHÁSZ PÉTER^{1,2}, CSONKA TAMÁS^{1,2}, MÉHES GÁBOR^{1,2}

Debreceni Egyetem, ¹ÁOK, Patológiai Intézet ²Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Debrecen

Pályázati támogatás: A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 Venture Catapult program (MO), EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (MO) számú projekt ÚNKP-20-3-II-DE-488 (MO) és az ÚNKP-20-3-II-DE-502 (BES) támogatta.

Levelezési cím:

Prof. Dr. Méhes Gábor, Debreceni Egyetem, ÁOK, Patológiai Intézet, 4032 Debrecen, Nagyerdei körút 98. Tel./fax: +36 52/255-245 e-mail: gabor.mehes@med.unideb.hu

Közlésre érkezett:

2021. április 28.

Elfogadva:

2021. május 20.

A rosszindulatú daganatokban zonális jelleggel elégtelené válhat az oxigénellátás (hipoxia), az így kialakult mikro-környezet (niche) kedvez a folyamat progressziójának. Az adaptálódni képes daganatsejtek szerteágazó szabályozási útvonalak aktiválódásával tudják biztosítani energiaigényüket, túlélésüket, melyek központi regulátora a hipoxia indukálta faktor-1 (HIF1). A sejtanycsere megváltozásával egyidejűleg expresszálódhat a szénsavanhidráz IX (CAIX), amely a hipoxiától szenvedő malignus sejtek egyik jellemző vonása. A CAIX aktivitásának köszönhetően a tumorsejt intracelluláris pH-ja (pHi) alkalikus, míg az extracelluláris környezet (pHe) acidotikus irányba tolódik el. A megnövekedett pHi lehetővé teszi a proliferációt és növeli a sejtek migrációs kapacitását. A pHe csökkenése hozzájárulhat a konvencionális kemo- és sugárterápiával szembeni rezisztencia kialakulásához. *In vitro* és állatmodell-kísérletek azt is megmutatták, hogy a CAIX szelektív gátlásával jelentősen növelhető a daganatellenes kezelés hatékonysága, így ígéretes célpont lehet a jövőben. *Magy Onkol* 65:157-166, 2021

Kulcsszavak: tumormetabolizmus, metabolikus profil, CAIX, karboanhidráz, szénsavanhidráz, pH

Insufficient tissue perfusion in malignancies results in hypoxic areas, favoring neoplastic progression. Tumor cells under hypoxia undergo an adaptive program by activating alternative metabolic pathways, which is regulated by hypoxia inducible factor-1 (HIF1) in order to overcome microenvironmental changes. The expression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is a prominent protective mechanism against intracellular acidosis occurring in cancer cells suffering from hypoxia. Due to the activity of CAIX, the restored intracellular pH (pHi) supports tumor cell proliferation and migration, while the compensatory extracellular acidosis contributes to immunoprotection and to chemo- and radio-resistance. In vitro and animal model experiments showed that the chemotherapeutic efficiency could be significantly improved by the selective inhibition of CAIX, thus, its adjuvant therapeutic potential is under active investigation.

*Matolay O, Bádón ES, Balázs L, Juhász P, Csonka T, Méhes G. The role of carbonic anhydrase IX in the progression of malignant tumors – a potential therapeutic target? *Magy Onkol* 65:157-166, 2021*

Keywords: tumor metabolism, metabolic profile, CAIX, carbonic anhydrase, pH

BEVEZETÉS

A magas proliferációs aktivitással rendelkező daganatok gyengébben vaszkularizált területeiben gyakran jelentkezik relatív hipoperfúzió, amely alacsony szöveti oxigéntenzióhoz (hipoxia) vezet, a tumorsejtek kevésbé férnek hozzá a táplálékhoz és a növekedési faktorokhoz, illetve egyéb parakrin mechanizmusok hatékonysága is csökken. A kedvezőtlen körülmények ellensúlyozására a daganatsejtek környezete átalakul, így pl. fokozódik az érújdonképződésben szerepet játszó faktorok szintje [vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, vascular endothelial growth factor, VEGF], változik a proteázok aktivitása, a sejtek migrációs és inváziós képessége [1].

Hipoxia hatására a sejtek alternatív ATP-termelésbe kezdenek (pl. glikolízis, glutaminolízis), ami savas kémhatású metabolitok (tejsav, H^+ , CO_2) képződésének és felhalmozásának kedvez. Az intracelluláris acidózis ellensúlyozására beinduló pH-szabályozó folyamatok ugyanakkor az extracelluláris tér pH-értékét hajlamosak eltolni a savas kémhatás irányába [2].

A pH-szabályozás lépcsői a következők:

- a tejsav és a H^+ exportja (pl. nátrium-hidrogén ion exchanger (NHE), H^+ -ATPáz stb.)
- bikarbonát (HCO_3^-) importja (pl. bikarbonáttranszporterek, anion-exchangerek, nátrium-bikarbonát-transzporterek stb.)
- H^+ -kötés és -export (pl. szénsavanhidrázok, CA).

Kiderült, hogy a daganatsejtek adaptív viselkedése nemcsak a túlélésben játszik szerepet, hanem a külső mikro környezet megváltoztatásával nagymértékben hozzájárulhat a folyamat progressziójához és a terápiás válasz elmaradásához, ugyanis a hipoxiás mikro környezet jelentősen befolyásolhatja a kemo- és sugárterápia hatékonyságát [2]. Ebben az adaptációs folyamatban az egyes szénsavanhidrázok (carbonic anhydrase, CA) szerepét egyre jobban kezdjük megismerni.

SZÉNSAVANHIDRÁZOK

Evolúciós eredetüket tekintve a CA-k hat családba sorolhatóak (α , β , γ , δ , ϵ , n), azonban a gerincesekben – így az emberekben – csak az α -család tagjai fordulnak elő. A CA-k a cink-metalloenzimek családjába tartoznak, amely legalább 16 izoenzimet foglal magába. Az enzimek szerteágazó biológiai szerepet töltenek be a szervezet működésében: részt

vesznek a légzésben, a sav-bázis egyensúly fenntartásában, a csontreszorpcióban és -kalcifikációban, a Na^+ -visszatartásban, a glükoneogenezisben és a lipogenezisben [2, 3]. Ismert funkciójuknál fogva számos betegségben (pl. glaukómában, hegyibetegségben és egyes epilepsziatípusokban) már régóta terápiás célpontként is szerepelnek [4, 5].

Az enzimek legfontosabb feladata a glikolízis melléktermékeként keletkező CO_2 reverzibilis átalakítása ($H_2O + CO_2 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$). A mechanizmus révén az intracelluláris térben a celluláris eseményeket továbbra is támogató enyhén alkalikus pH marad fenn, míg az extracelluláris térben a pH savanyodik [2, 3].

Az elmúlt évek kutatásai jelentős figyelmet szenteltek a CA-k működésének, valamint a különböző CA-izoenzimek vizsgálatának. A rendelkezésre álló adatok alapján a CA-kat az alábbi bontás szerint csoportosíthatjuk az expresszió helyének függvényében [3, 6]:

- citoszolikus (I, II, III, VIII, XIII),
- membránasszociált (IV, IX, XII, XIV, XV),
- mitokondriális (VA, VB),
- szekretált (VI).

Az enzimek fiziológiás megjelenését és működését a különböző szövetekben az 1. táblázat foglalja össze [3].

Kuo és munkatársai megemlítik, hogy a CAI-nek abnormális szintjeit figyelték meg hemolitikus anémiában, és javasolták markerként való használatát a kórállapot követésére [7]. A glikozilfoszfoinozitol-kötött CAIV-ről kimutatták, hogy részt vesz a szöveti gyógyulás folyamatában [8]. A szekretált

1. TÁBLÁZAT. Szénsavanhidráz enzimek csoportosítása fiziológiás expressziójuk lokalizációja alapján

Expresszió jelölése	Enzimek	Fiziológiás expresszió
Citoszolikus	I	vörösvértest
	II	vese
	III	vázizom
	VII	zsírszövet
	XIII	vastagbél
Mitokondriális	VIII, IX, X	máj, neuron
	VA	hepatocita
Szekretált	VB	adipocita, hepatocita, nyirokcsomó, lép, vastagbél, here
	VI (gustin)	könny, tej, nyál, légzőrendszer
Membránkötött	IV	csontvelő, emésztőrendszer, máj
	XIV	máj, emésztőrendszer, méhnyak
	IX	szőrtüsző, emésztőrendszer
	XII	emésztőrendszer, vesze, emlő, endometrium

Rövidítések:

CA: szénsavanhidráz/karboanhidráz, **CAF:** daganatasszociált fibroblaszt (cancer-associated fibroblast), **CAIX:** szénsavanhidráz IX, **ECM:** extracelluláris mátrix, **ELISA:** enzyme labeled immunosorbent assay, **GLUT1:** glükóztanszporter 1, **HCO_3^- :** bikarbonáton, **HIF1 α :** hipoxiaindukált transzkripció faktor 1 α , **HPV:** humán papillómavírus, **HRE:** hipoxiaereszponzív elem, **PG:** proteoglikán, **pHe:** extracelluláris pH, **pHi:** intracelluláris pH, **VEGF:** vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

CAVI-ról (gustin) azt feltételezik, hogy szerepe van a szájüreg homeosztázisának fenntartásában, valamint az ízérzésben, ugyanis a kísérletes adatok alapján a CAVI gátlása esetén az ízérzés csökken [9, 10].

A CAIX MINT ENDOGÉN HIPOXIAMARKER

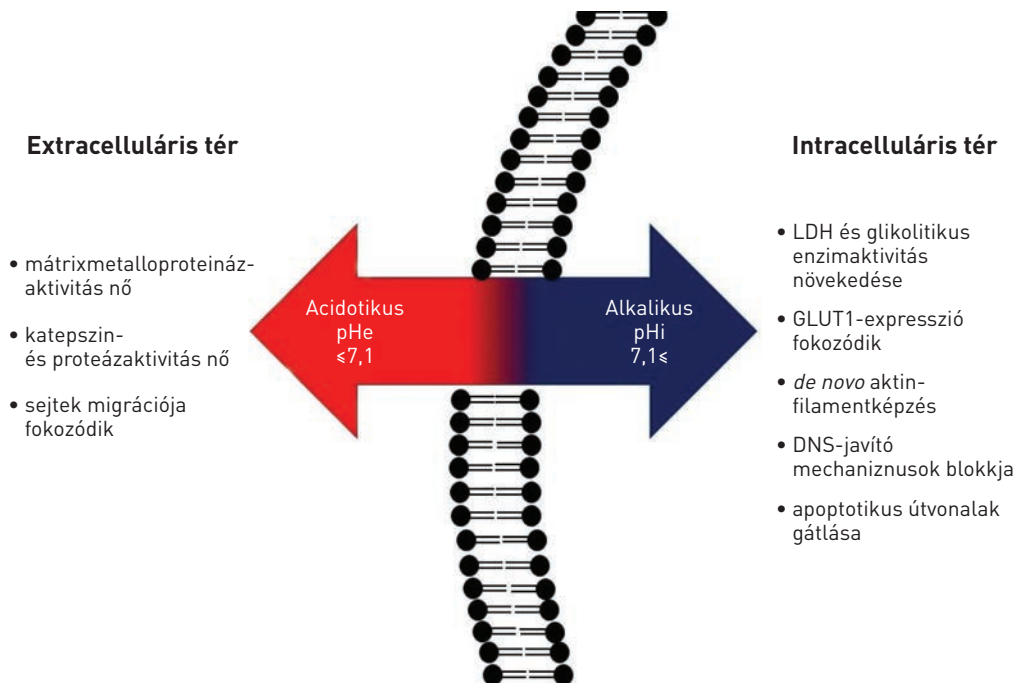
Az alacsony szöveti oxigéntenzio szignalizációs útvonalak kaszkádját indítja el a hipoxiától szenvedő sejtekben. Az egyik legismertebb ilyen tényező a hipoxia indukálta transzkripciós faktor 1 α (HIF1 α), ami számos intracelluláris eseményt szabályoz, köztük a sejt metabolikus adaptációját. Hipoxiás környezetben a sejt energia- (ATP-) igényét alternatív módon, glikolízis révén elégíti ki (a glükóz tejsavvá való átalakítása), ami tovább maradhat fenn még az oxigénszintek rendezése után is (Warburg-effektus). A glikolízis ráadásul serkenti a foszfolipidek termelését, amelyek a membránképzéshez szükségesek. Továbbá az oxidatív foszforiláció során a glutaminsavból α -ketoglutarát képződik a glutamát-dehidrogenáz hatására. Az így keletkező tejsav, a H⁺, valamint a CO₂ pH-grádiensek kialakulásához vezet a daganat hipoperfundált területeiben. Fiziológias környezetben az intracelluláris pH (pHi) körülbelül 7,2, míg extracellulárisan (pHe) 7,3-nál nagyobb. Hipoxiás körülmények között a pHi $\geq 7,2$ nem változik, míg a pHe lényegesen csökkenhet, és akár a 6,5–7,1 értéket is elérheti [2, 3, 6, 11]. Az 1. ábra bemutatja az extra- és intracelluláris pH változásának hatását a különböző sejtszintű folyamatokra.

A CA-enzimek ebben a folyamatban töltenek be fontos szerepet. A pH-szabályozás mechanizmusa a Jacob-Stewart-körrel jellemezhető:

- extracelluláris H⁺ generálás (pHe-csökkenés),
- HCO₃⁻ és a H⁺-intracelluláris felhasználása és transzportja (pHi-növekedés),
- CO₂-diffúzió (pHi>pHe gradiens fenntartása) [2, 11].

A szénsavanhidráz IX (CAIX) transzkripciós szabályozása a daganatsejtekben erősen függ a hipoxiától. Hipoxiás körülmények között az aktív HIF1 α kötődni képes a CA9 gén promóterrégiójában található felismerőhelyhez (hypoxia responsive element, HRE), ezzel serkentve annak expresszióját. A CAIX egy homodimer szerkezetű fehérje, ami négy doménből áll: N-terminális proteoglikánszerű (PG), katalitikus (cinktartalmú), transzmembrán és intracitoplazmatikus domén [2, 3, 12]. A PG-domén közvetlenül a katalitikus domén mellett helyezkedik el és az eddigi kutatások eredményei arra utalnak, hogy a savas pH-hoz való alkalmazkodásban van szerepe. A CAIX egyedülálló ebből a szempontból, ugyanis a másik tumorasszociált enzim, a szénsavanhidráz XII (CA XII), nem rendelkezik PG-doménnal [3].

A CAIX egy stabil fehérje, féléletideje kb. 40 óra. Expresszióját nemcsak a tumorsejtek membránfelszínén, de citoplazmatikusan, ill. a strómában is mutatták. Úgy vélik, hogy hipoxia hatására a TACE/ADAM17 enzimek lehasítják a CAIX ektodoménjét. A lehasított doménról azt feltételezik, hogy a parakrin és az autokrin intracelluláris jelátvivő folya-



1. ÁBRA. Extra- és intracelluláris pH változásának következtében létrejövő sejtszintű folyamatok bemutatása (pHe: extracelluláris pH, pHi: intracelluláris pH, LDH: tejsav-dehidrogenáz, GLUT1: glükóztranszporter 1)

matokban tölthet be szabályzó szerepet. A daganatstrómában megjelenő CAIX-ről úgy gondolják, hogy vagy a tumorasszociált fibroblasztok fejezik ki, vagy pedig a lehasított ektodomén endocitózissal kerül az immunsejtekbe [2, 3].

A CAIX-ről kimutatták, hogy szélsőséges pH-értékek (pH=3–8) között is stabil szerkezetű, és megőrzi enzimaktivitását, amely valószínűleg a PG-doménjában található aszpartátreziduumoknak köszönhető. E reziduumokról úgy tartják, hogy titráló funkciót töltenek be. Megfigyelték, hogy pH 6,8 alatt a CAIX enzimaktivitása inkább a dehidratáció ($H_2O + CO_2 \rightarrow H_2 + HCO_3^-$), míg pH 6,8 felett inkább a hidratáció ($H_2O + CO_2 \leftarrow H_2 + HCO_3^-$) felé tolódik. A CAIX megőrzi aktivitását magas tejsav-koncentráció, acidózis, továbbá hipoxia esetén is, azonban érdekes módon pl. a piroszőlősvárról kimutatták, hogy CAIX-gátló hatással rendelkezik [3, 12].

Mindezekre magyarázatul a CAIX működésével kapcsolatban két hipotézis került felállításra.

Az első hipotézis szerint a citoszolikus és a transzmembrán CA-k szorosan együttműködnek az intra- és az extracelluláris pH szabályozásában. Az extracelluláris doménnal rendelkező enzimek (pl. CAIX) az ECM-ben rendelkezésre álló CO_2 -t átalakítják HCO_3^- -ná és CO_2 -vé. Míg a transzportereken keresztül bejut a bikarbonát a sejtbe, addig a H^+ az ECM-ben marad, így csökkentve tovább a pHe-t. A sejt belsejében a HCO_3^- visszaalakul CO_2 -vé, amelyet a sejt vagy felhasznál az anyagcsere-folyamataihoz, vagy a szekretálásra szánt H^+ -nal távozik a sejtől.

A második hipotézis alapján az extracelluláris doménnal rendelkező CA-k nem feltétlenül járulnak hozzá a pHe csökkenéséhez, sokkal inkább a neoplasztikus sejt mikrokozonyozatát pH=6,5–7,1 közötti értékre „pufferolják”. E pHe-értékek mellett csökken a tumornekrózis mértéke és a neoplasztikus sejtek túlélését segítő, előnyös niche alakul ki. Ez az anyagcsere-változás a glikolitikus folyamatoknak kedvez, így a sejt tejsavat és H^+ -t termel. Mindkét metabolit eltávolítása a pHe csökkenéséhez járul hozzá, amelynek az értéke akár pH=5,5 is lehet. Az ilyen mértékű pH-csökkenés fiziológiás esetben a sejt nekrozisához vezetne, azonban az extracelluláris doménnal rendelkező CA katalitikus aktivitásának következtében – HCO_3^- -dehidratáció, és protonszekvesztráció révén – növekszik az extracelluláris tér pH-értéke (pH 6,5–7,1), ami biztosítja a sejtek túlélését.

Az első hipotézis jól magyarázza azon folyamatok hatásmechanizmusát, amelyek kedveznek a tumor növekedésének, míg a második hipotézis az extracelluláris transzmembrán CA-funkció jelentőségét hangsúlyozza [3]. Az elméletek igazolásához természetesen további vizsgálatok szükségesek. A tumorprogresszióban betöltött szerepe alapján eddig a CAIX-et találták a legígéretesebb vizsgálati és terápiás célpontnak. A CAIX hatását az intra- és extracelluláris funkciókra a 2. táblázat foglalja össze [2, 3, 12, 13].

Általánosan elfogadott, hogy a CAIX aktivitása következtében a pHi semleges, neutrális tartományba kerül, míg a pHe savassá válik. Ez a hatás a daganatellenes kezelés

2. TÁBLÁZAT. Szénsavanhidráz IX (CAIX) funkciói

Intracelluláris hatások		Extracelluláris hatások	
pH		pH	
intracelluláris ↔ fiziológiás		extracelluláris ↔ fiziológiás	
7,4	7,2	6,7–7,1	7,4
<ul style="list-style-type: none"> • rezisztencia az apoptotikus szignálokra • kaspázinaktivitás • DNS-szintézis serkentése → sejtproliferáció 		<ul style="list-style-type: none"> • megnövekedett proteináz- és metalloproteináz-expresszió és -aktiváció → extracelluláris mátrix-remodelling • invázió • migráció • terápiarezisztencia 	

szempontjából komoly jelentőséggel bír. Az extracelluláris térben felgyűlt protonok egy ún. „ion trapping” (ioncsapda) mechanizmuson keresztül képesek ionizálni az általában gyenge bázisú kemoterápiás szereket (pl. antraciklinek, vinkaalkaloidok), amelyek így nem tudnak áthatolni a sejtmembránon [13–15]. A sugárterápia alapja az, hogy a kezelés hatására létrejött szabadgyökök és ionok DNS-sérülést okoznak (egyszeres, kétszeres DNS-lánc-törés) a sejtekben. A hipoxiás sejtekben azonban sokkal kevesebb DNS-sérülés jön létre, ami a lelassult sejtciklusnak és az S-fázisban lévő sejtek sugárrezisztenciájának köszönhető [16].

CAIX A NEOPLASZTIKUS FOLYAMATOKBAN

A CAIX expressziójával kapcsolatban már számos kísérletes és metaanalízisen alapuló adat áll rendelkezésünkre [17]. Az elemzések alapján világossá vált az enzim expressziójának erős prognosztikai értéke. Számos daganattípus esetében összefüggés mutatkozott a minták CAIX-pozitivitása és a rövidebb teljes betegségmentes túlélés, valamint a metasztázis- és progressziómentes túlélés között [18].

Központi idegrendszeri malignus tumorok

A CAIX-expresszió és az asztrogliális eredetű (pl. glioblasztóma, diffúz asztrocitóma) daganatokkal kapcsolatban az eddig ismert, főként immunhisztokémiai módszereken alapuló vizsgálatok hasonló következtetésre jutottak, miszerint a CAIX-expresszió egyértelműen korrelált a rosszabb prognózissal és túléléssel. Prognosztikai markerként való alkalmazása így megfontolandó. Oligodendrogliómák esetén az eddigi eredmények alapján főként az oligoasztrocitómák esetében tűnik a CAIX hasznos prognosztikai markernek, míg meningeómák esetében a magasabb grádussal volt összefüggésbe hozható a CAIX-expresszió, valamint érdekes módon a tumorendotéliumban expresszálódó CAII korrelált a tumorgrádussal és a proliferációs rátával. Az enzim expressziója arra utalhat, hogy a CAII-nek szerepe lehet a meningeómák progressziójában. Számos *in vivo*, *in vitro* és klinikai tanulmány foglalkozik a CA-k szerepével a központi idegrendszeri malignitásokban, és egyre több tanulmány kezdett foglalkozni a CA-gátlók alkalmazásával is, amely akár

kiegészítője lehet a jelenlegi kezelési protokollnak (19, 20). Egy jelenleg is folyó, agresszív asztrocitómákkal foglalkozó klinikai tanulmányban (NCT03011671) a temozolomidot egészítik ki acetazolamiddal, míg egy másik, lezárt, kiértékelési fázisba jutott, rekurrens glioblasztómákkal foglalkozó klinikai tanulmányban (NCT02770378) a kemoterápiás protokollt egy másik CA-inhibitorral – celecoxib – egészítették ki.

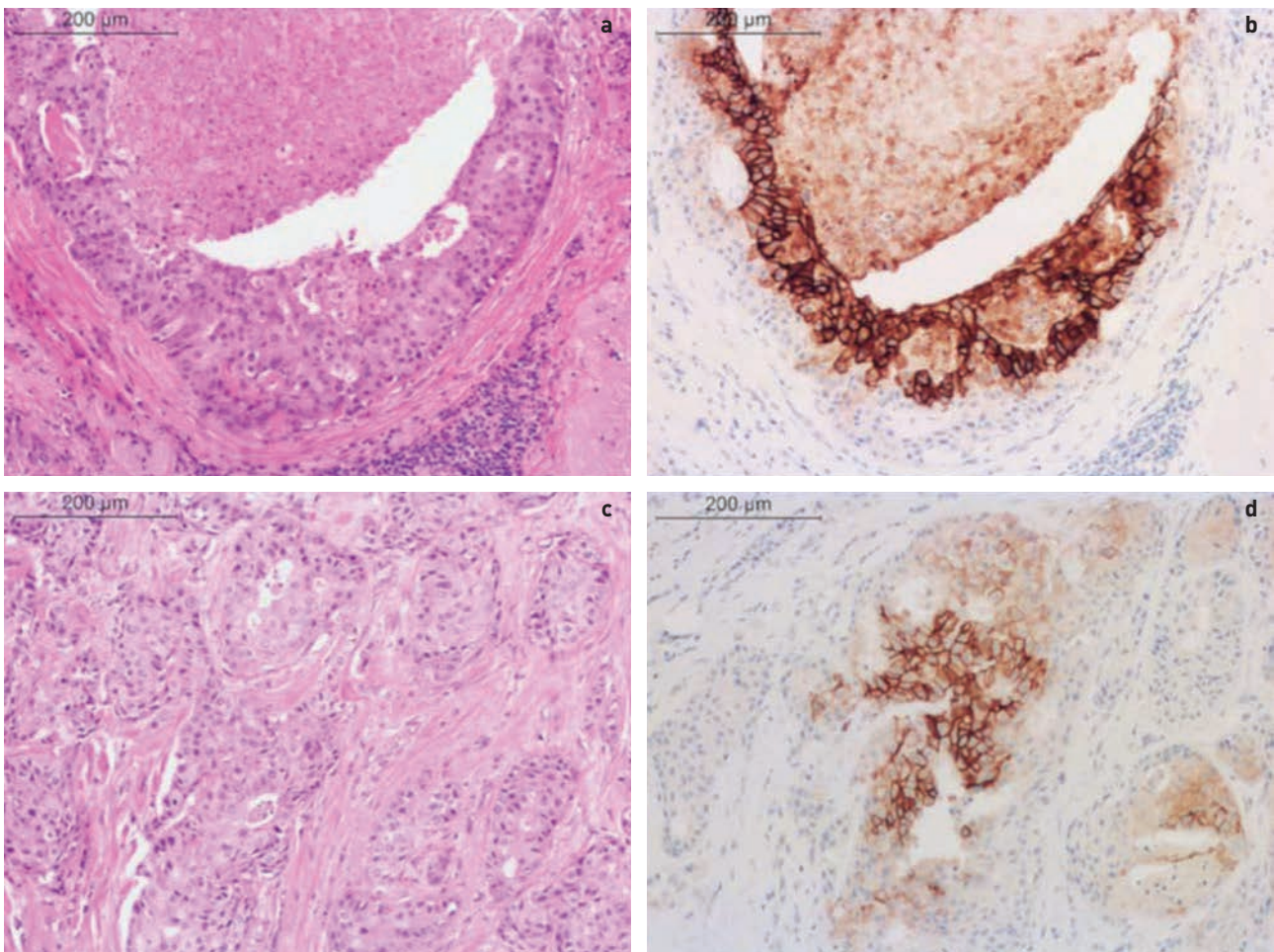
A fej-nyak régió malignus folyamatai

Több tanulmány foglalkozott a fej-nyak régió tumorainak CAIX-expressziójával, ám az eddigi eredmények alapján a CAIX-nek csak a laphámkarinómákban van jelentősége. Az enzim jelenléte korrelációt mutatott a rövidebb betegségmentes és teljes túléléssel. Az eddig főleg immunhisztokémiai módszereken alapuló tanulmányok eredményei kimutatták, hogy az alacsonyabb stádiumú tumorokban a CAIX-expresszió mértéke alacsonyabb volt (21, 22). A fej-nyaki régió malignus tumorai esetében is indultak klinikai tanulmányok, amelyek

CA-inhibitorokat alkalmaztak a terápiás protokoll kiegészítőjeként, hogy a kemo-radioterápia hatékonyságát növeljék (NCT02216669, NCT04162873).

Emlődaganatok

A CAIX-expresszió emlőmalignitásokban betöltött szerepét széles körben és aktívan vizsgálják: *in vitro*, *in vivo* és klinikai tanulmányok adatai is rendelkezésre állnak már. *In vitro* kísérletes eredmények arra mutattak rá, hogy a CA-k szelektív gátlása csökkenti a sejtek proliferációját, valamint motilitását is. *In vivo* eredmények arra a következtetésre jutottak, hogy a CAIX-aktivitást képkalkotó eljárásokkal is lehet igazolni, így megfontolandó biomarkerként való alkalmazása. Klinikai tanulmányokban, az alkalmazott immunhisztokémiai eredmények alapján a CAIX expressziójának mértéke összefüggést mutat a tumorok méretével, valamint a daganatok invazív jellegével (23, 24). Kutatócsoportunk figyelemmel követi a CAIX expresszióját különböző szövettani típusú emlőmalignitásokban (2. ábra).



2. ÁBRA. CAIX-expresszió emlőtumorokban. a, b) Tubulusképzési tendenciát is mutató invazív karcinóma NST centrális részén hipoxia jeleként membránózus CAIX-pozitivitással (200×). c, d) Fészkés, köteges növekedésű invazív emlőkarcinóma NST, ahol a hipoxiás és normális oxigénellátással bíró területek egymástól élesen elhatárolódnak. A hipoxiás zónában erőteljes membránózus CAIX-pozitivitás figyelhető meg (200×)

A tüdő rosszindulatú daganatai

Az eddigi tanulmányok alapján ugyan laphámkarinómákban nem, azonban adenokarínómák esetében mind fehérje-, mind RNS-szinten összefüggést találtak a PD-L1-expresszió és olyan hipoxiamarkerek között, mint a HIF1 α , VEGFA, GLUT1 és a CAIX. Az eredmények arra mutattak rá, hogy nemcsak a neoplasztikus sejteken, hanem a daganatszociált fibroblasztokon (cancer-associated fibroblast, CAF) kifejeződő CAIX is szereppel bírhat a daganat progressziójában. Nem kissejtes tüdőrákok esetében a CAIX plazmaszintjének eltéréseit vizsgálták, és egy tanulmány eredményei alapján a CAIX-szint emelkedése már korai stádiumban jó prediktora lehet a daganatos betegségnek. Kissejtes tüdőrákok esetében egy jelenleg folyó klinikai tanulmányban (NCT03467360) a kemo-radioterápiát egészítették ki acetazolammal [25–27].

Az urogenitális rendszer malignus tumorai

A CAIX biomarker jellegét először a világossejtes veserákban írták le, így a téma részletesen tárgyalt és ismertetett.

Szeméremtesti malignus tumoroknál (vulva, pénisz) az előzőekben ismertetett adatokhoz hasonló eredmények láttak napvilágot. Vulvalaphámrákokban megvizsgálták a CAIX, valamint GLUT1 expresszióját is, és az eredmények alapján a faktorok egymással kolokalizáltan fordultak elő. Továbbá míg a GLUT1 az invazív karinómákban volt jellemző, addig a CAIX a kiújuló daganatokban volt jellegzetesebb [28]. Péniszlaphámrák esetében is leírták a CAIX jelenlétét, és összefüggést találtak a p53-aktivitással [29].

Fraga és mtsai prosztatatumorral és a noduláris hiperpláziával foglalkozó tanulmányukban arra a következtetésre jutottak, hogy a CAIX-expresszió a rosszindulatú tumorokhoz köthető. Kutatásukban a CA9 genetikai eltéréseit is megvizsgálták, és ugyan detektáltak SNP-eket az enzim génszerkezetében, észrevételük alapján ez nem befolyásolta a fehérje expresszióját és annak mértékét. Tanulmányukban a CAIX jelenléte a malignus transzformáción átesett epiteliális sejteken volt detektálható. Egy ELISA- (enzyme labeled immunosorbent assay) alapú vizsgálat azt mutatta ki, hogy a szérumban megjelenő CAIX előre jelezheti az agresszív tumorfenotípust. Prostatatumorok esetében jelenleg egy klinikai tanulmány folyik, amely az acetazolamid posztoperatív hatását vizsgálja (NCT04470843) [30–32].

Méhnyaktumorok esetében számos kutatás vizsgálta a CAIX expresszióját, és egy korábbi tanulmány eredményei szerint a magas rizikójú, korai stádiumú betegek esetében a CAIX egy független prognosztikai markere lehet a teljes és a progressziómentes túlélésnek [33]. Egy érdekes klinikai tanulmány (NCT00892866) a cervikális lézióban jelen lévő sejtek vizsgálatát tűzte ki célul. E citológiai vizsgálatban nemcsak a sejtek proliferációját vizsgálják, hanem a p16 és CAIX faktorok jelenlétét is. Egy másik klinikai tanulmányban (NCT00081263) cervikális intraepiteliális neopláziával diagnosztizált betegek VEGF-szintjeit vizsgálták,

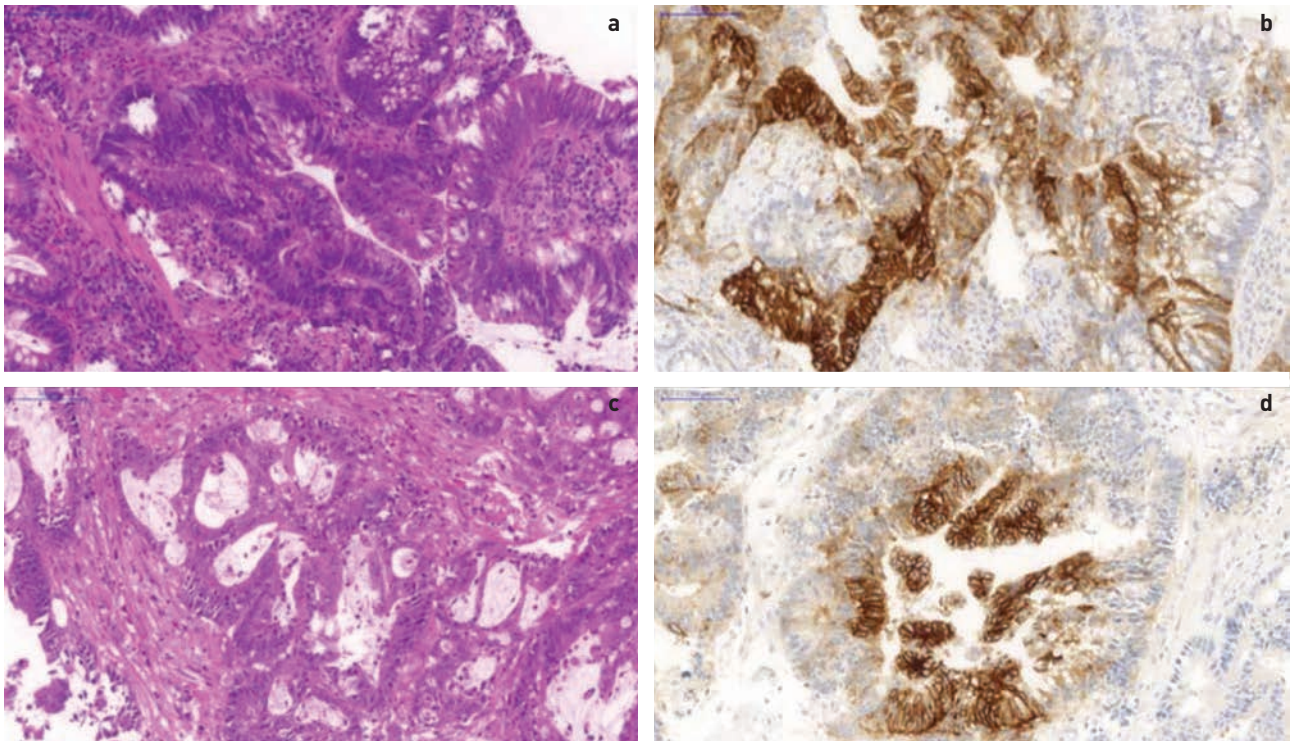
és azt találták, hogy azon celecoxibot kapó pácienseknél, akiknél a kezdeti VEGF-szint magasabb volt, ott szöveti regresszió történt.

Egy friss tanulmány szerint a CAIX nagy segítséget jelenthet az endocervikális és az endometriális adenokarínómák elkülönítésében, ugyanis a CAIX nagyobb mértékben expresszálódott endometriális adenokarínómákban. A kutatás szerzői javasolják az eddigi diagnosztikus panel (CEA, p16, ER, PAX8) CAIX-cel való kiegészítését [34]. Petefészek-daganatok esetében is kapcsolat mutatkozott a CAIX erős expressziója, a rossz prognózis, valamint a szövettani altípus között. Choschzick és munkatársainak tanulmánya alapján a CAIX nagyobb mértékben fejeződött ki a mucinózus és az endometrioid típusú petefészek-daganatokban [35]. Vulvalaphámrákokhoz hasonlóan a GLUT1 és a CAIX kolokalizáltan fejeződtek ki, és mindkét faktor az invazív karinómákban volt jellemző.

A vizsgálatok azt mutatták, hogy egészséges uroteliális hámban nem fejeződik ki a CAIX, azonban az invazív daganatok – intraepiteliális neopláziák, illetve alacsony és magas grádusú húgyhólyagtumorok – között nagy különbség mutatkozott az expresszió mértéke és mintázata között. A CAIX-pozitív betegek rosszabb túlélési adatokkal és prognózissal bírtak. Azonban nemcsak az immunhisztokémiai vizsgálatok támasztják alá a CAIX markerként való alkalmazását uroteliális karinómákban, hanem vizeletminták CAIX-tartalmát vizsgáló tanulmányok is [36–38].

A gasztrointesztinális traktus malignómái

Az emésztőrendszert érintő daganatos folyamatok esetében nehézségekbe ütközik a CAIX pontos szerepének megítélése, ugyanis az enzim expressziója itt fiziológiás, míg a más szövetekben észlelhető CAIX-expresszió ektópiásnak tekinthető [39]. Az eddigi tanulmányok ellentmondó eredményeket publikáltak az enzim tumorprogresszióra gyakorolt hatásával kapcsolatban a gasztrointesztinális traktusban. Míg nyelőcső-laphámkarinómákban az atípiás súlyosbodásával a CAIX expressziója csökken, addig adenokarínómák esetében változó expressziós mintázat és intenzitás volt megfigyelhető [40, 41]. Gyomor-adenokarínómákban a CAIX expressziója összefüggésbe volt hozható a rossz prognózissal és a daganat metasztázisképző képességével, és hasonló eredmény látott napvilágot dukális hasnyálmirigy-adenokarínóma esetében is [42–44]. Egy, már kiértékelés fázisába jutott klinikai tanulmányban (NCT03450018) a CAIX-pozitív dukális hasnyálmirigy-daganatokban szenvedő betegek gemcitabint tartalmazó kemoterápiáját egészítették ki CA-inhibitorral (SLC-0111). Kolorektális neoplasztikus folyamatok esetében az enzim expressziójának szerepe egyelőre nem tisztázott [45]. Rektum-adenokarínómával diagnosztizált eseteink biopsziás és poszterápiás műtéti anyagaiban összehasonlítva a CAIX-expresszió fokozódását tapasztaltuk a neoadjuváns kemoterápia hatására (3. ábra).



3. ÁBRA. CAIX-expressziós mintázat bemutatása rektum-adenokarcinómával diagnosztizált eset biopsziás és poszterrápiás műtéti anyagán. a, c) Jellegzetes atípiát mutató hámsejtekkel bélelt atípusos mirigystruktúra és a szöveti környezet bemutatása a biopsziás és poszterrápiás műtéti mintán (hematoxilín-eozin, 200 \times), b) biopsziás minta, neoplastikus mirigyekben változatos erősségű CAIX-membránpozitivitás figyelhető meg (200 \times). d) A poszterrápiás műtéti anyag hipoxiát elszenvedett tumorsejtjeiben erőteljes homogen CAIX-membránpozitivitás detektálható (200 \times)

Nyirokszöveti daganatok

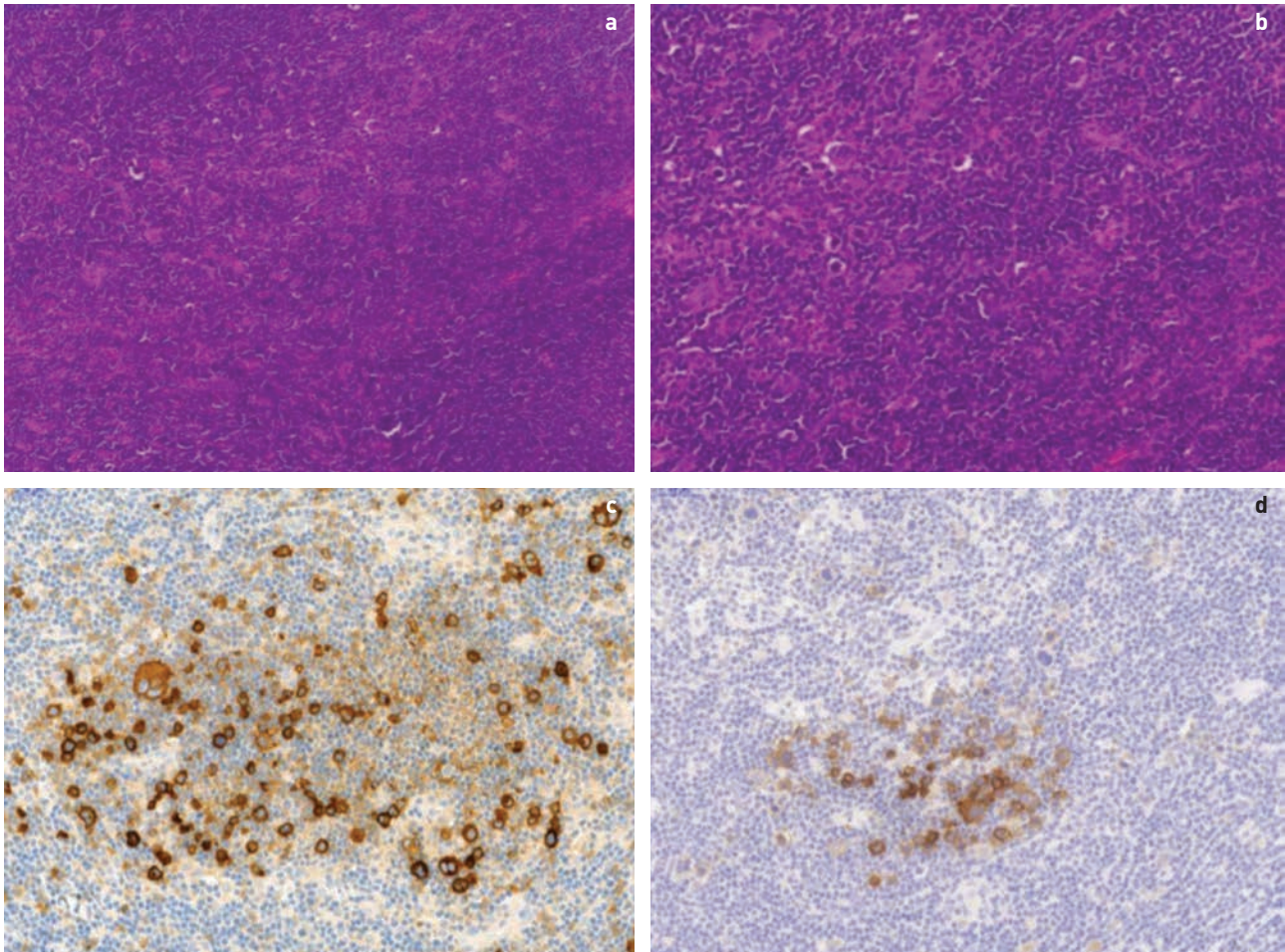
Mieloproliferatív neopláziák esetében a HIF1 α – és az általa szabályozott faktorok – szerepe még tisztázásra vár, egyelőre *in vitro* és *in vivo* eredmények állnak rendelkezésre, amelyek szerint a HIF1 α szelektív gátlása csökkenti a daganatsejtek túlélését és kedvez az egészséges csontvelői őssejtek túlélésének [46]. Leukémiák esetében azonban tudásunk szerint nem vizsgálták a CAIX szerepét. Mielóma multiplex esetében a preklinikai kutatások arra a következtetésre jutottak a HIF1 α -útvonlat vizsgálva, hogy a hipoxia nagyban hozzájárul ahhoz a homeosztázishoz, amely a malignus sejtek túlélésének kedvez, és a HIF1 α -útvonlat gátlása ígéretes terápiás célpontnak tűnik [47]. Eddig egy tanulmány vizsgálta a CAIX kifejeződését mielóma multiplexes betegek csontvelőjéből nyert endoteliális sejteken. Az eredmények alapján a CAIX szintje – más hipoxia indukálta faktorokkal együtt – emelkedik hipoxiás körülmények között [48].

B-sejtes limfómákkal kapcsolatban már több adatot találunk a szakirodalomban. Nemcsak metabolikusan, hanem klinikai viselkedését tekintve is heterogén csoportról van szó, így kihívásokba ütközik vizsgálatuk. Az *in vitro* kutatások arra hívták fel a figyelmet, hogy a B-sejtek érésében szerepet játszik a lokálisan fellépő hipoxia, és a kísérletes

eredmények alapján különösképpen a HIF1 α -nak van nagy szerepe a sejtek érésében. Non-Hodgkin-limfómák esetében a diffúz nagy B-sejtes limfómában vizsgálták a hipoxia indukálta faktorok jelenlétét – HIF1 α , HIF2 α , VEGF, CAIX –, és az eddigi adatokhoz hasonlóan a perinekrotikus térben volt jellegzetes a CAIX expressziója [49, 50]. *In vivo* eredmények alapján egy CA-inhibitor – acetazolamid – alkalmazásával kiegészítve a kemoterápiás protokollt, a tumor agresszivitása és a kemoterápiás szerek mellékhatása jelentősen csökkent, illetve javította a tumorelles immunválaszt, vagyis a tumort infiltráló limfociták (CD3 $^+$ /CD8 $^+$) száma növekedett [51].

Kutatócsoportunk elsőként írta le a CAIX megjelenését klasszikus Hodgkin-limfómában, ami a jellegzetes Hodgkin-Reed-Sternberg-sejtek hipoxiás környezetben növekvő csoportjaira korlátozódott (4. ábra). Eredményeink alapján a CAIX-pozitivitás összefüggésbe volt hozható a betegek rosszabb túlélési adataival [52, 53].

A téma aktualitását jelzi az is, hogy 2019-ben indult egy klinikai tanulmány, ami a gyógyszerek hatékonyságát, ill. azok hatásának csökkenését vizsgálja különböző hematológiai daganatokban. A tanulmány foglalkozik egy duális inhibitor, a celecoxib vizsgálatával is (NCT03878524).



4. ÁBRA. CAIX-expresszió bemutatása egy klasszikus Hodgkin-limfómával diagnosztizált esetben. a, b) A jellegzetes neoplasztikus sejtek és szöveti környezet bemutatása [hematoxin-eozin, 100× és 200×], c) CD30-festéssel erős pozitívást mutató Hodgkin-Reed-Sternberg-sejtek és ugyanazon terület (d) CAIX-festése, amin látható a CAIX-pozitívást mutató sejtek szubpopulációja (200×)

TERÁPIAREZISZTENCIA ÉS CA-INHIBITOROK

Kismolekulás inhibitorokkal (szulfonamid, kumarin és származékaik), valamint monoklonális antitestekkel is lehet gátolni a CA-k működését (12). A szulfonamidok (pl. acetazolamid) a CA enzimek katalitikus doménjában található cinkhez kötődve gátolják annak működését. Szulfonamid származékok további fejlesztésével lehetővé vált a CAIX szelektív gátlása is. Egy ureidoszulfonamid származék, az SLC-011 néven ismert vegyület azóta metasztatikus szolid tumorokkal kapcsolatos klinikai kutatásokban is szerepelt (NCT02215850, a vizsgálat eredményeit még nem publikálták). Kumarinvegyületek kismértékben szintén gátolják a CA-k működését, azonban nem olyan effektíven, mint a szulfonamidok (54). Az utóbbi években az ún. „duális inhibitorok” kerültek a figyelem középpontjába, amelyek egyszerre gátolják a CA-k és a COX enzimek aktivitását (pl. polmakoxib, celekoxib). A celekoxib azóta már számos klinikai tanulmányban (NCT03599453, NCT04081389, NCT04348747) szerepel, mint a kemoterápiás

protokollt kiegészítő gyógyszer (54–57), ugyanis COX-2-gátló hatás mellett erős CAIX-gátló potenciállal rendelkezik (58, 59). A monoklonális antitestek három lehetséges módon fejthetik ki hatásukat: i) antitestdependens sejtközvetített citotoxicitás, ii) CAIX katalitikus doménjának blokkolása, iii) a vegyület receptormediált internalizációja. Két CAIX-ellenes monoklonális antitestet fejlesztettek ki eddig, az M75 és G250 klónokat. A G250 kiméra variánsa (c250, girentuximab) lehetővé teszi az antitestdependens sejtközvetített citotoxicitást, így széles körben alkalmazható a tumorelles immunterápia részeként. A kereskedelmi forgalomban RENCAREX® néven ismert gyógyszert adjuváns terápiaként alkalmazzák vese-sejtes karcinómákban (12, 57).

ÖSSZEFOGLALÁS

Hipoxia hatására jelentősen megváltozik a daganatsejtek metabolizmusa, és olyan ATP-termelő útvonalak aktiválódnak, amelyek a tejsav, a CO₂, valamint a H⁺ termelésével

és akkumulációjával járnak. A túlélés érdekében anyagcse-re-melléktermékeket eltávolító mechanizmusok aktiválódnak, és egyes faktorok expressziója fokozódik a neoplasztikus sejtekben. Ilyen faktornak minősül a szénsavanhidrázok népes családjába tartozó CAIX enzim, amelyet már számos daganat esetében összefüggésbe hoztak a rossz prognózissal, rövidebb túlélési idővel. Az enzim működésének következtében a sejtből kijutó protonok az extracelluláris térben felszaporodva egy olyan speciális niche-t hoznak

létre, amely kedvez a migrációnak és az invázióknak. A savas tumor-mikrokörnyezet hozzájárul a terápiarezisztenciához („ion trapping” mechanizmus), a tumorelles immunválasz csökkenéséhez. *In vitro* és *in vivo* kísérleti eredmények alapján azonban mindezen változások hatásai csökkenthetőek, vagy akár semlegesíthetőek lehetnének CA-gátlók alkalmazásával. Mindezek alapján a CAIX enzim, ill. gátlószereinek hatását nagyobb tanulmányok keretében is érdemes lenne vizsgálni.

IRODALOM

- Vaupel P, Multhoff G. Fatal alliance of hypoxia-/HIF-1 α -driven microenvironmental traits promoting cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 1232:169–176, 2020
- Sedlakova O. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front Physiol* 4:400, 2014
- Mboge M, Mahon B, McKenna R, Frost S. Carbonic anhydrases: role in pH control and cancer. *Metabolites* 8:19, 2018
- Thiry A, Dogne JM, Supuran C, Masereel B. Carbonic anhydrase inhibitors as anticonvulsant agents. *Curr Top Med Chem* 7:855–864, 2007
- Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 7:168–181, 2008
- Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, et al. Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases. *Subcell Biochem* 75:221–254, 2014
- Kuo WH, Yang SF, Hsieh YS, et al. Differential expression of carbonic anhydrase isoenzymes in various types of anemia. *Clin Chim Acta* 351:79–86, 2005
- Barker H, Aaltonen M, Pan P, et al. Role of carbonic anhydrases in skin wound healing. *Exp Mol Med* 49:e334–e334, 2017
- Shatzman AR, Henkin RI. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3867–3871, 1981
- Thatcher BJ, Doherty AE, Orvisky E, et al. Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem Biophys Res Commun* 250:635–641, 1998
- Becker HM. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br J Cancer* 122:157–167, 2020
- McDonald PC, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget* 3:84–97, 2012
- McDonald PC, Swayampakula M, Dedhar S. Coordinated regulation of metabolic transporters and migration/invasion by carbonic anhydrase IX. *Metabolites* 8:20, 2018
- RaghuNand N, He X, van Sluis R, et al. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer* 80:1005–1011, 1999
- Mahoney BP, RaghuNand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. *Biochem Pharmacol* 66:1207–1218, 2003
- Ward C, Meehan J, Gray M, et al. Carbonic anhydrase IX (CAIX), cancer, and radiation responsiveness. *Metabolites* 8:13, 2018
- Ilardi G, Zambrano N, Merolla F, et al. Histopathological determinants of tumor resistance: a special look to the immunohistochemical expression of carbonic anhydrase IX in human cancers. *Curr Med Chem* 21:1569–1582, 2014
- van Kuijk SJA, Yaromina A, Houben R, et al. Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression in cancer patients: a meta-analysis. *Front Oncol* 6:69, 2016
- Haapasalo J, Nordfors K, Haapasalo H, Parkkila S. The expression of carbonic anhydrases II, IX and XII in brain tumors. *Cancers* 12:1723, 2020
- Nordfors K, Haapasalo J, Haapasalo H, Parkkil S. Carbonic anhydrase IX in adult and pediatric brain tumors. In: *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications* Ed: Lichter T. IntechOpen, 2013
- Peridis S, Pilgrim G, Athanasopoulos I, Parpounas K. Carbonic anhydrase-9 expression in head and neck cancer: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 268:661–670, 2011
- Eckert AW, Horter S, Bethmann D, et al. Investigation of the prognostic role of carbonic anhydrase 9 (CAIX) of the cellular mRNA/protein level or soluble CAIX protein in patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 20:375, 2019
- Adams A, van Brussel AS, Vermeulen JF, et al. The potential of hypoxia markers as target for breast molecular imaging – a systematic review and meta-analysis of human marker expression. *BMC Cancer* 13:538, 2013
- Chen Z, Ai L, Mboge MY, et al. Differential expression and function of CAIX and CAXII in breast cancer: A comparison between tumorgraft models and cells. *PLoS One* 13:e0199476, 2018
- Ilie M, Mazure NM, Hofman V, et al. High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 102:1627–1635, 2010
- Koh YW, Lee SJ, Han JH, et al. PD-L1 protein expression in non-small-cell lung cancer and its relationship with the hypoxia-related signaling pathways: A study based on immunohistochemistry and RNA sequencing data. *Lung Cancer* 129:41–47, 2019
- Nakamura H, Ichikawa T, Nakasone S, et al. Abundant tumor promoting stromal cells in lung adenocarcinoma with hypoxic regions. *Lung Cancer* 115:56–63, 2018
- Mayer A, Schmidt M, Seeger A, et al. GLUT-1 expression is largely unrelated to both hypoxia and the Warburg phenotype in squamous cell carcinomas of the vulva. *BMC Cancer* 14:760, 2014
- Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX expression in penile squamous cell carcinoma: A pilot study. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 31:706–711, 2013
- Ambrosio MR, Di Serio C, Danza G, et al. Carbonic anhydrase IX is a marker of hypoxia and correlates with higher Gleason scores and ISUP grading in prostate cancer. *Diagn Pathol* 11:45, 2016
- Fraga A, Ribeiro R, Coelho A, et al. Genetic polymorphisms in key hypoxia-regulated downstream molecules and phenotypic correlation in prostate cancer. *BMC Urol* 17:12, 2017
- Smith AD, Truong M, Bristow R, et al. The utility of serum CA9 for prognostication in prostate cancer. *Anticancer Res* 36:4489–4492, 2016
- Liao SY, Darcy KM, Randall LM, et al. Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 116:452–458, 2010
- Hernandez-Caballero AI, Vierkoetter KR, Ahn HJ, et al. Novel immunohistochemical markers in the differential diagnosis of endocervical and endometrial adenocarcinoma: The added benefit of CAIX and PAX8. *Gynecol Oncol Rep* 33:100614, 2020
- Choschzick M, Oosterwijk E, Müller V, et al. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer. *Virchows Arch* 459:193–200, 2011
- de Martino M, Lucca I, Mbeutcha A, et al. Carbonic anhydrase IX as a diagnostic urinary marker for urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 68:552–554, 2015
- Klatte T, Seligson DB, Rao JY, et al. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: A diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer* 115:1448–1458, 2009
- Katsila T, Lontos M, Patrinos GP, et al. The new age of -omics in urothelial cancer – re-wording its diagnosis and treatment. *EBioMedicine* 28:43–50, 2018
- Kivelä AJ. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World J Gastroenterol* 11:155, 2005

40. Drenckhan A, Freytag M, Supuran CT, et al. CAIX furthers tumour progression in the hypoxic tumour microenvironment of esophageal carcinoma and is a possible therapeutic target. *J Enzyme Inhib Med Chem* 33:1024–1033, 2018
41. Nortunen M, Huhta H, Helminen O, et al. Carbonic anhydrases II, IX, and XII in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol* 473:567–575, 2018
42. Senol S, Aydin A, Kosemetin D, et al. Gastric adenocarcinoma biomarker expression profiles and their prognostic value. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 35:207–222, 2016
43. Yang L, Yang Z, Li D, et al. Overexpression of FZD1 and CAIX are associated with invasion, metastasis, and poor-prognosis of the pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 24:899–906, 2018
44. Strapcova S, Takacova M, Csaderova L, et al. Clinical and pre-clinical evidence of carbonic anhydrase IX in pancreatic cancer and its high expression in pre-cancerous lesions. *Cancers* 12:2005, 2020
45. Viikilä P, Kivelä AJ, Mustonen H, et al. Carbonic anhydrase enzymes II, VII, IX and XII in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 22:8168, 2016
46. Deynoux M, Sunter N, Hérault O, Mazurier F. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in leukemias. *Front Oncol* 6:41, 2016
47. Borsi E, Terragna C, Brioli A, et al. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 alpha in multiple myeloma. *Transl Res* 165:641–650, 2015
48. Filippi I, Saltarella I, Aldinucci C, et al. Different adaptive responses to hypoxia in normal and multiple myeloma endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 46:203–212, 2018
49. Matolay O, Méhes G. Sustain, adapt, and overcome—hypoxia associated changes in the progression of lymphatic neoplasia. *Front Oncol* 9:1277, 2019
50. Méhes G. A primer központi idegrendszeri limfómák patológiája. *Magy Onkol* 61:81–87, 2017
51. Méhes G, Matolay O, Beke L, et al. Carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide enhances CHOP treatment response and stimulates effector T-cell infiltration in A20/BalbC murine B-cell lymphoma. *Int J Mol Sci* 21:5001, 2020
52. Méhes G, Matolay O, Beke L, et al. Hypoxia-related carbonic anhydrase IX expression is associated with unfavourable response to first-line therapy in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 74:699–708, 2019
53. Matolay O, Beke L, Gyurkovics A, et al. Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX uncovers hypoxia-related functional differences in classical Hodgkin lymphoma subtypes. *Int J Mol Sci* 20:3463, 2019
54. Iessi E, Logozzi M, Mizzoni D, et al. Rethinking the combination of proton exchanger inhibitors in cancer therapy. *Metabolites* 8:2, 2017
55. Supuran CT. Drug interaction considerations in the therapeutic use of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 12:423–431, 2016
56. Williams KJ, Gieling RG. Preclinical evaluation of ureidosulfamate carbonic anhydrase IX/XII inhibitors in the treatment of cancers. *Int J Mol Sci* 20:6080, 2019
57. Siebels M, Rohrmann K, Oberneder R, et al. A clinical phase I/II trial with the monoclonal antibody cG250 (RENCAREX®) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients. *World J Urol* 29:121–126, 2011
58. Nocentini A, Moi D, Balboni G, et al. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline-based aromatic sulfamates with potent carbonic anhydrase isoforms II, IV and IX inhibitory efficacy. *Bioorganic Chem* 77:633–639, 2018
59. Ibrahim HS, Abou-Seri SM, Tanc M, et al. Isatin-pyrazole benzenesulfonamide hybrids potently inhibit tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII. *Eur J Med Chem* 103:583–593, 2015