

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Libuše Černá
Školitel: PharmDr. Miloslava Netopilová, Ph.D.
Název diplomové práce: Imunodetekce enzymů redukujících karbonylovou skupinu (Western blotting)

Enzymy redukující karbonylovou skupinu jsou důležité jak pro metabolizaci eobiotik, tak i xenobiotik. Tyto enzymy se dělí na tři nadrodiny : aldo-keto reductasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR) a dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR). Součástí SDR nadrodiny je i 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1 (11 β -HSD1). Tento enzym je důležitý pro aktivaci steroidního hormonu kortisonu na jeho aktivní formu kortisol, ale podílí se i na přeměně některých xenobiotik, např. protinádorového léčiva oracinu. Redukce karbonylové skupiny oracinu se však kromě 11 β -HSD1 účastní i další enzym lokalizovaný v mikrosomální membráně. Při purifikaci tohoto neznámého enzymu byla použita separace na Q Sepharose. Cílem práce bylo pomocí imunodetekce (Western blotting) zjistit, v kterých frakcích po separaci se vyskytuje 11 β -HSD1. Pro Western blotting byla použita nitrocelulózoová membrána, primární polyklonální králičí protilátka proti 11 β -HSD1 v ředění 1:1000, sekundární polyklonální protilátka s navázanou křenovou peroxidasou v ředění 1:1000 a chemiluminiscenční detekční systém ECL Plus firmy Amersham. Čas blotování byl zvolen 60 minut, inkubace s primární protilátkou 60 minut a se sekundární protilátkou 90 minut (obě za laboratorní teploty). Enzym 11 β -HSD1 byl nalezen ve frakcích A11, A12, B12, B11, B10 získaných separací jaterních mikrosomů na Q Sepharose. Předpokládá se, že tyto frakce obsahují i hledaný enzym. V ostatních frakcích nebyla 11 β -HSD1 zjištěna.