

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**PŘÍPRAVA LIDSKÉHO DHRS1 ENZYMU A JEHO  
ZÁKLADNÍ CHARAKTERIZACE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. LUCIE ZEMANOVÁ, Ph.D.**

**Konzultant: PharmDr. Hana Štambergová, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2016**

**Kristýna Šperková**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne 13. 5. 2016

Kristýna Šperková

**Poděkování:**

„Děkuji své školitelce RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D. a rovněž PhamDr. Haně Štambergové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Poděkování patří rovněž mé rodině a přátelům za projevenou podporu a povzbuzení.“

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických věd**

**Kandidát:** Kristýna Šperková

**Školitel:** RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Příprava lidského DHRS1 enzymu a jeho základní charakterizace

Dehydrogenasa/reduktasa SDR rodiny člen 1 (DHRS1, SDR19C1) je nedokonale charakterizovaný zástupce nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Lidské SDR enzymy katalyzují především NADPH-dependentní reakce s mnoha rozličnými substráty a hrají důležitou roli v biochemických procesech souvisejících s metabolismem lipidů, aminokyselin, steroidních hormonů, retinoidů nebo prostaglandinů. Kromě fyziologických procesů jsou lidské SDR enzymy zapojeny do patofyziologických procesů a detoxifikace xenobiotik. Předpokládá se, že i doposud necharakterizovaní zástupci SDR nadrodiny by mohli mít podobnou či překryvnou funkci. I lidská DHRS1 vykazuje fylogenetickou podobnost s enzymy hrajícími významnou roli v lidském organismu, ale zatím neexistují dostatečné informace, které by tuto úlohu DHRS1 potvrzovaly.

Cílem této práce bylo stanovit základní biochemické vlastnosti lidské DHRS1 a zjistit, zda je aktivní vůči substrátům s karbonylovou skupinou. Aktivita byla testována i na základě bioinformatických dat, podle kterých se usuzuje možné zapojení lidské DHRS1 do redukčních reakcí. Pro testování katalytické aktivity byla připravena rekombinantní forma DHRS1 pomocí metody klonování nezávislého na ligase a bakulovirového expresního systému. Ze získaných výsledků rekombinantní formy DHRS1 vyplývá, že se jedná o mikrosomální periferní protein, který interaguje s membránou endoplasmatického retikula na její vnější straně s orientací polypeptidového řetězce do cytosolu. Katalytickou aktivitu se podařilo detekovat vůči některým ligandům s karbonylovou skupinou, jako např.: estron, kortison, glukosa monohydrát, prednison, ketotifen nebo 4-benzoylpyridin.

# ABSTRACT

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Kristýna Šperková

**Supervisor:** RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Preparation of human DHRS1 enzyme and its basic characterization

Dehydrogenase/reductase SDR family member 1 (DHRS1, SDR19C1) is imperfectly characterized representative of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily. Human SDRs catalyze especially NADPH-dependent reactions with many different substrates and play important roles in the biochemical pathways related to the metabolism of lipids, amino acids, steroid hormones, retinoids and prostaglandins. Besides physiological processes are human SDR enzymes involved in pathophysiological processes and detoxification of xenobiotics. It is believed that even previously uncharacterized members of SDR superfamily could have a similar or overly function. Even human DHRS1 shows phylogenetic similarity with enzymes playing an important role in the human body, but so far there is insufficient information to make this task of DHRS1 confirmed.

The aim of this study was to specify the basic biochemical properties of human DHRS1 and determine whether it is active towards substrates with a carbonyl group. This activity was tested on the basis of bioinformatics data, whereby it is considered possible involvement of human DHRS1 in reductive reactions. To test a catalytic activity, recombinant form of DHRS1 was prepared using methods of ligase independent cloning and baculovirus expression system. The obtained results of recombinant form DHRS1 shows that it is a peripheral microsomal protein that interacts with the membrane of the endoplasmic reticulum (at the outside) with the orientation of the polypeptide chain into the cytosol. Catalytic activity was detected towards some ligands with a carbonyl group e.g.: estrone, cortisone, glucose monohydrate, prednisone, ketotifen or 4-benzoylpyridine.

# OBSAH

ABSTRAKT .....	4
ABSTRACT .....	5
1. ÚVOD .....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1 Nadrodina SDR enzymů .....	9
2.2 Nomenklatura SDR nadrodiny .....	11
2.3 Lidské SDR enzymy .....	14
2.3.1 Lidské karbonylreduktasy .....	14
2.3.2 Lidské retinoldehydrogenasy .....	15
2.3.3 Lidské 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy .....	18
2.3.4 Lidské 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy .....	23
2.3.5 Lidské dehydrogenasyreduktasy (DHRS) .....	25
3. CÍL PRÁCE .....	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
4.1 Materiál a pomůcky .....	30
4.1.1 Přístrojové vybavení .....	30
4.1.2 Chemikálie .....	31
4.1.3 Enzymy .....	32
4.1.4 Buňky a plasmidy .....	32
4.1.5 Kity .....	32
4.1.6 Protilátky .....	33
4.1.7 Pufry a růstová média .....	33
4.1.8 Molekulové markery .....	34
4.2 Příprava rekombinantní formy lidské DHRS1 .....	35
4.2.1 Amplifikace pFB-CT10HF-LIC vektoru .....	35
4.2.2 Linearizace vektoru pFB-CT10HF-LIC .....	35
4.2.3 Amplifikace DHRS1 insertu .....	36
4.2.4 Klonování nezávislé na ligase (LIC) .....	38
4.2.5 Ověření ligačního kroku pomocí specifických primerů .....	39

4.2.6	Příprava rekombinantních bakmidů.....	40
4.2.7	Příprava rekombinantního bakuloviru .....	41
4.2.8	Expres rekombinantní formy lidské DHRS1 a příprava P1 a P2 virálních roztoků v hmyzích <i>Sf9</i> buňkách .....	41
4.3	Příprava mikrosomální frakce z <i>Sf9</i> buněk.....	42
4.3.1	Příprava mikrosomální frakce s rekombinantní DHRS1 .....	42
4.3.2	Ověření rekombinantní DHRS1 v mikrosomální frakci.....	43
4.3.3	Stanovení koncentrace proteinu.....	45
4.4	Stanovení topologie DHRS1 .....	45
4.4.1	Alkalická extrakce a extrakce detergentem .....	45
4.4.2	Inkubace s proteinasou K.....	46
4.5	Stanovení specifické enzymové aktivity DHRS1.....	47
5.	VÝSLEDKY.....	50
5.1	Linearizace plasmidu pFB-CT10HF-LIC a klonování lidské DHRS1.....	50
5.2	Potvrzení ligačního kroku DHRS1 insertu.....	51
5.3	Příprava bakmidů .....	51
5.4	Infikování hmyzí buněčné linie <i>Sf9</i> buněk.....	52
5.5	Expres DHRS1 v mikrosomální frakci.....	53
5.6	Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v mikrosomální frakci s DHRS1 .....	54
5.7	Membránová topologie DHRS1.....	54
5.8	Stanovení specifické enzymové aktivity.....	56
6.	DISKUSE .....	60
7.	ZÁVĚR .....	64
	Seznam použitých zkratk.....	65
	POUŽITÁ LITERATURA .....	68

# 1. ÚVOD

Přestože je lidský genom již více než 15 let rozluštěn, celé řadě genů nebyla doposud přiřazena jakákoliv biologická funkce. Je pravděpodobné, že tyto geny resp. proteiny, které jsou těmito geny kódovány, mohou hrát roli v řadě fyziologických či patofyziologických dějů (Štambergová, 2013). To platí i pro členy nadrodiny SDR, z nichž některé jsou prozkoumané velmi málo nebo vůbec. Například lidská 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 je spojována s patogenezí metabolických poruch, jako jsou diabetes mellitus typu 2 a metabolický syndrom (Škarydová & Wsól, 2011). Diabetes mellitus typu 2 je mimo jiné provázen zvýšenou expresí lidské dehydrogenasy/reduktasy (SDR rodiny) člen 7 (DHRS7) ve svalech (Štambergová et al., 2016). Lidské retinoldehydrogenasy (a jejich změněná exprese) hrají roli v karcinogenezi tlustého střeva a jsou stejně jako lidská DHRS7 spjaty s hormon-dependentním nádorem prostaty, kde se jako prognostický marker využívá lidská dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodiny) člen 2 (DHRS2) (Gabrielli & Tofanelli, 2012; Škarydová & Wsól, 2011; Štambergová et al., 2016). Do patogeneze neurodegenerativních poruch jako je Alzheimerova nemoc je zapojena lidská 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 10, která je nadměrně exprimována v neuronech postižených touto nemocí (Yan et al., 1997). U hormon-dependentního nádoru prsu byla detekována změněná exprese 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 a jako prognostický marker je využívána DHRS2 (Škarydová & Wsól, 2011, Štambergová et al., 2016).

Gen pro lidskou dehydrogenasu/reduktasu SDR rodiny člen 1 (DHRS1) byl poprvé izolován z komplementární DNA mozku lidského plodu. DHRS1 patří mezi proteiny, o kterých zatím chybí ucelené informace pro dostatečnou charakterizaci enzymu. Vzhledem k tomu, že se předpokládá jeho mikrosomální lokalizace, tak je práce s ním mnohem obtížnější v porovnání s cytosolickými formami jiných zástupců. Lidská DHRS1 obsahuje sekvenční motivy, které poukazují na možné zapojení do (pato)fyziologických dějů. Navíc byla detekována v játrech (Wu et al., 2001) a je tedy možné, že by se mohla podílet na biotransformaci xenobiotik.

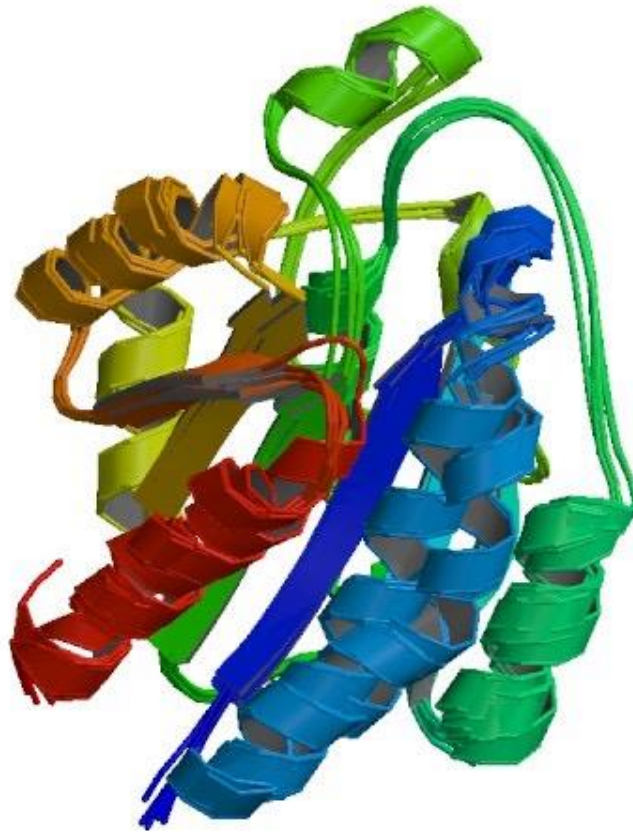


## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nadrodina SDR enzymů

Jedná se o jednu z největších proteinových nadrodin, která zahrnuje velmi heterogenní skupinu enzymů, jejíž zástupci byli nalezeni ve všech formách života, u Archaea, bakterií i eukaryot (Bray et al., 2009). První z členů této nadrodiny byly charakterizovány v 80. letech minulého století. Jednalo se o hmyzí alkoholdehydrogenasu a bakteriální ribitoldehydrogenasu, které tím daly vzniku označení SDR. Na začátku 90. let již bylo členů 20 a o 2 roky později po zavedení tzv. "Hidden Markov" modelů měla SDR nadrodina 47 000 členů (Persson & Kallberg; 2009). Poslední zaznamenaný údaj (2015) v databázi UniProt je téměř 680 000 členů (Jörnvall et al., 2015).

Polypeptidový řetězec je tvořen přibližně 250 aminokyselinami, ale existují zástupci, kteří mají prodloužený C-konec řetězce a obsahují až 350 aminokyselin. SDR proteiny mají strukturálně konzervativní N-konec, který váže nikotinamidadenin dinukleotid (NAD(H)), respektive nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (NADP(H)) jako kofaktor. Z kinetických studií vyplývá, že pro SDR enzymy je poměrně typický uspořádaný mechanismus (tzv. bi-bi) dvousubstrátové reakce, kdy kofaktor se váže jako první a odpojuje se jako poslední (Kavanagh et al., 2008). Nadrodina SDR představuje skupinu s poměrně nízkou sekvenční identitou, která se pohybuje v rozmezí 20 – 30 %. Přesto existují určité sekvenční motivy vyskytující se u většiny členů SDR nadrodiny. Jádro SDR proteinů je tvořeno Rossmannovým záhybem, který obsahuje 7 paralelně uspořádaných  $\beta$ -listů a každý z nich je na obou stranách obklopen třemi  $\alpha$ -helixy (Obrázek 1). V řetězci se nachází motiv bohatý na glycin (Thr-Gly-x-x-Gly-x-Gly), kde se mohou vázat nukleové kyseliny, respektive umožňuje vazbu pyrofosfátové části kofaktoru. Dále je to motiv katalytického zbytku, kde se tyrosin využívá jako kyselý nebo zásaditý katalyzátor. Aktivní místo je tvořeno katalytickou tetradou Tyr-Lys-Ser-Asn (Bray et al., 2009).



**Obrázek 1** - Rossmannův záhyb tvořený  $\beta$ -listy, které jsou obklopeny  $\alpha$ -helixy (Internet 1).

Aktivní místo nacházející se na C-konci polypeptidového řetězce váže substrát. Vzhledem k variabilitě C-konce je umožněna vazba mnoha rozličných substrátů.

Jak už bylo zmíněno, enzymy této skupiny obvykle katalyzují NAD(P)(H)-dependentní reakce s rozličnými substráty jako jsou polyoly, steroidy, retinoidy, deriváty mastných kyselin, prostaglandiny a v neposlední řadě i xenobiotika. Mimo oxidoredukčních reakcí jsou schopny katalyzovat i další reakce a mohou tak mít funkci například lyasy, isomerasy, dehydratasy, dekarboxylasy, dehalogenasy, epimerasy a sulfotransferasy (Bray et al., 2009; Kavanagh et al., 2008; Škarydová & Wsól 2011). Zástupci SDR nadrodiny mohou být monomery, dimery nebo tetramery (Persson & Kallberg; 2013), většina ale představuje oligomery s homodimerní nebo homotetramerní kvarterní stukturou (Kavanagh et al., 2008).

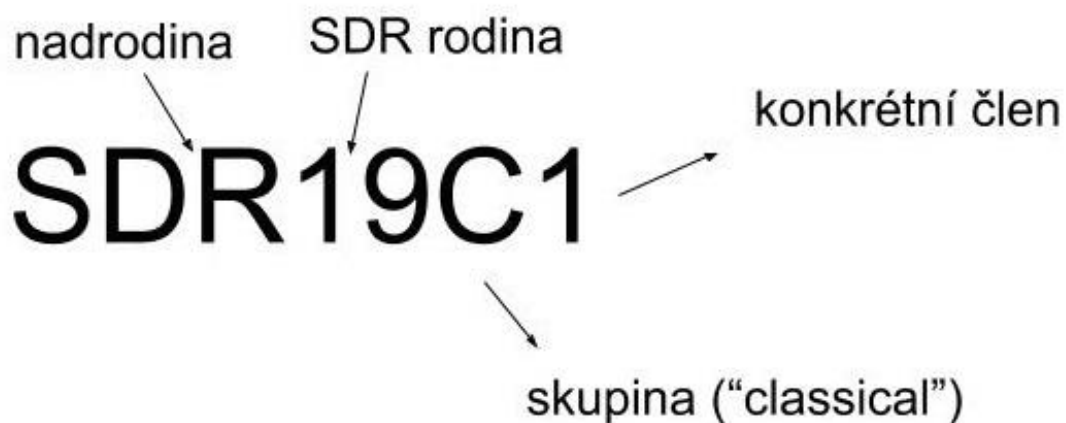
## 2.2 Nomenklatura SDR nadrodiny

Vzhledem k velkému počtu proteinů této nadrodiny, její heterogenitě a neustále přibývajícím členům bylo nutné vytvořit systém, s jehož pomocí budou jednotlivé proteiny klasifikovány. Použitím počítačového algoritmu tzv. HMM (Hidden Markov Model) byl vytvořen semi-automatický subklasifikační systém, který na základě určitých motivů rozřazuje proteiny do rodin. Díky tomuto modelu byly SDR proteiny rozděleny do 464 rodin (Persson, Kallberg; 2013). Pomocí dílčího dělení na základě charakteristických motivů v aktivním místě bylo vytvořeno 7 podskupin SDR nadrodiny. Každé podrodině je přiřazeno označení ve formě velkého písmena indikujícího konkrétní typ: C=“Classical“, E=“Extended“, A=“Atypical“, I=“Intermediate“, X=“Complex“, D=“Divergent“ a U=“Unassigned“ (Persson & Kallberg, 2013). Největší počet lidských SDR zástupců patří do podrodiny „classical“ (54) a „extended“ (11). Odlišnosti mezi jednotlivými typy jsou variabilní. „Classical“ podskupina obsahuje relativně malé vazebné místo tvořené podjednotkou  $\alpha$ -helixu, které je lokalizováno mezi 6.-7.  $\beta$ -listem. Naproti tomu „extended“ mají podstatně větší vazebné místo pro substrát obsahující 2 paralelně uspořádané  $\beta$ -listy a  $\alpha$ -helixový svazek tvořený třemi  $\alpha$ -helixy. (Bray, et al., 2009). Obecně se mezi sebou všechny podrodiny liší specifickou sekvencí pro aktivní místo a specifickou sekvencí vazebného místa pro kofaktor (Tabulka 1).

**Tabulka 1** - Rozdělení SDR proteinů na podrodiny (Persson & Kallberg, 2013).

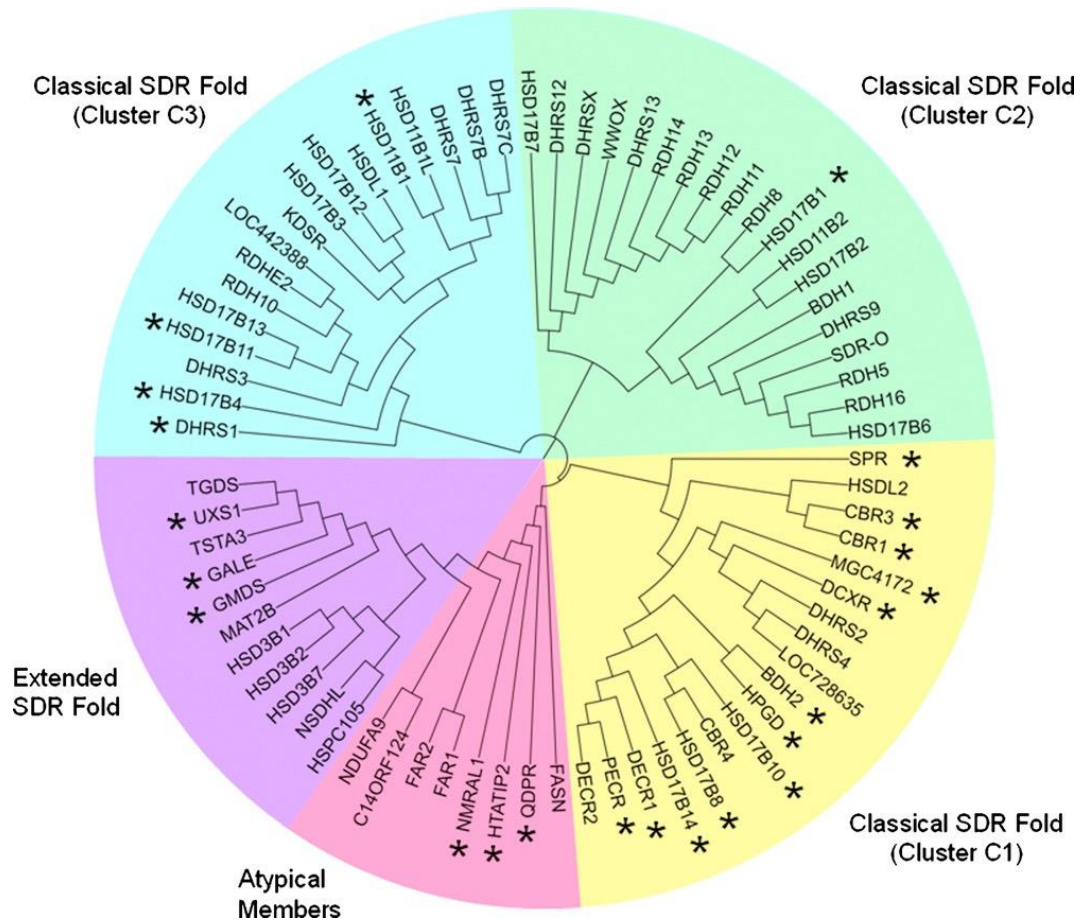
Typ	Počet členů	Počet rodin	Enzymová aktivita	Specifická sekvence aktivního místa
Classical	67762	285	Oxidoreduktasy	Tyr-Gly-x-x-x-Gly-x-Gly
Extended	37604	81	Epimerasy, Dehydratasy	Tyr-Gly-x-x-Gly-x-x-Gly
Atypical	419	2	-	Postrádá katalytický tyrosin
Intermediate	445	1	Drosophyla ADH	Gly/Ala-x-x-Gly-x-x-Gly/Ala
Divergent	3415	4	Enoylreduktasy	Gly-x-x-x-x-x-Ser-Ala
Complex	3976	15	$\beta$ -ketoacyl-reduktasy	Tyr-x-x-x-Asn
Unassigned	9319	76	-	-

Lidské rodiny SDR enzymů jsou v nomenklatuře označovány nejnižšími čísly (1-48). Poté následují rodiny, které obsahují savčí nebo jiné eukaryotické členy. Dále jsou číslovány rodiny, které se vyskytují u bakterií a Archea. Jako poslední jsou číslovány rodiny, které mají své zástupce pouze u bakterií. Neexistuje však jediná rodina, která by obsahovala členy vyskytující se jen v doméně Archea. Za číselným označením rodiny se uvádí písmeno, které značí konkrétní podrodinu („classical“, „extended“ atd.). Poslední číslo v nomenklatuře značí konkrétní člen SDR rodiny (Obrázek 2). Někdy se za poslední číslici přičepuje písmeno P, které značí pseudogen. Pokud se rozlišují jednotlivé polymorfismy, tak se značí hvězdičkou (\*) jako například SDR11E1\*1 (Persson et al., 2010).



**Obrázek 2** - Nomenklatura lidské DHRS1.

Na základě analýzy sekvencí a predikované sekundární struktury byly „classical“ SDR dále rozděleny do 3 podtypů tzv. klastrů (C1, C2, C3) (Obrázek 3). Klastř C1 obsahuje 18 členů a průměrná délka polypeptidového řetězce je 281 aminokyselin. Jedná se o enzymy, které nejsou membránově vázány, jejich substrátová specifita je velmi rozmanitá a zahrnuje sloučeniny související s koenzymem A, prostaglandiny a molekuly podobné chinonu. Naopak do klastru C2 (19 členů) a C3 (17 členů) se řadí typicky membránově vázané enzymy, řetězec je tvořen asi 340 aminokyselinami a obecně nejčastějšími substráty jsou retinoidy a steroidy. Od klastru C1 se liší přítomností N-koncové transmembránové (TM) jednotky. Mezi „extended“ zástupce patří epimerasy (6 členů), jejichž polypeptidový řetězec je tvořen 360 aminokyselinami a nejsou membránově vázány a 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy (5 členů), které obsahují 365 aminokyselin a podílí se na metabolismu steroidů (Bray et al., 2009).



**Obrázek 3** - Schéma sekvence klastrů v SDR nadrodině. Zobrazeny jsou podskupiny „classical“ (C1, C2, C3), „extended“ a „atypical“. Krátké úseky ilustrují blízké homology, zatímco delší větve označují vzdálenější evoluční vztah (Bray et al., 2009).

Z uvedeného diagramu (Obrázek 3) je možné pozorovat fylogenetickou spojitost lidské DHRS1 s některými enzymy, například: 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasou 1, 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasami a retinoldehydrogenasami. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 představuje doposud jediný mikrosomální enzym, u kterého byla dobře charakterizovaná funkce v biotransformaci xenobiotik s karbonylovou skupinou. Vzhledem k těmto souvislostem se u lidské DHRS1 dá uvažovat o možném zapojení do metabolismu steroidů, retinoidů, případně detoxifikaci xenobiotik.

## **2.3 Lidské SDR enzymy**

U člověka bylo doposud nalezeno 75 genů, jimi kódované proteiny se řadí do 47 SDR rodin. Zhruba 30 % lidských zástupců zůstává bez přiřazení biologické funkce (Persson & Kallberg, 2013). V následujícím textu budou uvedeni významní zástupci klastru 3, případně SDR proteiny z jiných klastrů, které jsou dobře popsány a informace o nich sloužily k vytipování testovaných sloučenin, které by mohly být ligandy lidské DHRS1.

### **2.3.1 Lidské karbonylreduktasy**

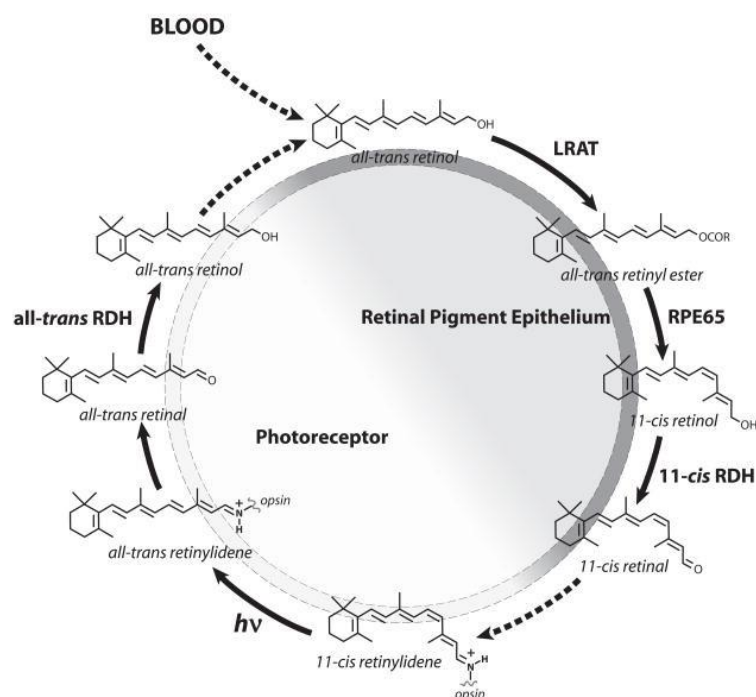
V lidském genomu se nachází 3 geny kódující karbonylreduktasy CBR1 (SDR21C1), CBR3 (SDR21C2) a CBR4 (SDR45C1) (Malátková et al., 2010). Jedná se o NADPH-dependentní cytosolické enzymy, které jsou většinou monomerní a mají širokou substrátovou specifitu, která zahrnuje jak endogenní tak i xenobiotické karbonylové sloučeniny. Katalyzují redukci endogenních prostaglandinů, steroidů a dalších alifatických aldehydů a ketonů. Také redukují širokou škálu xenobiotických chinonů odvozených od polycyklických aromatických uhlovodíků (Forrest et al., 2000).

#### **Karbonylreduktasa 1 (CBR1, SDR21C1)**

Lidská karbonylreduktasa 1 je NADPH-dependentní reduktasa, která patří do klastru 1 a je jedním z nejlépe charakterizovaných členů SDR nadrodiny (Škarydová & Wsól, 2011). Jedná se o cytosolický monomerní enzym, který je široce distribuován a ve vysokých hladinách se nachází v epidermis, játrech, žaludku, ledvinách a v epiteliálních buňkách gastrointestinálního traktu. Tyto orgány jsou často vystaveny různým exogenním sloučeninám, což plně koresponduje s účastí CBR1 na detoxifikaci xenobiotik (Hoffmann & Maser, 2007). Mezi substráty CBR1 patří různé cizorodé látky včetně léků, například: haloperidol, doxorubicin, daunorubicin, ketoprofen, warfarin, *p*-chinon menadion a *o*-chinony odvozené od polycyklických aromatických uhlovodíků, z nichž byly jako vhodné substráty zkoumány benzochinon, naftochinon, 9,10-fenantrenchinon, menadion. Z karcinogenů obsažených v tabákovém kouři se CBR1 podílí na detoxifikaci benzo[a]pyrenu a pro tabák specifického nitrosamin 4-methylnitrosoamin-1-(3-pyridyl)-butan-1-onu (NNK). Spektrum endogenních substrátů zahrnuje steroidy, eikosanoidy a aldehydy mastných kyselin (Pilka et al., 2009).

### 2.3.2 Lidské retinoldehydrogenasy

Retinoidy tvoří skupinu více než 4000 přírodních i syntetických derivátů vitamínu A. Některé z nich mají důležité fyziologické funkce včetně zapojení do cyklu vidění (Obrázek 4). Například 11-*cis*-retinal má funkci chromoforu zrakového pigmentu v oku a kyselina retinová reguluje procesy diferenciaci, morfogeneze, reprodukce a vývoje skrz interakci s transkripčními faktory. Téměř všechny retinoldehydrogenasy jsou mikrosomální enzymy patřící do SDR nadrodiny. Kromě retinoldehydrogenasy 13, která byla detekována v mitochondriích, jsou ostatní členové lokalizovány v membráně hladkého endoplasmatického retikula (ER). Všechny retinoldehydrogenasy jsou buď NADP(H)-nebo NAD(H)-dependentní enzymy. Rozdílné koncentrace těchto kofaktorů jsou jak v cytosolu, tak v lumen ER a lidské retinoldehydrogenasy zahrnují enzymy s redukční i oxidační aktivitou (Škarydová & Wsól, 2011). Přestože se většina zástupců lidských retinoldehydrogenas řadí do klastru 2, nemůže být opomenut jejich význam a pro pochopení všech souvislostí zde budou uvedeni i tito zástupci.



**Obrázek 4** - Cyklem vidění je nazýván proces recyklace 11-*cis*-retinalu. Funkci chromoforu zastává 11-*cis*-retinal, který se po absorpci fotonu fotoisomerizuje na all-*trans* retinal, vyvolá konformační změnu opsinu, následně aktivuje G-protein transducin a iniciuje vidění. Pro regeneraci zrakových pigmentů je all-*trans*-retinal přeměněn pomocí retinoldehydrogenasy na all-*trans*-retinol, který je exportován z fotoreceptorů do pigmentového epitelu sítnice. Následně je all-*trans*-retinol esterifikován a oxidován na 11-*cis*-retinol (Nikolaeva et al., 2009).

### **Retinoldehydrogenasa 5 (RDH5; SDR9C5)**

Lidská RDH5 je prvním identifikovaným enzymem skupiny retinoldehydrogenas. RDH5 je integrální protein nacházející se v membráně ER, který svou katalytickou doménou směřuje do lumen ER. Je lokalizován v pigmentovém epitelu sítnice a katalyzuje poslední oxidativní krok k tvorbě 11-*cis*-retinalu z 11-*cis*-retinolu během cyklu vidění (Lidén et al., 2003). Bylo prokázáno, že mutace v genu RDH5 způsobuje tzv. fundus albipunctatus, což je stacionární forma vrozené noční slepoty (Kedishvili et al., 2013; Lidén et al., 2001).

### **Retinoldehydrogenasa 10 (RDH10; SDR16C4)**

Lidská RDH10 byla identifikována na základě sekvenční podobnosti se sítnicovou retSDR1 (DHRS3), když vědci hledali enzym, který se podílí na tvorbě all-*trans*-retinalu v pigmentovém epitelu sítnice. Struktura lidské RDH10 je velmi konzervativní a má z 99-100 % identickou aminokyselinovou sekvenci s orthologem myši resp. hovězího dobytka. Ve srovnání s členy rodiny SDR9C all-*trans*-retinol/sterol dehydrogenasami není lidská RDH10 aktivní vůči 3 $\alpha$ -hydroxysteroidům, ale vykazuje mnohem větší (~28 násobnou) afinitu k all-*trans*-retinolu než je tomu u RoDH4 nebo u 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy typu 6 (RL-HSD). RDH10 je hlavní retinoldehydrogenasou, která je zodpovědná za biosyntézu all-*trans*-retinové kyseliny v průběhu embryonálního vývoje (Kedishvili, 2013).

### **Retinoldehydrogenasa 11 (RDH11; SDR7C1)**

Jedná se o mikrosomální NADPH-dependentní enzym zakotvený v membráně endoplasmatického retikula, který se podílí na metabolismu all-*trans*, 9-*cis*- a 11-*cis*-retinalu (Škarydová & Wsól, 2011). Většina polypeptidového řetězce je umístěna na cytosolické straně membrány (Kedishvili, 2013). Původně se předpokládalo, že se kromě oka vyskytuje tento enzym hlavně v prostatě. Z toho plyne i anglické pojmenování „prostate short-chain dehydrogenase/reductase“. Experimenty s použitím specifických protilátek ale poukázaly na expresi RDH11 v ledvinách, játrech, varlatech, lačníku a v dalších orgánech (Škarydová & Wsól, 2011). Tento enzym vykazuje více než 800x vyšší afinitu k NADP(H), než k NAD(H) a je ~50x účinnější ve směru redukce oproti oxidaci (Kedishvili, 2013). RDH11 vykazuje prokazatelnou homologii s hydroxysteroiddehydrogenasami SDR nadrodiny, což vede k hypotéze, že RDH11 by se



mohla podílet na metabolismu steroidů (Lin et al., 2001, Škarydová & Wsól, 2011). Provedená inkubace rekombinantní formy RDH11 s různými steroidy však tuto hypotézu nepotvrdila (Kedishvili et al., 2002; Škarydová & Wsól, 2011). Myší RDH11 (mRDH11, SCALD) je schopna redukovat nenasycené aldehydy se středně dlouhým řetězcem, zvláště pak nonanal. Funkce RDH11 v detoxikaci těchto reaktivních aldehydů však nebyla potvrzena (Škarydová & Wsól, 2011).

### **Retinoldehydrogenasa 12 (RDH12, SDR7C2)**

Lidská RDH12 je NADPH-dependentní enzym, u kterého zatím není známá jeho membránová topologie. RDH12 je lokalizována především ve vnitřních segmentech fotoreceptorů. Díky své vysoké katalytické účinnosti dokáže zpracovat velké množství *all-trans*-retinalu, který difunduje do vnitřních segmentů ve fotoreceptorech a chrání tak oko před tímto toxickým retinaldehydem (Kedishvili, 2013). Kromě oka jsou dalšími místy exprese RDH12 ledviny, játra a slinivka břišní. Lidská RDH12 vykazuje 79% sekvenční podobnost s RDH11 a má tedy stejnou substrátovou specifitu v rámci metabolismu retinoidů jako RDH11. RDH12 je však n rozdíl od RDH11 schopna přeměny dihydrotestosteronu na androstandiol. Navíc také metabolizuje (podobně jako myší ortholog mRDH11) toxické nenasycené aldehydy se středně dlouhým řetězcem jako je nonanal, *cis*-6-nonenal a *trans*-2-nonenal, které vznikají z nenasycených mastných kyselin (Škarydová & Wsól, 2011). Fotoreceptory oka jsou bohaté na dokosaheptaenovou kyselinu, čímž se stávají náchylnější na poškození. Mutací v genu RDH12 dochází ke vzniku Leberovy kongenitální amaurozy, která se vyznačuje dystrofií sítnice (Kedishvili, 2013).

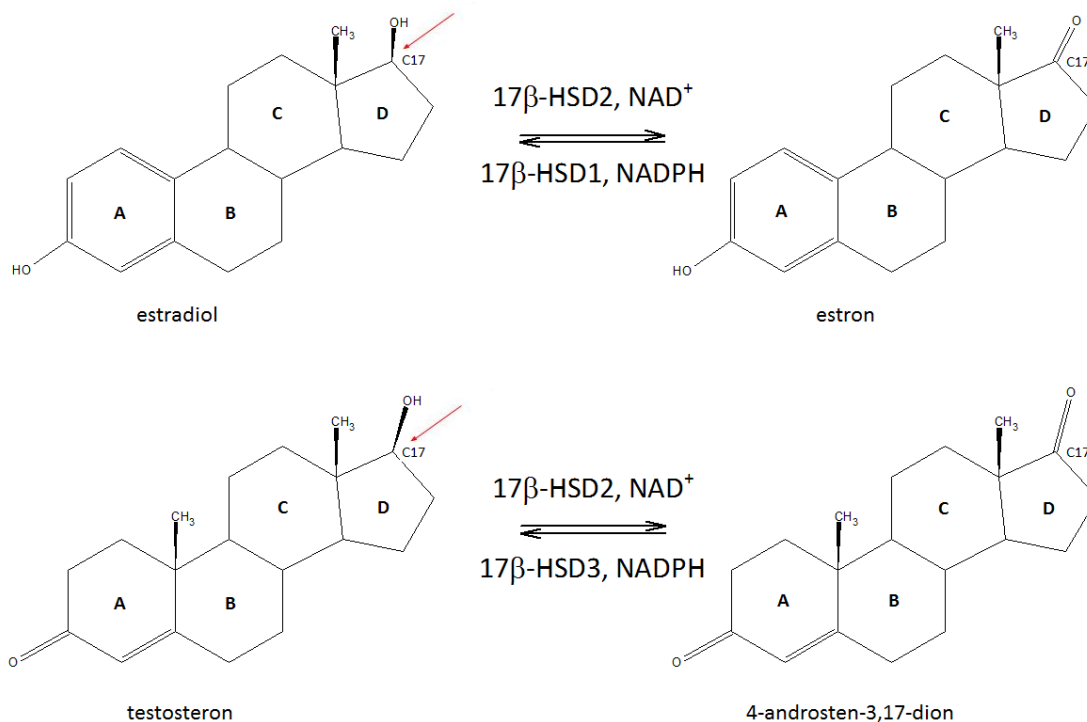
### **Retinoldehydrogenasa 14 (RDH14, SDR7C4)**

RDH14 je membránově vázaná, NADPH-dependentní reductasa *all-trans*-retinalu. Vykazuje 40-46% sekvenční shodu s RDH11 a RDH12. Polypeptidový řetězec lidské RDH14 je delší (336 aminokyselin) než u RDH11 (318 aminokyselin). Retinoldehydrogenasa 14 je hojně exprimovaný mikrosomální enzym, který vykazuje aktivitu retinalreduktasy s vysokou afinitou pro *all-trans*-retinal a NADP(H). *In vitro* v oxidačním směru může být RDH14 také aktivní, ale s 4x nižší účinností než v redukčním směru. RDH14 preferuje jako substrát *all-trans*-retinal nad 9-*cis*-retinalem a zdá se, že je

katalyticky více účinný (ve smyslu *all-trans*-retinaldehyd reduktasy), než RDH11 (Kedishvili, 2013).

### **2.3.3 Lidské 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy**

I když ne všechny lidské 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 $\beta$ -HSD) patří do klastru 3, jsou natolik významné, že zde budou také uvedeny. Skupina 17 $\beta$ -HSD je tvořena 14 různými savčími enzymy, z nichž 12 je pouze lidských a 17 $\beta$ -HSD6 a 9 byly zaznamenány také u hlodavců (Škarydová & Wsól, 2011). Všechny 17 $\beta$ -HSD kromě 17 $\beta$ -HSD5 (AKR1C3-patří mezi aldo-ketoreduktasy) jsou členové SDR nadrodiny a modulují biologickou účinnost estrogenů a androgenů pomocí konverze (oxidace/redukce) na uhlíku C17 steroidního skeletu, přičemž ketoformy jsou inaktivní, zatímco hydroxylové formy jsou aktivní a mají přístup k jaderným receptorům (Obrázek 5) (Lukacik et al., 2006, Škarydová & Wsól, 2011). Jedná se o klíčové enzymy, které se podílejí na vývoji, růstu a funkci všech reprodukčních tkání u mužů i žen. Studium této skupiny enzymů se provádí hlavně kvůli určení jejich významu v patologických stavech souvisejících s hormon-dependentními nádory (Škarydová, Wsól, 2011). Tkáňová distribuce lidských 17 $\beta$ -HSD je velmi rozmanitá, pravděpodobně kvůli ochraně tkání před nadměrným množstvím aktivních steroidů (Lukacik et al., 2006).



**Obrázek 5** - Znázornění funkce některých 17β-HSD v metabolismu pohlavních hormonů. K hlavním změnám dochází ve steroidním skeletu na uhlíku číslo 17 (C17).

### 17β-hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (17β-HSD1, SDR28C1)

Lidská 17β-HSD1 patří do klastru 2 a jedná se o rozpustný dimer, který katalyzuje NADPH-dependentní redukci estronu na estradiol a v menší míře redukci androgenů, například 4-androsten-3,17-dionu na testosteron. Nejvyšší hladiny tohoto enzymu byly detekovány ve vaječnících, prsní tkáni a v placentě. Vzhledem k expresi a redukční aktivitě je lidská 17β-HSD1 považována za hlavní enzym podílející se na syntéze estradiolu (Lukacik et al., 2006).

### 17β-hydroxysteroiddehydrogenasa 2 (17β-HSD2, SDR9C2)

Lidská 17β-HSD2 patří do klastru 2 a na rozdíl od ostatních 17β-hydroxysteroiddehydrogenas, které jsou v membráně ER zakotveny pomocí N-koncové helikální sekvence, je 17β-HSD2 uchycena v této membráně pomocí C-koncové sekvence (Škarydová & Wsól, 2011). 17β-HSD2 katalyzuje NAD(H)-dependentní konverzi mezi testosteronem, 5α-dihydrotestosteronem a jejich 17-oxo

metabolity (Lukacik et al., 2006). Lidská 17 $\beta$ -HSD2 je aktivní také v biotransformaci xenobiotik, protože je schopna metabolizovat syntetický estrogen a ethinylestradiol, které se používají v hormonální antikoncepci a v hormonální substituční terapii. Tkáňová distribuce je velmi široká a vzhledem k prokázané expresi lidské 17 $\beta$ -HSD2 v játrech je pravděpodobné, že by mohla přispívat k jaterní inaktivaci syntetických steroidů (Škarydová & Wsól, 2011).

### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 3 (17 $\beta$ -HSD3, SDR12C2)**

Lidská 17 $\beta$ -HSD3 patří do klastru 3. Jedná se o NADPH-dependentní enzym lokalizovaný v membráně ER, který katalyzuje redukci 4-androsten-3,17-dionu na testosteron, 5 $\alpha$ -androstendionu na 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron a estronu na estradiol. Enzym je exprimován převážně ve varlatech a jeho základní funkce je tedy produkce testosteronu pohlavními žlázami, malé množství se pak vyskytuje v tukové tkáni a v prostatě (Mindnich et al., 2005). Deficit lidské 17 $\beta$ -HSD3 je spojen autosomální recesivní formou mužského pseudohermafroditismu, kdy pacientům chybí vnitřní reprodukční struktury (Lukacik et al., 2006; Škarydová & Wsól, 2011).

### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 4 (17 $\beta$ -HSD4, SDR8C1)**

Lidská 17 $\beta$ -HSD4 patří do klastru 3 a jedná se o peroxisomální NAD(H)-dependentní enzym účastnící se metabolismu žlučových kyselin (Lukacik et al., 2006; Škarydová & Wsól, 2011). Doména tohoto enzymu je rozdělena na tři části. N-koncová doména (dehydrogenasa) katalyzuje kromě NAD<sup>+</sup>-dependentní dehydrogenace estradiolu (v pozici C17) také specifickou oxidaci hydroxyacyl koenzymu A mastných kyselin s dlouhým řetězcem a žlučových kyselin na odpovídající ketoacyl koenzym A. Druhá doména (hydratasa) katalyzuje hydrataci *trans*-2-enoyl koenzymu A na hydroxyacyl koenzym A. Třetí doména, nespecifický protein přenášející lipidy (SCP2-sterol carrier protein), se nejspíše podílí na vazbě lipidových substrátů, nicméně tato funkce ještě nebyla plně prokázána. Mutace v genu pro lidskou 17 $\beta$ -HSD4 zapříčiňuje vznik Zellwegerova syndromu, který je charakterizovaný mikrocefalií, křečemi, hypotonií, hepatomegalií a pacient se dožívá pouze 5-12 měsíců života (Lukacik et al., 2006).

### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 6 (17 $\beta$ -HSD6, RL-HSD, SDR9C6)**

Tento enzym je specifický pro all-*trans*-retinol a má širší tkáňovou distribuci než retinoldehydrogenasa 4 (RoDH4). Nejhojněji se vyskytuje v játrech, ale určité hladiny můžeme najít i v extrahepatálních tkáních jako jsou plíce, placenta, mozek, varlata, prostata nebo slezina (Kedishvili, 2013). Lidská RL-HSD je v oxidačním směru aktivní také vůči steroidům. Konkrétními steroidními substráty jsou androsten, 5 $\alpha$ -androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol a alopregnanolon, přičemž oxidace 5 $\alpha$ -androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diolu na dihydrotestosteron představuje alternativní cestu tvorby androgenů (Škarydová & Wsól, 2011).

### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 7 (17 $\beta$ -HSD7, SDR37C1)**

Zpočátku se tento enzym označoval jako prolaktinový receptor spojený s proteinem, který byl poprvé naklonován z krysího žlutého tělíska (Lukacik et al., 2006). 17 $\beta$ -HSD7 je NADPH-dependentní mikrosomální enzym, který redukuje estron na estradiol a dihydrotestosteron na 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Kromě toho se částečně účastní redukce progesteronu a 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteronu. Nejvíce je exprimován v játrech, což souvisí s účastí 17 $\beta$ -HSD7 v metabolismu cholesterolu. Bylo dokázáno, že 17 $\beta$ -HSD7 redukuje zymosteron na zymosterol, což je přímý prekurzor cholesterolu. Lidská 17 $\beta$ -HSD7 se tedy podílí na biosyntéze steroidních hormonů, ale i na biosyntéze cholesterolu. Deficit redukující 17 $\beta$ -HSD7 vede k poruchám syntézy cholesterolu jako je tzv. CHILD syndrom (kongenitální hemidysplazie, ichtyoziformní erythrodermie a anomálie končetin) a X-vázaná chondrodysplazie (Škarydová & Wsól, 2011).

### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 10 (17 $\beta$ -HSD10, SDR5C1)**

Lidská 17 $\beta$ -HSD10 byla poprvé izolována jako amyloid- $\beta$  vázající protein, který je vysoce exprimován v centrální nervové soustavě (CNS) u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Původně se předpokládalo, že se tento enzym vyskytuje v membráně ER, pozdější studie však potvrdily lokalizaci v mitochondriích. Lidská 17 $\beta$ -HSD10 (později identifikovaná jako 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa typu 2) je oxidační NAD<sup>+</sup>-dependentní enzym s širokou substrátovou specifitou, podílející se na inaktivaci hormonů a katabolismu rozvětvených i nerozvětvených hydroxyacyl-CoA s krátkým řetězcem. Do metabolismu steroidních hormonů zasahuje oxidací estradiolu na méně účinný estron a oxidací

androstendiolu na účinný dihydrotestosteron. Další fyziologickou funkcí 17 $\beta$ -HSD10 je degradace 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA, který se v těle akumuluje při vrozené chybě v metabolismu isoleucinu (Lukacik et al., 2006).

#### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 11 (17 $\beta$ -HSD11, SDR16C2)**

Lidská 17 $\beta$ -HSD11 je pravděpodobně transmembránový enzym lokalizovaný v ER, který se řadí do klastru 3. Enzym je exprimován v játrech, sítnici, plicích, srdci, placentě, slinivce břišní, tenkém střevě, ve steroidogenních buňkách (Leydigovy buňky) i v dalších orgánech (Lukacik et al., 2006).

Expres oxidací 17 $\beta$ -HSD11 v epitelu tenkého střeva je velmi významná. Předpokládá se, že může působit na exogenní látky z potravy a chránit organismus před toxiny přijaté potravou (Škarydová & Wsól, 2011).

#### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 12 (17 $\beta$ -HSD12, SDR12C1)**

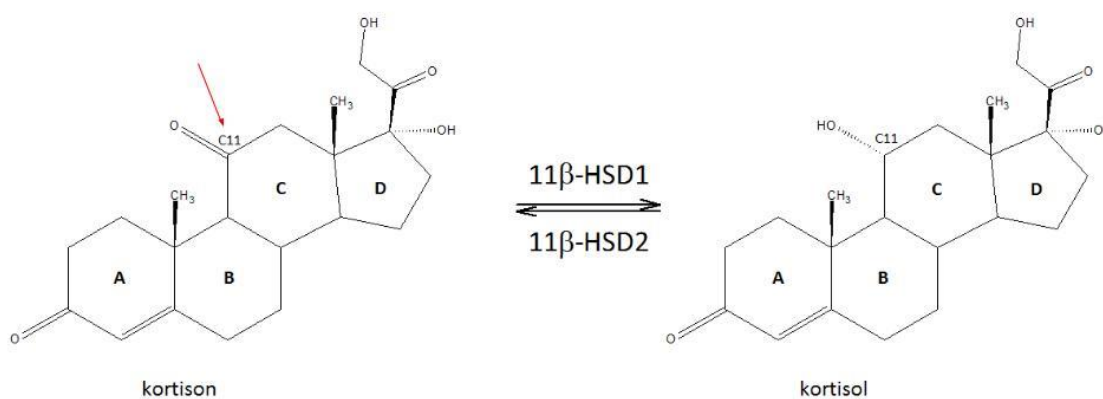
Lidská 17 $\beta$ -HSD12, která se řadí do klastru 3, vykazuje nejvyšší sekvenční podobnost s 17 $\beta$ -HSD3, ale co se týče vlastností a tkáňové distribuce, tak se podobá spíše 17 $\beta$ -HSD7. Je to mikrosomální NADPH-dependentní enzym lokalizovaný v membráně ER, poprvé identifikován jako 3-ketoacyl-CoA reductasa (KAR), který se podílí na prodloužení řetězce mastných kyselin s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem (Lukacik et al., 2006; Škarydová & Wsól, 2011). Později bylo zjištěno, že se 17 $\beta$ -HSD12 podílí na metabolismu steroidů, protože redukuje estron na estradiol (Škarydová & Wsól, 2011).

#### **17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 13 (17 $\beta$ -HSD13, SDR16C3)**

17 $\beta$ -HSD3 je nejnověji identifikovaný mikrosomální enzym této skupiny, který se řadí do klastru 3. Je lokalizovaný v membráně ER a nedávno byl připraven a popsán jako lidská dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem člen 9 (SCDR9). Tento protein sdílí 78% sekvenční podobnost s 17 $\beta$ -HSD11, která má vůči steroidům oxidační aktivitu (Liu et al, 2007, Škarydová & Wsól, 2011). Vzhledem k nedostatečným poznatkům není známo, jestli má 17 $\beta$ -HSD13 oxidační nebo redukční aktivitu. Také nejsou dostatečné studie na prokázání toho, zda se 17 $\beta$ -HSD13 účastní biotransformace xenobiotik, i když vzhledem k expresi, která je omezena pouze na játra, by se tato aktivita mohla předpokládat (Škarydová & Wsól, 2011).

### 2.3.4 Lidské 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy

Biologická aktivita jakéhokoliv z glukokortikoidů je spjata s přítomností hydroxylové skupiny na uhlíku C11 steroidního skeletu. Redukce této hydroxylové skupiny 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasou 1 na oxo skupinu vede k inaktivaci (Obrázek 6). Jako klíčové faktory v signalizační dráze glukokortikoidů byly popsány právě tyto aktivující a inaktivující tkáňově specifické enzymy. Lidské 11 $\beta$ -HSD jsou enzymy zodpovědné za konverzi glukokortikoidů, na buněčné úrovni fungují jako tzv. „molekulární spínače“, navíc chrání mineralokortikoidní receptor proti kortisolu (který vykazuje stejnou afinitu jak k mineralokortikoidnímu tak i ke glukokortikoidnímu receptoru) a umožňují vazbu aldosteronu (Škarydová & Wsól, 2011).



**Obrázek 6** - Funkce 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenas v metabolismu glukokortikoidů, které katalyzují přeměny na uhlíku číslo 11 (C11) steroidního skeletu.

### **11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 $\beta$ -HSD1, SDR26C1)**

Lidská 11 $\beta$ -HSD1 (klastr 3) je glykosylovaný protein, lokalizovaný v membráně endoplasmatického retikula. Do membrány ER je zakotven pouze pomocí jedné N-koncové domény, která předurčuje jeho luminální orientaci a katalytickou aktivitu. Nejvyšší exprese 11 $\beta$ -HSD1 byla detekována v klíčových metabolických tkáních, tzn. v játrech a tukové tkáni, ale významné hladiny se vyskytují také v mozku, plicích, centrálním nervovém systému nebo v kosterním svalstvu. V neporušených buňkách se 11 $\beta$ -HSD1 chová jako NADPH-dependentní reduktasa (reaktivuje kortison na aktivní kortisol). Membrána ER ale není prostupná pro NADPH. Po mnoha studiích byla odhalena přímá fyzická interakce mezi 11 $\beta$ -HSD1 a hexosa-6-fosfátdehydrogenasou (H6PD). H6PD je mikrosomální enzym, který katalyzuje první dva kroky pentosového cyklu a tím pádem i tvorbu NADPH. Zajišťuje 11 $\beta$ -HSD1 přímou dodávku NADPH pro efektivní redukci substrátu. Na rozdíl od 11 $\beta$ -HSD2 je 11 $\beta$ -HSD1 enzym, který se významně podílí na biotransformaci xenobiotik. Jedná se doposud o jediný dobře prozkoumaný mikrosomální enzym redukující karbonylovou skupinu, který je zahrnutý do procesu detoxifikace mnoha xenobiotik a jiných toxických sloučenin. 11 $\beta$ -HSD1 metabolizuje například metyrapon, 4-nitrobenzaldehyd, 4-nitroacetofenon, prednisolon, triadimefon, benfluron, oracin. Navíc hraje významnou roli v detoxikaci NNK. Bylo zjištěno, že NNK způsobuje rakovinu plic u křečků a nádor slinivky břišní u krysy. Je pravděpodobné, že by NNK mohl způsobovat tyto nádory i u lidí. Mutace v genu pro 11 $\beta$ -HSD1 nebo v genu pro H6PD způsobuje onemocnění označované jako kortison reduktasový deficit (CRD). U žen se toto onemocnění projevuje syndromem polycystických ovarií, hirsutismem a neplodností, která je způsobena velmi nízkou hladinou kortisolu (Škarydová & Wsól, 2011).

### **11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 2 (11 $\beta$ -HSD2, SDR9C3)**

11 $\beta$ -HSD2 je NAD<sup>+</sup>-dependentní dehydrogenasa, která se u člověka podílí na přeměně aktivního kortisolu na neaktivní kortison. Tato reakce chrání mineralokortikoidní receptor před navázáním kortisolu při jeho vyšší koncentraci a umožňuje navázání aldosteronu. 11 $\beta$ -HSD2 je mikrosomální enzym zakotvený v membráně ER pomocí tří N-koncových domén a jeho katalytická doména směřuje do cytosolu. Nejvyšší exprese byla zaznamenána v cílových tkáních pro aldosteron, tzn. v ledvinách a v tračníku.



Vyskytuje se ale také v placentě nebo ve vaskulárních epitelových buňkách. Mutace v genu 11 $\beta$ -HSD2 je spojená s nemocí, která se nazývá syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů a projevuje se těžkou hypertenzí v dětství (Škarydová & Wsól, 2011).

### 2.3.5 Lidské dehydrogenasyreduktasy (DHRS)

Lidské DHRS tvoří velmi heterogenní skupinu 17ti enzymů, které se liší například buněčnou lokalizací a oxidoredukční aktivitou (Tabulka 2). U některých zástupců, např.: DHRS3, DHRS7, DHRS10 se již podařilo získat informace o membránové topologii a biologické aktivitě. Přesto však zůstává značná část těchto proteinů velmi málo charakterizována a jejich role v lidském organismu je tedy zatím nejasná.

**Tabulka 2** – Souhrn všech DHRS enzymů (Štambergová, 2013).

Enzym	Nomenklatura	Jiný název	Aktivita	Lokalizace
DHRS1	SDR19C1	-	-	membrána
DHRS2	SDR25C1	HEP27	redukce	cytosol, jádro
DHRS3	SDR16C1	retSDR1, RDH17	redukce	membrána
DHRS4	SDR25C2	-	redukce	peroxisomy
DHRS4L1	SDR25C3	-	-	-
DHRS4L2	SDR25C4	-	-	-
DHRS6	SDR15C1	BDH	oxidace	cytosol
DHRS7	SDR34C1	retSDR4	-	membrána
DHRS7B	SDR32C1	-	-	-
DHRS7C	SDR32C2	-	-	-
DHRS8	SDR16C2	retSDR2, PAN 1B	oxidace	mikrosomy
DHRS9	SDR9C4	RDHL, retSDR8	oxidace	mikrosomy
DHRS10	SDR47C1	retSDR3, 17 $\beta$ -HSD14	oxidace	mikrosomy
DHRS11	SDR24C1	-	-	-
DHRS12	SDR40C1	-	-	membrána
DHRS13	SDR7C5	-	-	-
DHRSX	SDR46C1	-	-	membrána

### **Lidská dehydrogenasa/reduktasa rodiny SDR člen 2 (DHRS2, SDR25C1)**

Lidská DHRS2 je NADPH-dependentní reduktasa, která se podílí na metabolismu některých dikarboxylových sloučenin, jako jsou hexan-3,4-dion, 2,3-heptadion nebo 1-fenyl-1,2-propandion. Tento enzym byl lokalizován v jádře, cytoplasmě a v mitochondriích. Vzhledem k výskytu vyšších koncentrací DHRS2 u rakovinových buněk se využívá jako prognostický marker u rakoviny prostaty, močového měchýře a prsu. Hraje také důležitou roli v buněčném cyklu a v procesu apoptózy (Gabrielli & Tofanelli, 2012).

### **Lidská dehydrogenasa/reduktasa rodiny SDR člen 3 (DHRS3, SDR16C1)**

Lidská DHRS3 je mikrosomální NADPH-dependentní reduktasa. Jedná se o integrální protein s orientací C-konce polypeptidového řetězce do cytosolu. Poprvé byla DHRS3 detekována v kuželovitých fotoreceptorech vnějšího segmentu sítnice. V těchto čípcích katalyzuje redukci *all-trans*-retinalu, což je opačná reakce tvorby retinové kyseliny. V minulých letech byla exprese lidské DHRS3 potvrzena také v játrech, ledvinách, štítné žláze, varlatech a nižší hladiny také v tenkém střevě. Při nedávné studii byla potvrzena redukční aktivita DHRS3 vůči 4-androsten-3,17-dionu, estronu, glyceraldehydu, NNK a acetoexamidu (Lundová et al., 2014).

### **Lidská dehydrogenasa/reduktasa rodiny SDR člen 4 (DHRS4, SDR25C2)**

DHRS4 je peroxisomální NADPH-dependentní reduktasa, která se podílí na metabolismu rozsáhlé skupiny heterogenních substrátů, jako jsou dikarboxylové sloučeniny, aldehydy, aromatické ketony a 3-ketosteroidy. Při zkoumání katalytické aktivity lidské DHRS4 u 3-ketosteroidů a *all-trans*-retinalu byla zjištěna vyšší aktivita vůči 3-ketosteroidům. Naopak u prasečího orthologa byla vyšší aktivita zaznamenána pro *all-trans*-retinal (Gabrielli & Tofanelli, 2012).

### **Lidská dehydrogenasa/reduktasa rodiny SDR člen 7 (DHRS7, SDR34C1)**

Lidská DHRS7 je integrální membránový protein orientovaný do lumen ER, který patří do klastru 3 a vykazuje blízkou fylogenetickou podobnost s 11 $\beta$ HSD1 (reduktasa). DHRS7 je NADPH-dependentní reduktasa, která zasahuje do metabolismu mnoha rozličných substrátů, jako jsou *all-trans*-retinal, 4-androsten-3,17-dion nebo kortison. Vykazuje dvojí substrátovou specifitu, což znamená, že jako substráty rozpoznává nejen steroidy,

ale i retinoidy. Ve větší míře byla exprese tohoto enzymu zaznamenána v prostatě, štítné žláze, ledvinách a v zadním segmentu oka. Zvýšená exprese byla detekována i při některých patofyziologických stavech. Tyto vyšší hladiny byly zaznamenány ve svalech pacientů s onemocněním diabetes mellitus typu 2. Naopak snížená hladina byla pozorována u krys s indukovanou dyslipidemií. Různě pozměněná exprese DHRS7 se pak vyskytuje například u rakoviny prostaty a plic. (Štambergová et al., 2016).

#### **Lidská dehydrogenasa/reduktasa rodiny SDR člen 10 (DHRS10, SDR47C1, 17 $\beta$ -HSD14)**

Lidská DHRS10 známá také jako 17 $\beta$ -HSD14 je cytosolický enzym. Podobně jako ostatní 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy moduluje biologickou účinnost estrogenů a androgenů pomocí konverze (oxidace/redukce) na uhlíku C17 steroidního skeletu. Katalyzuje NAD<sup>+</sup>-dependentní oxidaci estradiolu na estron a 3 $\alpha$ -androstendiolu na dehydroepiandrosteron (DHEA). DHRS10 je nejvíce exprimována v mozku, játrech a v placentě. Předpokládaná úloha DHRS10 v lidském organismu je tedy inaktivace steroidů v centrální nervové soustavě a v placentě (Lukacik et al., 2007).

#### **Lidská dehydrogenasa/reduktasa rodiny SDR člen 1 (DHRS1, SDR19C1)**

Lidská DHRS1 byla objevena během sekvenční analýzy cDNA mozku lidského plodu. cDNA lidské DHRS1 je tvořena 1411 páry bází a kóduje polypeptidový řetězec, který je tvořen 314 aminokyselinami. Gen pro lidskou DHRS1 byl lokalizován na chromosomu 14q21.3. Pomocí metody hybridizace RNA byly objeveny 2 transkripční formy DHRS1. Delší forma je tvořena 1,4 kb a je nejvíce exprimována v játrech, méně pak v srdeční tkáni, ledvinách, slinivce břišní a placentě. Krátká forma obsahuje 0,9 kb a nejvyšší hladiny exprese byly zaznamenány v srdeční tkáni, méně je exprimována v játrech, kosterním svalstvu, ledvinách a slinivce břišní. Sekvence aminokyselin DHRS1 proteinu vykazuje 76% podobnost s předpokládaným myším orthologem a obsahuje typickou SDR doménu. Nízká sekvenční podobnost s lidskou DHRS1 byla prokázána u některých proteinů, například: 17 $\beta$ -HSD (21%), glukosadehydrogenasa ze spór *Bacillus megaterium* (17%), alkoholdehydrogenasa z *Drosophila melanogaster* (14%), lidská 11 $\beta$ -HSD1 (15%) a myší retinoldehydrogenasa/reduktasa 1 (16%) (Wu et al., 2001).

Z hlediska patofyziologických procesů je lidská DHRS1 pravděpodobně zapojena do karcinogeneze nádorů, které vznikají na základě mutace v genu pro isocitrátdehydrogenasu 1 (IDH1). Bylo dokázáno, že při mutaci genu pro IDH1 dochází ke snížené expresi DHRS1 v buňkách melanomu (Shibata et al., 2011).

Při zkoumání vlivu různých genetických faktorů na utváření geometrie krčku stehenní kosti a tím i pevnosti celé kosti se ukázalo, že jeden z faktorů byl ovlivňován degradační cestou 1- a 2-methylnaftalenu. Tato degradační cesta je tvořena 25 geny, mezi které patří i DHRS1 (Chen et al., 2010).

### 3. CÍL PRÁCE

Experimentální práce byla zaměřena na přípravu rekombinantní formy lidské DHRS1 z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) v eukaryotickém expresním systému *Sf9* a stanovení jejích základních biochemických vlastností (membránové topologie a testování katalytické aktivity vůči vybraným sloučeninám s karbonylovou skupinou).

Cíle práce lze rozdělit:

1. Příprava rekombinantní formy lidské DHRS1
  - Princip klonování nezávislého na ligase a metoda bakulovirového expresního vektorového systému (BEVS)
2. Příprava mikrosomální frakce *Sf9* s overexprimovanou DHRS1
3. Určení topologie lidské DHRS1
  - Metody alkalické extrakce, extrakce detergentem a inkubace s proteinasou K
4. Stanovení enzymové aktivity lidské rekombinantní DHRS1 u vybraných substrátů (xenobiotických i eobiotických) s karbonylovou funkční skupinou
  - Metoda spektrofotometrického screeningu ligandů při vlnové délce 340nm

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 *Materiál a pomůcky*

#### 4.1.1 **Přístrojové vybavení**

Centrifuga Heraeus BiofugeStratos (Thermo Electro Corporation, USA)

Centrifuga Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi (Thermo Electron Corporation, USA)

Gel Doc XR (Bio-Rad, USA)

Hlubokochladicí box New Brunswick™ Innova® Freezer (Eppendorf, Německo)

Homogenizátor dle Pottera a Elvehjema (B. Braun Biotech, USA)

Laminární box Faster Two 30 (Faster, Itálie)

Minicentrifuga Eppendorf MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)

Mini-Protean elektroforéza (Bio-Rad, USA)

MJ Mini Thermo Cycler (Bio-Rad, USA)

NanoDrop 1000 spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific, USA)

Spektrofotometr Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)

Thermomix komfort (Eppendorf, Německo)

Trans Blott Turbo (Bio-Rad, USA)

Třepačka s inkubací Ecotron (Infors HT, Švýcarsko)

Třepačka s inkubací NB 205 (n-Biotek, Korea)

Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Německo)

### 4.1.2 Chemikálie

3-glyceraldehyd (BDH laboratories)

4-benzoylpyridin (Alfa Aesar, Německo)

4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid hydrochlorid, AEBSF (Sigma-Aldrich, Německo)

BSA (100x) (New England, Biolabs)

BluoGal (Sigma-Aldrich, Německo)

dNTP (Promega, USA)

Ethanol 96% (Penta, Česká republika)

Glukosa monohydrát (Penta, Česká republika)

Glycerol 85% (RNDr. Jan Kulich, Česká republika)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Německo)

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPGT)

Médium Insect-X-PRESS protein free s L-glutaminem (Lonza, Švýcarsko)

Methanol (Penta, Česká republika)

NNK (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Protease inhibitor cocktail PIC (1:1000) (Calbiochem, Merck, USA)

Antibiotika

- Ampicilin, gentamicin, kanamycin, tetracyklin (Sigma-Aldrich, Německo)

Substráty s karbonylovou skupinou

- 1,2-naftochinon, 4-nitrobenzaldehyd, 4-nitroacetofenon, 4-androsten-3,17-dion, 9,10-fenantrenchinon, acetoexamid, p-benzochinon, benzil, dihydrotestosteron, estron, hexan-3,4-dion, kys. fenofibrinová, kys. flufenamová, isatin, ketotifen, kortizon, menadion, metyrapon, prednison, progesteron (Sigma-Aldrich, Německo), Prostaglandin E1 (Santa-Cruz Biotechnology, USA), Prostaglandin E2 (Santa-Cruz Biotechnology, USA)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, Německo)

### Roztoky:

Alkalický roztok:	0,1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 11,5, 25mM CH <sub>3</sub> COOK
Roztok s detergentem:	1% Triton X-100 v 0,1M Na-fosfátovém pufru pH 7,4
Roztok na ředění PK:	20mM Tris, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 50% glycerol
Roztok PMSF:	50mM PMSF, isopropanol (IPA) 8,7 mg/ml

### **4.1.3 Enzymy**

BfuAI restriční enzym (New England Biolabs, USA)

DpnI (New England Biolabs, USA)

Platinum Pfx DNA polymerasa (Invitrogen, USA)

T4 DNA polymeráza (Fermentas, Litva)

### **4.1.4 Buňky a plasmidy**

cDNA DHRS1 ve vektoru pCMV-SPORT6 (SGC, Velká Británie)

pFB-CT10HF-LIC (SGC, Velká Británie)

*E. coli* - HB101 kompetentní buňky (Invitrogen, USA)

*E. coli* - DH10Bac buňky (Invitrogen, USA)

Sf9 hmyzí buněčná linie (Invitrogen, USA)

### **4.1.5 Kity**

Nucleo Spin Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel, Německo)

Nucleo Spin Plasmid (Macherey-Nagel, Německo)

Nucleospin Kit (Macherey-Nagel, Německo)

Nanofectin Kit (PAA, Rakousko)

BCA Kit (Sigma-Aldrich, USA)



#### 4.1.6 Protilátky

F7425	Králičí polyklonální protilátka proti FLAG-tagu (Sigma-Aldrich, Německo)
P0217	Prasečí polyklonální protilátka proti králičím protilátkám (Dako, Dánsko)
P0260	Králičí polyklonální protilátka proti myším protilátkám (Dako, Dánsko)
Ab70036	Specifická myší polyklonální protilátka proti DHRS1 (Abcam, Velká Británie)

#### 4.1.7 Pufry a růstová média

LB médium

- 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 10mM NaCl

LB médium s agarem

- 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 10mM NaCl, 2% garu,

SOB médium

- 2% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 8,56mM NaCl, 2,5mM KCl, 2M MgCl<sub>2</sub>

SOC médium

- SOB médium, 20mM glukosa

TBE pufr

- 90mM Tris, 90mM kyselina boritá, 2mM EDTA

TE pufr

- 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0

0,8% agarózový gel

- 0,32g agarózy, 40ml TBE pufr

1% agarosový gel

- 0,4g agarózy, 40ml TBE pufr

Půda pro namnožení DH10Bac buněk

- LB médium, 2% agar, TET 10 mg/ml (ředění 1:1000), KAN 50 mg/ml (1:1000), GEN 15 mg/ml (1:1000), IPTG, BluoGal

Lyzační pufr

- 0,1M draselno-fosfátový pufr pH 7,5; 250mM sacharóza; 50mM KCl; 1,1mM EDTA; 0,5mM DTT; 0,5mM PMSF; 0,5mM AEBSF; 1:1000 koktejl inhibitorů proteas

Uchovávací pufr:

- 0,1M draselno-fosfátový pufr pH 7,5; 50mM KCl; 1,1M EDTA pH 8,0; 0,5mM PMSF; 0,5mM AEBSF; 20% glycerol

Vzorkový pufr (5x)

- 250mM Tris-HCl pH 6,8; 0,5M Tris-HCl pH6,8; 30% glycerol; 10% SDS; 0,02% bromfenolová modř; 5% 2-merkapt ethanol

Elektrodový pufr (5x)

- 250mM Tris-HCl pH 8,3; 200mM glycin; 0,1% SDS

Blotovací pufr

- 25mM Tris; 192mM glycin; 20% methanol

TBS pufr (10x)

- 24g Tris; 88g NaCl; dd H<sub>2</sub>O (do 1000 ml); pH 7,6

1x TBS-T pufr

- 100 ml 10x zásobní TBS pufr; dd H<sub>2</sub>O (do 1000 ml), 1 ml Tween 20

Blokovací pufr

- 5g blokovacího mléka; 100 ml TBS-T

#### **4.1.8 Molekulové markery**

O´GeneRuler DNA ladder Mix (New England Biolabs, USA)

Precision Plus all blue standards 161-3073 (Bio-Rad, USA)

## **4.2 Příprava rekombinantní formy lidské DHRS1**

### **4.2.1 Amplifikace pFB-CT10HF-LIC vektoru**

Jako amplifikační transferový vektor byl použit plasmid pFB-CT10HF-LIC, který nese gen pro rezistenci na ampicilin. Prázdný plasmid pFB-CT10HF-LIC byl transformován do bakterií *E. coli* HB101. Ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk HB101 byly přidány 2  $\mu$ l prázdného plasmidu pFB-CT10HF-LIC. Následovala 30 min inkubace na ledu. Poté byla provedena transformace chemicky kompetentních buněk *E. coli* HB101 metodou „heat-shock“. Následovala 5min inkubace na ledu, po které bylo přidáno 400  $\mu$ l LB media s obsahem ampicilinu (AMP, 1:1000, o koncentraci 50 mg/ml) vytemperovaného na 37°C a proběhla inkubace na třepačce po dobu 60 min při 37°C, 110 rpm. Po inkubaci byl celý obsah přenesen do kultivační Erlenmayerovy baňky, která obsahovala 20 ml LB media (37°C) a ampicilin (1:1000). Tato směs se inkubovala přes noc při 37°C a 180 rpm. Druhý den byla kultura přenesena do centrifugační zkumavky a stočena 15 min při 4°C a 6000x g.

Purifikace plasmidu byla provedena pomocí komerčního kitu (Nucleo Spin Plasmid Kit, Macherey-Nagel), dle protokolu výrobce. Výsledná peleta byla rozpuštěna v 50  $\mu$ l AE pufu.

Výsledek purifikace byl ověřen gelovou elektroforézou (0,8% agarosa v TBE pufu) a koncentrace DNA byla spektrofotometricky změřena (NanoDrop 1000).

### **4.2.2 Linearizace vektoru pFB-CT10HF-LIC**

Pro linearizaci plasmidu byla použita restriční endonukleasa BfuAI. Reakční podmínky linearizace jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3). Linearizace probíhala 3 hod při 50°C, inaktivace enzymu pomocí tepla byla provedena při 65°C, 20 min.

**Tabulka 3** - Reakční podmínky pro linearizaci vektoru pFB-CT10HF-LIC.

Složení reakční směsi	Objem v 1 reakci (μl)
10x NEBuffer 3	10
100x BSA	1
BfuAI	3
p-FB-CT10HF-LIC	6,4
dd H <sub>2</sub> O	79,6

### 4.2.3 Amplifikace DHRS1 insertu

Cílový insert DHRS1 vložený do plasmidu pCMV-SPORT6 nesoucím gen pro rezistenci na ampicilin byl transformován do chemicky kompetentních buněk *E. coli* HB101. Transformace proběhla opět metodou tepelného šoku a následná preinkubace v LB médiu trvala 60 min, 37°C, 110 rpm. Pro vytvoření selekčního tlaku byla kultura následně přenesena do LB média s AMP (1:1000). Po noční inkubaci (37°C, 180 rpm) byl plasmid purifikován pomocí komerčně dostupného kitu (Nucleo Spin Plasmid Kit, Macherey-Nagel), dle protokolu výrobce.

Pro amplifikaci požadované sekvence DNA DHRS1 byla použita metoda polymerasové řetězové reakce („touch-down“ PCR). Jako primery byly využity specifické primery pro DHRS1 (sekvence viz Tabulka 4). Průběh „touch-down“ PCR reakce s využitím Q5 DNA polymerasy je popsán v tabulce (Tabulka 5). Reakční podmínky amplifikace DHRS1 insertu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 6).

**Tabulka 4** - Sekvence specifických primerů pro DHRS1.

Primer	Sekvence (5'→3')
Fwd primer	TTAAGAAGGAGATATACTATGGCAGCTCCCATG
Rev primer	GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCGAACTTGCTAGTGTA

**Tabulka 5** - Průběh „touch-down“ PCR s využitím Q5 polymerasy.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakování
Úvodní denaturace	98	30	1
Denaturace	98	8	5
Annealing	68	30	
Elongace	72	30	
Denaturace	98	10	5
Annealing	60	30	
Elongace	72	30	
Denaturace	98	10	5
Annealing	55	30	
Elongace	72	30	
Denaturace	98	30	25
Annealing	50	30	
Elongace	72	30	
Konečná elongace	72	120	1

**Tabulka 6** - Reakční podmínky pro amplifikaci DHRS1 insertu.

Složení reakční směsi	Objem v jedné reakci (μl)
5x Q5 reakční pufr NEB	5,00
10mM dNTP	0,50
5x Q5 High GC Enhancer	5,00
Q5 Hot Start HF DNA polymerasa	0,25
Forward primer (Fwd)	1,00
Reverse primer (Rev)	0,31
Templát DNA	5,00
dd H <sub>2</sub> O	7,25

Výsledky amplifikace byly ověřeny gelovou elektroforézou (0,8% agarosa v TBE pufru).

PCR produkty byly následně ošetřeny DpnI restriční endonukleasou, která štěpí vstupní plasmid nesoucí gen pro rezistenci na ampicilin. Bylo použito 19  $\mu$ l NEB2 pufru a 1  $\mu$ l DpnI, ke každému PCR produktu byl následně použit 1  $\mu$ l této směsi a proběhla inkubace 1 hod při 37°C, poté inaktivace 20 min při 80°C. Po ošetření pomocí DpnI zůstanou v PCR směsi pouze požadované fragmenty DNA a eliminuje se falešná pozitivita vzorků.

#### 4.2.4 Klonování nezávislé na ligase (LIC)

Klonování nezávislé na ligase (Ligation Independent Cloning, LIC) představuje metodu, která nevyžaduje použití restričních enzymů ani DNA ligasy. Pro vytvoření kohezivních konců jak u vektoru, tak i klonovaného DNA fragmentu je využita (3'→5') exonukleasová aktivita T4 DNA polymerasy v přítomnosti pouze 1 nukleotidu (v tomto případě GTP nebo CTP). Tyto tzv. „lepivé“ konce nejsou komplementární, čímž se redukuje cirkularizace molekul vektoru. Reakční podmínky ošetření vektoru a insertu T4 DNA polymerasou jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 7 a Tabulka 8).

Pro vytvoření tzv. kohezivních konců byly vektor a insert rychle stočeny a inkubovány 30min při 22°C, inaktivace probíhala 20min při 75°C v Minicycleru.

**Tabulka 7** - Reakční podmínky pro ošetření vektoru pFB-CT10HF-LIC T4 DNA polymerasou.

Složení reakční směsi	Objem ( $\mu$ l)
DNA insert	10,0
10x NEBuffer 2	2,0
10x BSA	2,0
25mM dCTP	2,0
100mM DTT	1,0
T4 DNA polymeráza	1,0
dd H <sub>2</sub> O	1,8

**Tabulka 8** - Reakční podmínky pro ošetření insertu DHRS1 T4 DNA polymerasou.

Složení reakční směsi	Objem (μl)
DNA insert (DHRS1-PCR2)	5,0
10x NEBuffer2	1,0
10x BSA	1,0
25mM dGTP	1,0
100mM DTT	0,5
T4 DNA polymerasa	0,5
Dd H <sub>2</sub> O	1,9

Pro ligaci byly ošetřené inserty (2 μl) a linearizovaný vektor pFB-CT10HF-LIC (1 μl) smíchány a inkubovány 15 min při 22°C. Následně proběhla transformace do 5 μl kompetentních HB101 buněk metodou „heat-shock“. Preinkubace probíhala 60 min v SOC médiu při 37°C a poté byly kultury (50 μl, 100 μl) naočkovány na Petriho misky, které obsahovaly 25 ml LB média s 2% agarem, AMP (1:1000) a 5% sacharosu. Po noční inkubaci při 37°C byly kolonie, které vyrostly v selekčním prostředí přeočkovány do tekutého živného média (LB médium s AMP a 5% sacharosu) a inkubovány 16 hod při 37°C, 220 rpm. Následovala purifikace rekombinantního plasmidu.

#### 4.2.5 Ověření ligačního kroku pomocí specifických primerů

Přítomnost cílové sekvence DHRS1 v klonovacím vektoru byla ověřena využitím specifických primerů (Tabulka 9) a „touch-down“ PCR (průběh reakce viz Tabulka 5). Reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 10). Poté proběhla vizualizace na 1,0% agarosovém gelu. Z každé zkumavky noční kultury bylo odebráno 20 μl a stočeno 10 min při 1000 rpm. Po odstranění supernatantu (LB medium) byla peleta resuspendována v 50 μl TE pufru, pH 8,0 a rozbita pomocí varu 3 min při 95°C.

**Tabulka 9** - Sekvenční primery pro ověření cílových fragmentů DNA.

Primer	Sekvence (5'→3')
Fwd primer	TTAAATGATAACCATCTCG
Rev primer	GGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAA

**Tabulka 10** - Složení reakční směsi pro ověření cílových fragmentů DNA pomocí PCR.

Složení reakční směsi	Objem v 1 reakci (μl)
5x Q5 reakční pufr	5,00
10mM dNTP	0,50
5x Q5 High GC enhancer	5,00
Q5 Hot Start HF DNA polymerasa	0,25
10μM Fwd primer	1,00
10μM Rev primer	1,00
DNA templát	3,00
dd H <sub>2</sub> O	9,25

#### 4.2.6 Příprava rekombinantních bakmidů

Bakulovirový expresní systém (BEVS), který představuje velmi rychlou a účinnou metodu pro tvorbu rekombinantních bakulovirů.

Pro přípravu rekombinantních bakmidů s DHRS1 byly využity buňky *E. coli*, kmen DH10Bac. Na transformaci a následnou transpozici za vzniku rekombinantního bakmidu bylo použito 100 μl kompetentních DH10Bac buněk, ke kterým byl přidán 1 μl purifikovaného plasmidu pFB-CT10HF-LIC se sekvencí pro DHRS1, následovala inkubace 30 min na ledu a transformace pomocí metody „heat-shock“. Po přidání 400 μl SOC média trvala inkubace 4 h při 37°C, 220 rpm. Alikvoty o objemu 50 μl byly nanесeny na Petriho misky s růstovým médiem (LB médium, 2% agar, 10 μg/ml tetracyklinu, 50 μg/ml kanamycinu, 7 μg/ml gentamicinu, 40 μg/ml IPTG, 100 μg/ml BluoGal) a proběhla inkubace 48 hod, 37°C. Pro potvrzení selekčního růstu tzv. modro-bílé selekce byly bílé kolonie přeočkovány na Petriho misky s čerstvým růstovým médiem (LB médium, 2% agar, 10 μg/ml tetracyklinu, 50 μg/ml kanamycinu, 7 μg/ml gentamicinu, 40 μg/ml IPTG, 100 μg/ml BluoGal) a inkubace 48 hod, 37°C byla provedena znovu. Pro namnožení DH10Bac buněk bylo připraveno tekuté živné médium (LB médium, kanamycin, gentamicin, tetracyklin), kde se pozitivní (bílé) kolonie inkubovaly 12 hod, 37°C, 275 rpm. Pro purifikaci bakmidů byly použity roztoky z komerčně dostupného kitu (Nucleo Spin Plasmid Kit, Macherey-Nagel). Odebraný objem (2 ml) z noční kultury byl stočen 1 min, 13400 rpm, supernatant byl odstraněn a vzniklá peleta byla resuspendována pomocí 300 μl resuspendačního pufru s RNasou A. Po přidání 300 μl lyzačního a neutralizačního



pufry proběhla inkubace 10 min na ledu a centrifugace 10 min při 13400 rpm. K supernatantu byl v poměru 1:1 přidán isopropanol, směs se jemně promíchala, inkubovala 10 min na ledu a centrifugovala 15 min, 13400 rpm. Po odstranění supernatantu byla vzniklá peleta 2x omyta pomocí 70% ethanolu, stočena 5 min, 13400 rpm a volně vysušena na vzduchu. Vysušená peleta byla rozpuštěna ve 40 µl TE pufry, pH 8,0. Pro stanovení koncentrace bakmidů bylo použito spektrofotometrické měření (NanoDrop 1000) a výsledek byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy.

#### **4.2.7 Příprava rekombinantního bakuloviru**

K transfekci byla použita adherentní hmyzí buněčná linie *Sf9* odvozena z ovariální tkáně *Spodoptera frugiperda*, která byla kultivována v hmyzím růstovém médiu Insect-X-PRESS (Lonza).

Pro přípravu rekombinantního bakuloviru byl použit Nanofectin Kit (PAA) a postupovalo se podle doporučení výrobce. K transfekci byl použit 1 µg DNA v 50 µl Diluentu a 3,2 µl Nanofectinu v 50 µl Diluentu. Po krátkém stočení bylo přidáno 50 µl roztoku Nanofectinu k 50 µl roztoku DNA, směs byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě. 100 µl této směsi bylo přeneseno do jamky (24-jamková destička) k 500 µl *Sf9* buněk ( $2 \times 10^5$  buněk/ml;  $1 \times 10^5$  buněk/jamka; inkubace 2 hod, 27°C při zvýšené vlhkosti), následovala statická inkubace 52 hod, 27°C. Pro izolaci P0 virálního roztoku byl v laminárním boxu odebrán objem 400 µl k centrifugaci (5 min, 13400 rpm, Eppendorf MiniSpin). Odebraný supernatant, který obsahoval rekombinantní virus P0, byl přefiltrován přes 0,22 µm filtr, uchováván při teplotě 4°C a chráněn před světlem.

#### **4.2.8 Expres rekombinantní formy lidské DHRS1 a příprava P1 a P2 virálních roztoků v hmyzích *Sf9* buňkách**

K expresi rekombinantního lidského proteinu DHRS1 a přípravu rekombinantních virů (P1 a P2) byla použita suspenzní hmyzí buněčná linie *Sf9*. Podmínkou úspěšného infikování *Sf9* buněk rekombinantním virem bylo dosažení minimálně 95% buněčné viability (poměr živých *Sf9* buněk vůči jejich celkovému počtu). Viabilita *Sf9* buněk byla ověřena obarvením buněk 0,4% trypanovou modří a jejich spočítáním v Neubauerově komůrce. Mikroskopicky byla hodnocena také morfologie *Sf9* buněk. K infikování bylo

použito 15  $\mu$ l P2 (viz 4.2.8.1) viru/ml Sf9 buněk o koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml a inkubace probíhala 70 hodin, 27°C, 120 rpm.

#### **4.2.8.1 Příprava rekombinantních virů**

Pro přípravu P1 virálního roztoku bylo použito 100  $\mu$ l P0, kterým byly infikovány 3 ml Sf9 buněk v 6-jamkové destičce o koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/jamka. Inkubace probíhala při 27°C, staticky, 65 hod. Po inkubaci byla buněčná kultura infikovaná rekombinantním virem s DHRS1 za sterilních podmínek přenesena do centrifugačních zkumavek a stočena 10 min, 3000x g, 4°C (Heraeus). Zároveň byl z buněčné kultury odebrán kontrolní vzorek pro zjištění viability buněk. Po stočení byl odebrán supernatant obsahující vir, který byl přefiltrován (0,22  $\mu$ m) a skladován ve tmě při 4°C (P1 virální roztok). Při přípravě P2 virálního roztoku byl použit 1,5 ml virálního roztoku P1 na 100 ml Sf9 buněk o koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml a inkubace probíhala 70 hodin, 27°C, 120 rpm.

### **4.3 Příprava mikrosomální frakce z Sf9 buněk**

#### **4.3.1 Příprava mikrosomální frakce s rekombinantní DHRS1**

Buněčná kultura Sf9 infikovaná rekombinantním virem s DHRS1 byla stočena 10 min, 3000x g, 4°C (Heraeus). Vzniklá peleta byla resuspendována v ½ objemu původní buněčné kultury 0,1M draselno-fosfátového pufru pH 7,5 a následovala centrifugace 10 min, 3000x g, 4°C. Peleta byla lyzována pomocí lyzačního pufru v 1/50 původního objemu buněčné kultury a ke směsi byl přidán koktejl inhibitoru proteas (1:1000, Calcibiochem), vše se inkubovalo 15 min na ledě. Suspenze byla homogenizována sonikací (Bandelin Sonoplus HD2070) 27-30s, s 0,5 s pulzy, 70% výkonu. Lyzát byl následně centrifugován 20 min, 12 000x g, 4°C (Heraeus). Supernatant byl přenesen do centrifugačních zkumavek (Sorvall) a centrifugován 1 hod, 37 000 rpm, 4°C (Sorvall). Peleta byla homogenizována v 800-1200  $\mu$ l uchovávacího pufru. Homogenáty byly připraveny pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým dřikem a vzniklé alikvoty byly uchovány v hlubokochladícím boxu při -80°C.

### 4.3.2 Ověření rekombinantní DHRS1 v mikrosomální frakci

Ke zjištění, zda je v připravené mikrosomální frakci přítomna rekombinantní DHRS1 byla využita SDS-PAGE elektroforéza (viz 4.3.2.1), kdy byla připravená mikrosomální frakce s overexprimovanou DHRS1 (15  $\mu$ l) nanášena na SDS-PAGE gel a následně byla použita imunodetekční metoda - Western Blotting (viz 4.3.2.2). Pro imunodetekci byly jako primární protilátky použity: primární králičí protilátka proti FLAG-tagu 1:50 000 (F7425, Sigma-Aldrich) v 3% blokovacím mléce nebo primární specifická protilátka proti DHRS1 1:1 000 (Ab70036, Abcam) v 3% blokovacím mléce. Sekundární protilátky byly: prasečí polyklonální protilátka proti králičí 1:20 000 (P0217, Dako) v 3% blokovacím mléce v případě imunodetekce FLAG-tag nebo králičí polyklonální protilátka proti myši 1:20 000 v 3% BSA (P0260, Dako) v případně imunodetekce DHRS1.

#### 4.3.2.1 SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforéza je separační metoda, při které se vzorky dělí na základě velikosti a mobility zlinearizovaných proteinů. K analýze byl použit 0,75 mm gel v provedení Tris-glycin SDS (složení gelů viz Tabulka 11).

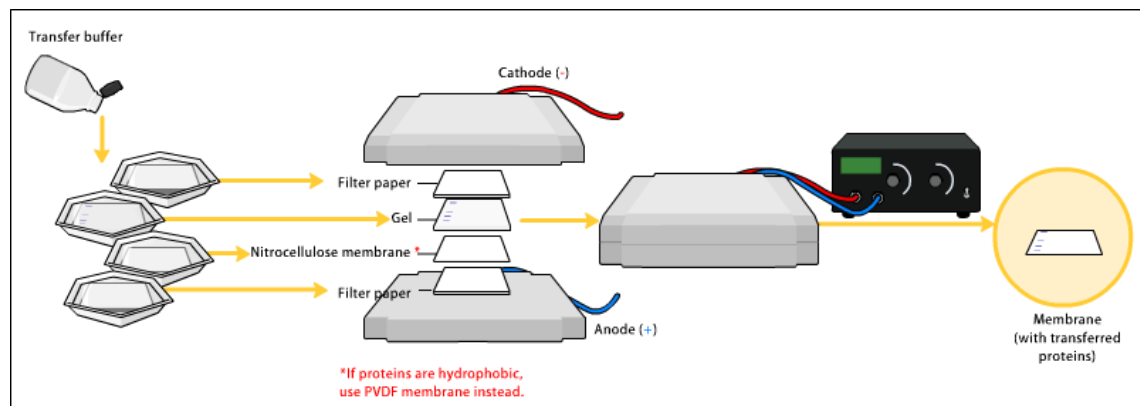
**Tabulka 11** - Složení gelů pro SDS-PAGE elektroforézu.

Zásobní roztok	Objem pro 0,75 mm separační gel (12,7%)	Objem pro 0,75 mm zaostřovací gel (4%)
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml	-
0,5M Tris-HCl pH 6,8	-	391 $\mu$ l
10% SDS	50 $\mu$ l	16 $\mu$ l
30% roztok akrylamidu	2,1 ml	203 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	1,6 ml	953 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l	32 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l	1,6 $\mu$ l

V poměru 1:4 byly vzorky mikrosomální frakce smíchány se vzorkovým pufrům (složení viz 4.1.7), doplněny 0,1M K-fosfátovým pufrům pH 7,4 na potřebný objem a denaturovány 4 min při 96°C. Složení elektrodového pufru je popsáno v bodě 4.1.7. Po nanášení vzorků na gel probíhalo zakoncentrování 20 min/100 V v zaostřovacím gelu a poté separace 75 min/150 V separačním gelu.

### 4.3.2.2 Western Blotting

Metoda Western Blottingu slouží k přenesení proteinu z gelu na blotovací membránu za využití elektrického pole. Pro vytvoření prostředí pro elektrické pole byly gel, filtrační papír i blotovací membrána ekvilibrovány 15 min v blotovacím pufru (složení viz bod 4.1.7). Po 15 min byl sestaven blotovací aparát. Uzavřením kazety je udržován těsný kontakt mezi membránou a gelem. V blotovacím přístroji pak negativně nabitě proteiny cestují ke kladně nabitě elektrodě, ale membrána je zastaví a naváže. Přenos probíhal 20 min při konstantním napětí 25 V. Pro kontrolu přenesení proteinů na membránu byl použit barvicí roztok 0,1% Ponceau S, který nespecificky interaguje se všemi proteiny. Poté byla membrána odbarvena 10% kyselinou octovou a opláchnuta v TBS-T pufru. Blokování membrány bylo provedeno pomocí blokovacího pufru s obsahem 5% netučného mléka (složení viz bod 4.1.7) na orbitální třepačce 90 min, 80 rpm při laboratorní teplotě. Proteiny z mléka se tak navázaly na místa, kam se dosud nenavázaly proteiny během blotování. Po přidání protilátky se díky tomu molekuly imunoglobulinů nemůžou nespecificky navázat na povrch membrány, ale vážou se specificky na přebloťovaný antigen.



**Obrázek 7** - Příprava na blotování a jeho průběh. V první fázi dochází k ekvilibraci filtračního papíru a blotovací membrány. Následně jsou filtrační papír, gel a blotovací membrána naskládány ve vrstvách a uzavřeny v blotovací kazetě. Blotování probíhalo 20 min při konstantním napětí 25 V (Internet 2).

Pro imunodetekci byla použita primární králičí protilátka proti FLAG-tagu 1:50 000 (F7425, Sigma-Aldrich) v 3% blokovacím mléce nebo protilátka proti DHRS1 1:1 000 (Ab70036, Abcam) v 3% blokovacím mléce. Primární protilátka se v obou případech inkubovala přes noc (16 hod) při teplotě 8°C, 80 rpm. Poté byla membrána omyta 3x

krátce a 3x 10 min TBS-T pufrem. Následně byla přidána sekundární protilátka, v případě imunodetekce FLAG-tag byla použita prasečí polyklonální protilátka proti králíčí 1:20 000 (P0217, Dako) v 3% blokovacím mléce nebo králíčí polyklonální protilátka proti myši 1:20 000 v 3% BSA (P0260, Dako) v případě imunodetekce DHRS1. V obou případech inkubace probíhala 90 min při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opět omyta 3x krátce a 3x 10 min TBS-T pufrem. K vizualizaci bylo použito detekční činidlo (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE HealthCare Life Sciences RPN 2232) s lumiolem, které v přítomnosti protilátek konjugovaných s křenovou peroxidasou oxiduje a generuje chemiluminiscenci, jenž se zaznamenává na fotografický papír (čas expozice byl 3-10 min).

### **4.3.3 Stanovení koncentrace proteinu**

Pro zjištění celkové koncentrace proteinu DHRS1 v mikrosomální frakci byla využita metoda stanovení proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA). Metoda byla prováděna pomocí dostupného kitu (BCA Kit, Sigma-Aldrich, postup dle protokolu výrobce). Jako standard pro vytvoření kalibrační řady byl použit bovinní sérový albumin (BSA) o koncentraci 200-2000 µg/ml. Podstatou metody je spektrofotometrické měření koncentrace při vlnové délce 592 nm na přístroji Tecan Infinite M200.

## **4.4 Stanovení topologie DHRS1**

Pro určení topologie byla využita metoda alkalické extrakce, extrakce detergentem a inkubace s proteinasou K.

### **4.4.1 Alkalická extrakce a extrakce detergentem**

Pomocí extrakce v alkalickém prostředí 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 25mM CH<sub>3</sub>COOK a extrakce v prostředí detergentu 1,2% Triton X-100 lze zjistit, zda se jedná o integrální nebo periferní membránové proteiny.

U alkalické extrakce bylo 20 µg Sf9 mikrosomů s overexprimovanou DHRS1 inkubováno s 200 µl alkalického roztoku (viz bod 4.1.2). U extrakce detergentem byl alkalický roztok nahrazen roztokem s 1,2% detergentem (100 µl) (viz bod 4.1.2). U obou vzorků následovala 30 min inkubace na ledu a centrifugace (Thermo Fisher) 60 min, 38 700 rpm,

4°C. Vzniklé pelety byly resuspendovány v sodno-fosfátovém pufru (12,5 µl). Po rozpuštění pelety bylo přidáno 5 µl (5x koncentrovaného) vzorkového pufru pro SDS-PAGE.

K supernatantům byla přidána 72% ledová kyselina trichloroctová (TCA) v poměru 1:1 a precepitace probíhala na ledu, 30 min. Následovala centrifugace 10 min, 12 000x g, po které byly pelety 2x omyty ledovým acetonem, aby došlo k odstranění zbytku TCA a detergentu. Po rychlém stočení byly pelety vysušeny a rozpuštěny ve vzorkovém pufru (1:4) pro SDS-PAGE. Výsledné vzorky byly dále analyzovány pomocí metody SDS-PAGE elektroforézy (4.3.2.1) a Western Blottingu (4.3.2.2). Pro imunodetekci byla použita primární králičí protilátka proti FLAG-tagu 1:50 000 (F7425, Sigma-Aldrich) a sekundární prasečí polyklonální protilátka proti králičí 1:20 000 (P0217, Dako).

#### **4.4.2 Inkubace s proteinasou K**

*Sf9* mikrosomy s overexprimovanou DHRS1 byly inkubovány s proteinasou K a to buď ve vodném prostředí, nebo v prostředí s detergentem. Vzorky mikrosomů *Sf9* byly zředěny na finální koncentraci 1 mg/ml a 3 mg/ml v 0,1M draselno-fosfátovém pufru pH 7,5. Ke vzorkům pro inkubaci byla přidána proteinasa K ve vodném prostředí nebo s 1,2% Triton X-100 (Tabulka 12). Ke kontrolním vzorkům byla přidána voda. Inkubace probíhala 1 hod při 37°C. Reakce byla ukončena přidáním roztoku PMSF (finální koncentrace 5mM). Výsledné vzorky byly dále analyzovány pomocí metody SDS-PAGE elektroforézy (4.3.2.1) a Western Blottingu (4.3.2.2). Pro imunodetekci byla použita primární králičí protilátka proti FLAG-tagu 1:50 000 (F7425, Sigma-Aldrich) a sekundární prasečí polyklonální protilátka proti králičí 1:20 000 (P0217, Dako).

**Tabulka 12** - Složení jednotlivých vzorků pro inkubaci s proteinasou K.

	<i>Sf9</i> mikrosomy s DHRS1	Proteináza K	Triton X-100 fin. konc. 1%	Voda
Vz. 1 (PK 1:10)	10 $\mu$ l 1 mg/ ml	0,5 mg/ml	-	1,2 $\mu$ l
Vz. 2 (PK 1:10)	10 $\mu$ l 1 mg/ ml	0,5 mg/ml	1,2 $\mu$ l 10 %	-
Vz. 3 (PK 1:10) kontrola	10 $\mu$ l 1 mg/ ml	-	-	3,2 $\mu$ l
Vz. 1 (PK 1:30)	10 $\mu$ l 3 mg/ml	0,5 mg/ml	-	1,2 $\mu$ l
Vz. 2 (PK 1:30)	10 $\mu$ l 3 mg/ml	0,5 mg/ml	1,2 $\mu$ l 10 %	-
VZ. 3 (PK 1:30) kontrola	10 $\mu$ l 3 mg/ml	-	-	3,2 $\mu$ l

#### **4.5 Stanovení specifické enzymové aktivity DHRS1**

Enzymová aktivita lidské DHRS1 byla testována pomocí spektrofotometrického stanovení založeného na měření poklesu absorbance NADPH při 340 nm. Ke screeningu byly vybrány různé eobiotické (Tabulka 13) i xenobiotické sloučeniny s karbonylovou funkční skupinou (Tabulka 14). Reakce byla startována přidávkem roztoku sloučeniny po 5min preinkubaci při 37°C mikrosomální frakce s overexprimovanou DHRS1 s 200 $\mu$ M NADPH. Finální reakční objem byl 100  $\mu$ l. Finální koncentrace substrátů byla 50-250 $\mu$ M, finální koncentrace kofaktoru pak 200  $\mu$ M. Jako kontrola byla použita netransfekovaná mikrosomální frakce *Sf9*.

**Tabulka 13** - Vybrané eobiotické ligandy pro testování katalytické aktivity DHRS1.

Substrát	Rozpouštědlo	Koncentrace zásobního roztoku (mM)	Finální koncentrace substrátu v reakci (μM)
4-androsten-3,17-dion	EtOH	2,5 1	250, 125 50
3-glyceradehyd	H <sub>2</sub> O	2,5 1	125 50
Dihydrotestosteron	MeOH	2,5	250, 125
Dihydroxyacetonfosfát	H <sub>2</sub> O	5 1	250 50
Estron	EtOH	2,5 1	250, 125 50
Glukosa monohydrát	H <sub>2</sub> O	2,5 1	125 50
Kortisol	EtOH	2,5 1	250, 125 50
Progesteron	EtOH	2,5 1	250, 125 50
Prostaglandin E1	H <sub>2</sub> O	2,5 1	125 50
Prostaglandin E2	H <sub>2</sub> O	2,5 1	125 50



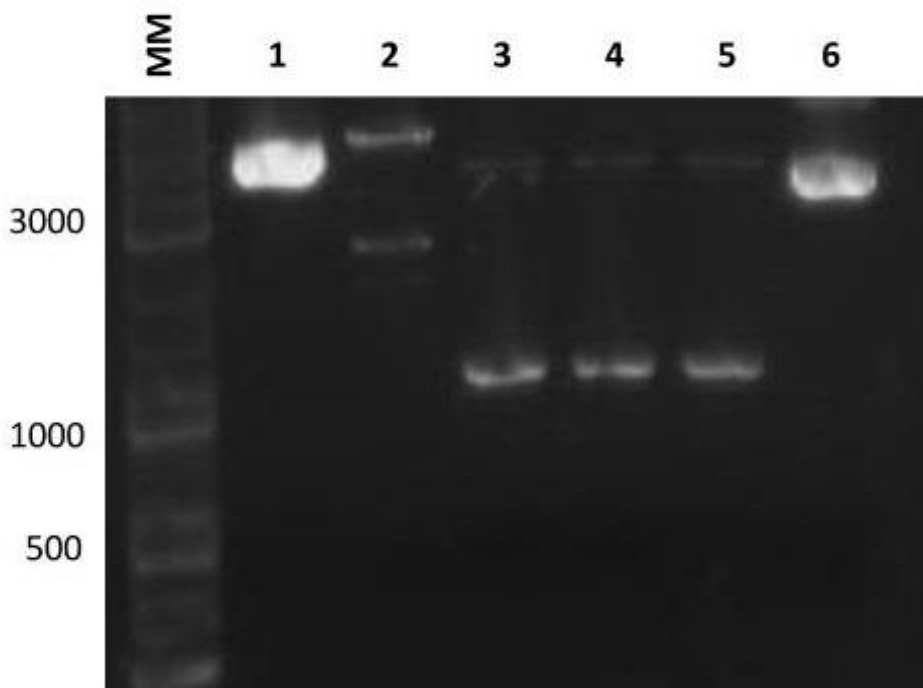
**Tabulka 14** - Vybrané xenobiotické ligandy pro testování katalytické aktivity DHRS1.

Substrát	Rozpouštědlo	Koncentrace zásobního roztoku (mM)	Finální koncentrace substrátu v reakci ( $\mu\text{M}$ )
1,2-naftochinon	EtOH	5 1	250 50
4-benzoylpyridin	H <sub>2</sub> O	5 1	250 50
4-nitroacetofenon	MeOH	5	250
4-nitrobenzaldehyd	DMSO	5	250
9,10-fenantrenchinon	DMSO	5	250
Acetohexamid	MeOH	5	250
Benzil, Difenylethandion	EtOH	5	250
Kys. fenofibrinová	MeOH	5	250
Kys. flufenamová	MeOH	5	250
Hexan-3,4-dion	MeOH	5	250
Isatin	EtOH	5 1	250 50
Ketotifen	MeOH	5 1	250 50
Menadion	DMSO	5	250
Metyrapon	MeOH	5	250
4-methylnitrosoamin-1-(3-pyridyl)-butan-1-on	H <sub>2</sub> O	5 1	250 50
p-benzochinon	H <sub>2</sub> O	5	250
Prednison	MeOH	2,5 1	250, 125 50

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Linearizace plasmidu pFB-CT10HF-LIC a klonování lidské DHRS1

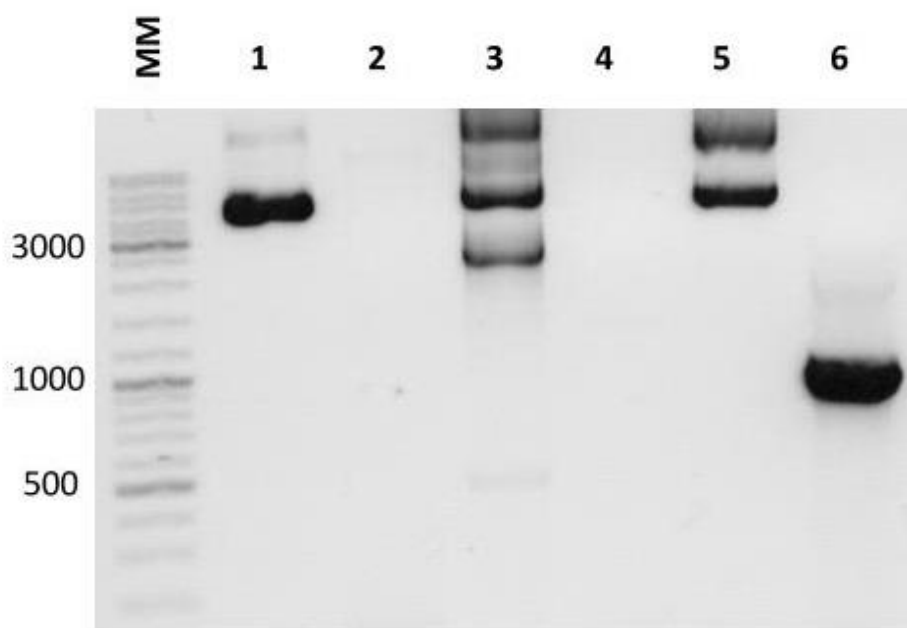
K přípravě DHRS1 klonů byla použita technika klonování „high-throughput“ nezávislé na ligase (LIC) a metody „touch-down“ PCR reakce. Výhodou metody klonování nezávislého na ligase je její univerzálnost a vysoká účinnost bez použití restričních enzymů. Vzhledem k 5'→3' polymerasové aktivitě T4 DNA polymerasy došlo k cirkularizaci vloženého fragmentu a vektoru bez použití DNA ligasy. Na obrázku je potvrzena linearizace vektoru pomocí restričního enzymu BfuAI za vzniku 2 fragmentů, jeden o velikosti ~4791 bp a druhý ~1930 bp. Specifické primery pro DHRS1 obsahovaly sekvence potřebné pro klonování nezávislé na ligase. Amplifikované DHRS1 mají velikost ~980 bp (Obrázek 8).



**Obrázek 8** - Výsledky linearizace vektoru a amplifikace DHRS1 insertu. MM=O'Gene Ruler ladder mix, 1-pFB-CT10HF-LIC, 2-naštěpený pFB-CT10HF-LIC, 3-amplifikovaná DHRS1(1), 4-amplifikovaná DHRS1(2), 5-amplifikovaná DHRS1(3), 6-původní plasmid s DHRS1.

## 5.2 Potvrzení ligačního kroku DHRS1 insertu

Úspěšnost ligace insertu do cílového vektoru pFB-CT10HF-LIC byla ověřena pomocí sekvenačních primerů (viz 4.2.5) metodou PCR reakce. Výsledky PCR reakce jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 9). Přestože nedošlo k navázání sekvenačních primerů (jamka 4), ligace byla potvrzena navázáním specifických primerů pro DHRS1 (jamka 6). Amplifikovaná DHRS1 s navázanými specifickými primery má předpokládanou velikost ~980 bp.



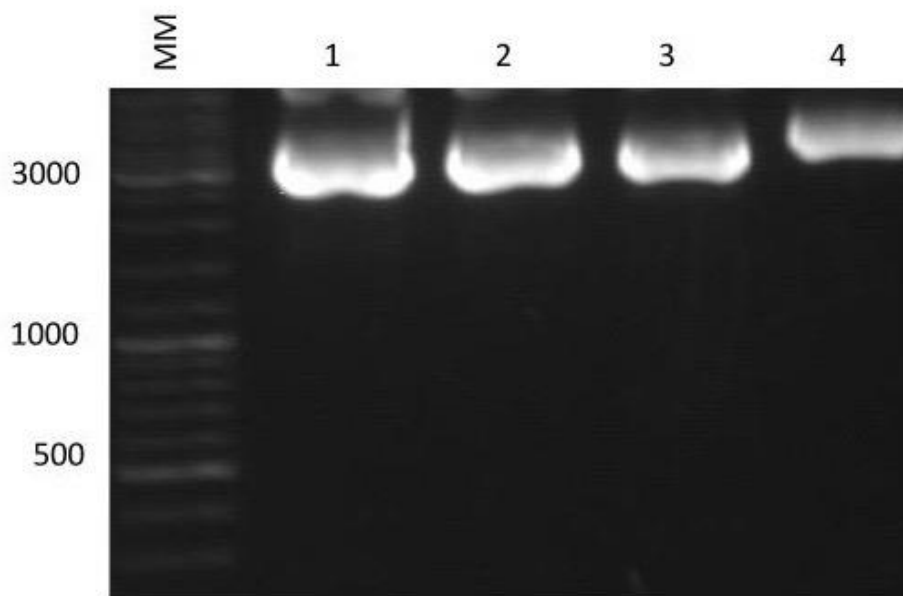
**Obrázek 9** - Výsledek ligačního kroku. MM = O'GeneRuler DNA ladder mix (1kb), 1- prázdný pFB-CT10HF-LIC, 2- produkt ligace pFB-DHRS1 (neamplifikovaný), pFB-DHRS1+sekvenační primery, 4-produkt ligace pFB-DHRS1 (neamplifikovaný), 5-prázdný pFB-CT10-HF-LIC+DHRS1 primery, 6-pFB-DHRS1+DHRS1 primery.

## 5.3 Příprava bakmidů

Výhodou hmyzích expresních systémů je vysoká exprese rekombinantních genů, většina proteinů se z infikovaných buněk získává poměrně snadno. Díky této metodě je umožněna také posttranslační modifikace proteinů a v neposlední řadě bakuloviry hmyzího expresního systému nejsou lidské ani rostlinné patogeny a neprodukují endotoxiny.

Bakulovirový přenašečový vektor (bMON14272) je přítomen v chemicky kompetentních DH10Bac a obsahuje mini-F replikon, resistenci na kanamycin a sekvenci DNA kódující

LacZ $\alpha$  peptid. Pro přípravu rekombinantního bakmidu byl použit plasmid pFB-CT10HF s vloženým DHRS1 insertem (pFB-DHRS1). Rekombinantní bakmid byl vytvořen transpozicí mezi mini-Tn7 elementem donorového plasmidu (pFB-CT10HF-LIC) a mini-attTn7 sekvencí bakmidu. Při transpozici je přítomen také pomocný plasmid (pMON7124; 13,2 kb), který uděluje buňkám resistenci na tetracyklin. Transpozice probíhala za podmínek modro-bílé selekce a v přítomnosti antibiotik. Z vyrostlých pozitivních (bílých) kolonií byly následně izolovány rekombinantní bakmidy. Pro ověření výsledku byla testována přítomnost SDR insertu pomocí PCR reakce a agarosové elektroforézy. Velikost bakmidu s DHRS1 je ~3280 bp (Obrázek 10).



**Obrázek 10** - Ověření rekombinantních bakmidů na přítomnost DHRS1 insertu. MM=O'GeneRuler DNA ladder mix (1kb), 1,2,3,4 = bakmid DHRS1.

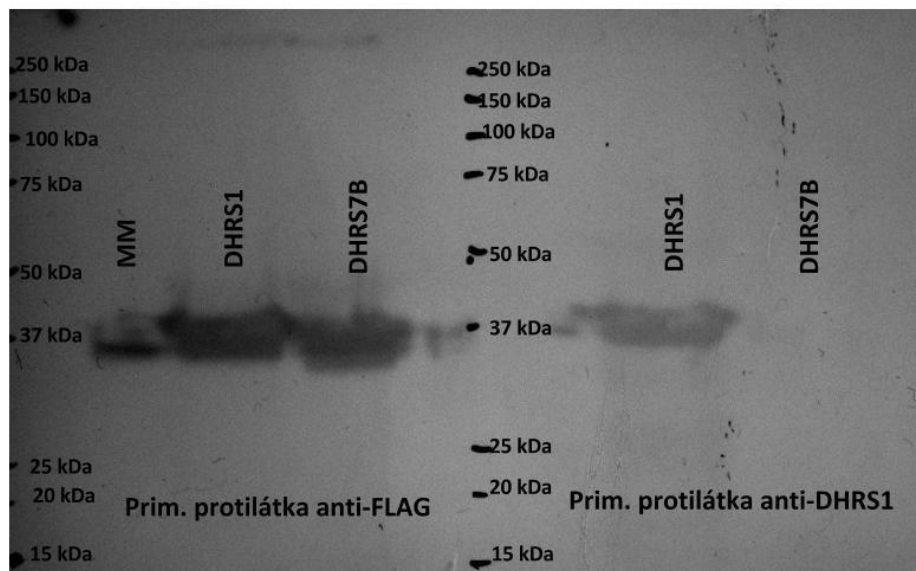
#### **5.4 Infikování hmyzí buněčné linie Sf9 buněk**

Pro kontrolu úspěšného infikování suspenzní hmyzí buněčné linie Sf9 bylo nutné porovnat morfologické změny mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami pod mikroskopem, přičemž infikované buňky obsahovaly velké jádro, které vyplňovalo téměř celou buňku a byly o cca 25-50 % větší než buňky neinfikované. Infikované buňky se přestávají množit, protože jejich metabolický aparát je využit především na produkci

rekombinantního viru a proteinu. Mikroskopicky byla v cytosolu patrná zrníčka a při pozdější fázi se projevila lýza buněk z důvodu uvolnění viru. V porovnání s neinfikovanou kulturou byl pozorován menší počet buněk, přičemž poměr živých a mrtvých buněk byl cca 1:1, respektive 1:2.

### **5.5 Expresse DHRS1 v mikrosomální frakci**

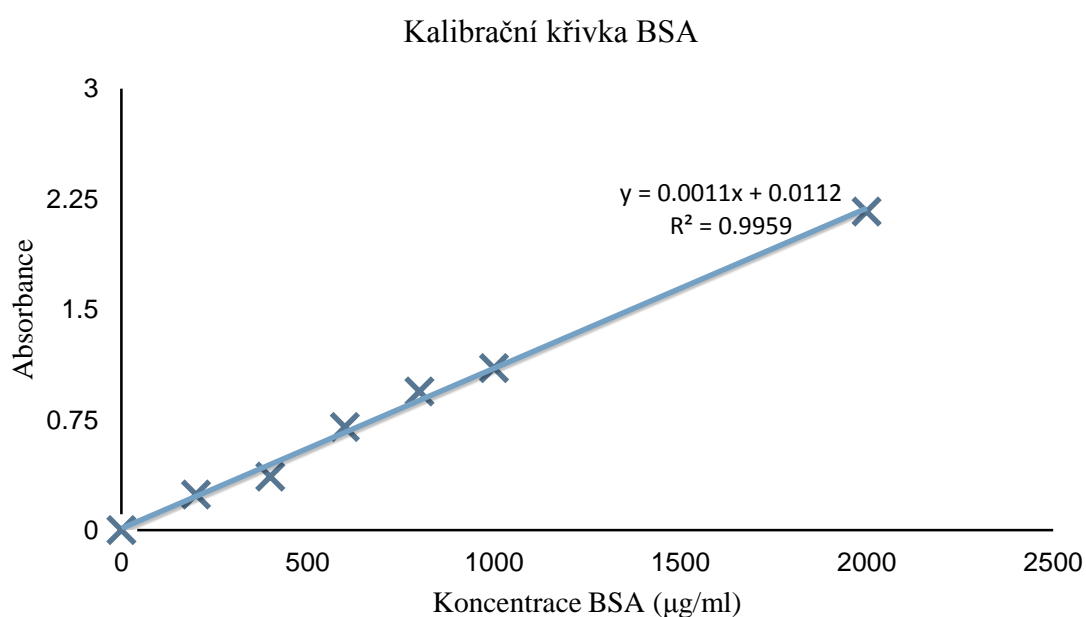
Přítomnost cílového proteinu byla ověřena dvojí kontrolou (Obrázek 11). Nejprve byla dokázána přítomnost overexprimované DHRS1 v mikrosomální frakci, která obsahovala uměle přidaný anti-FLAG pomocí primární králičí protilátky proti FLAG-tagu 1:50 000 (F7425, Sigma-Aldrich) a sekundární polyklonální prasečí protilátky proti králičí 1:20 000 (P0217, Dako). Následně byl cílový protein potvrzen pomocí specifické myší protilátky proti DHRS1 1:1 000 v 3% mléce (Ab70036) a sekundární protilátky králičí proti myší 1:20 000 (P0260, Dako) v 3% BSA. Při použití protilátky proti DHRS1 nedošlo k navázání proteinu DHRS7B, což potvrzuje specifitu důkazu pro DHRS1.



**Obrázek 11** – Ověření přítomnosti overexprimované DHRS1 v mikrosomální frakci.

## 5.6 Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v mikrosomální frakci s DHRS1

Pro určení koncentrace celkové bílkoviny v mikrosomální frakci s overexprimovanou DHRS1 byla použita metoda stanovení pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA) s využitím komerčně dostupného kitu (BCA Kit, Sigma-Aldrich, USA). Pro vytvoření kalibrační křivky (Obrázek 12) byl jako standard použit roztok hovězího bovinního albuminu (BSA) v koncentracích 20-2000 µg/ml.



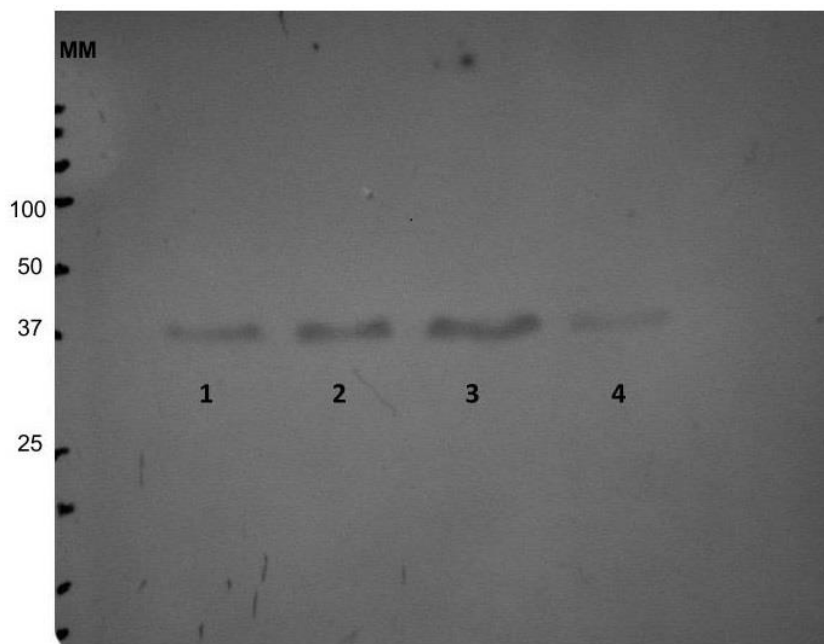
**Obrázek 12** - Kalibrační křivka-závislost absorbance na koncentraci BSA.

Pomocí grafu závislosti absorbance na koncentraci BSA byla vypočítána koncentrace bílkoviny ve 20x zředěném roztoku DHRS1. Výsledná koncentrace celkové bílkoviny s overexprimovanou DHRS1 byla 9,47 mg/ml.

## 5.7 Membránová topologie DHRS1

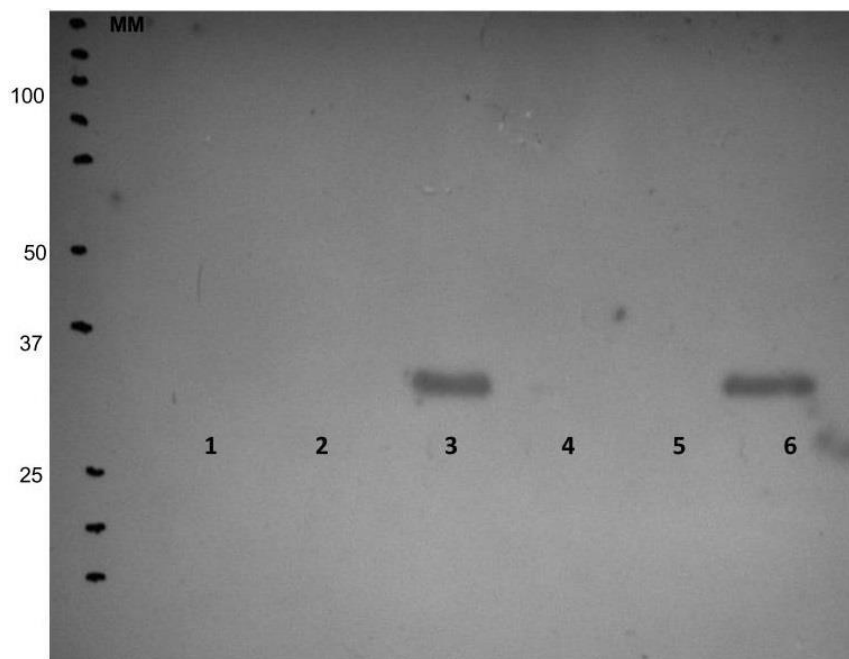
Vzhledem k tomu, že lidská DHRS1 je predikována na základě bioinformatických dat jako membránově vázaný protein, tak bylo třeba zjistit, jakým způsobem interaguje s membránou. Pro stanovení, zda se jedná o integrální nebo o periferní membránový enzym byla použita metoda extrakce v alkalickém prostředí a v prostředí detergentu

(4.4.1). Periferní protein se z membrány uvolní snadněji, než integrální, protože je k membráně poután pouze slabými vazbami a k uvolnění z membrány dojde už při změně pH (alkalická extrakce) a/nebo iontové síly. Integrální proteiny jsou do membrány vnořeny a pro jejich uvolnění je potřeba použít látky, které tuto membránu rozrušují, v našem případě byl použit detergent (extrakce v prostředí detergentu). Po extrakci v alkalickém prostředí (0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 25mM CH<sub>3</sub>COOK) a v prostředí detergentu (1,2 % Triton X-100) se v obou případech protein uvolnil do supernatantu (Obrázek 13).



**Obrázek 13** - Alkalická extrakce a extrakce s detergentem mikrosomální frakce s DHRS1. Jako protilátky byly použity primární králičí protilátka proti FLAG-tagu (1:50) a sekundární prasečí protilátka proti králičí (1:20 000). MM=Precision Plus Protein Standards (10-250 KDa), 1-alkalická extrakce- peleta, 2-alkalická extrakce-supernatant, 3-extrakce detergentem-peleta, 4-extrakce detergentem-supernatant.

Orientace enzymu v membráně je úzce spjata s enzymovou aktivitou. Proteiny jsou různě dostupné pro substráty nebo kofaktory podle toho, jak je enzym v membráně orientován. Lidská DHRS1 je membránově vázaný enzym, který může být orientovaný do lumen endoplasmatického retikula nebo cytosolu. Pro stanovení enzymové orientace byla použita metoda inkubace s proteinasou K ve vodném prostředí a v prostředí detergentu (4.4.2). K úplné degradaci proteinu došlo již při inkubaci s proteinasou K ve vodném prostředí (Obrázek 14), což poukazuje na orientaci do cytosolu.

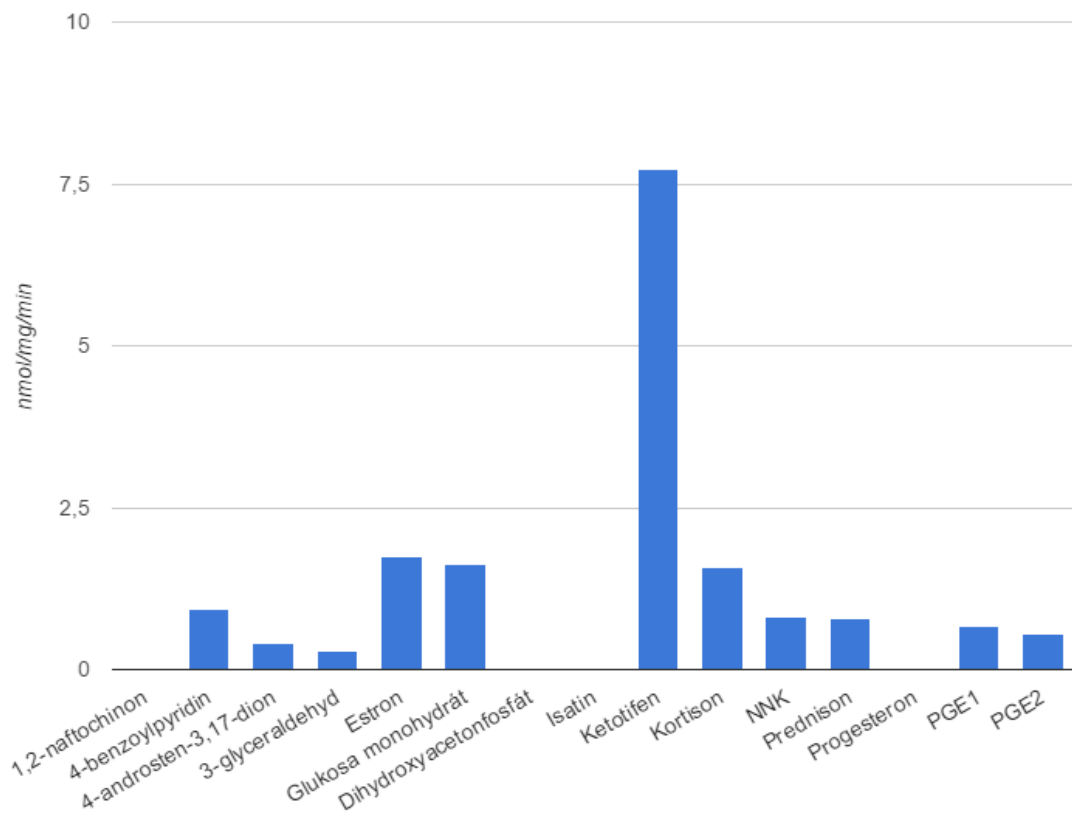


**Obrázek 14** - Inkubace mikrosomální frakce s overexprimovanou DHRS1. MM-Precision Plus Protein Standards (10-250 KDa), 1-proteinasa K + vodné prostředí (1:10), 2-proteinasa K+Triton X-100 (1:10), 3-kontrola bez proteinasy K (1:10), 4-proteinasa K+vodné prostředí (1:30), 5-proteinasa K+Triton X-100 (1:30), 6-kontrola bez proteinasy K (1:30).

## 5.8 Stanovení specifické enzymové aktivity

Pro testování specifické aktivity lidské DHRS1 byla vybrána metoda spektrofotometrického stanovení založená na měření úbytku absorbance NADPH při vlnové délce 340nm. První měření s eobiotickými substráty probíhalo při finální koncentraci 250  $\mu$ M. Při těchto měřeních byla finální koncentrace ethanolu větší než 5 %, proto byla metoda optimalizována a při dalších měřeních, kdy byla finální koncentrace ligandu 125  $\mu$ M, respektive 50  $\mu$ M, byl obsah ethanolu v inkubační směsi 1,92 %. Při těchto nižších koncentracích tedy zřejmě nedocházelo k inhibici proteinu a byly naměřeny aktivity vůči některým eobiotickým (Tabulka 15) i xenobiotickým (Tabulka 16) substrátům (Obrázek 15).





**Obrázek 15** - Naměřená katalytická aktivita mikrosomální frakce s overexprimovanou DHRS1 vůči vybraným ligandům. Finální koncentrace ligandů byla 50  $\mu\text{M}$  a finální koncentrace kofaktoru (NADPH) 200  $\mu\text{M}$ .

**Tabulka 15** - Výsledky měření enzymové aktivity lidské DHRS1 vůči eobiotickým substrátům.

Substrát	Finální koncentrace substrátu (μM)	Enzymová aktivita (nmolxmg <sup>-1</sup> xmin <sup>-1</sup> )
4-androsten-3,17-dion	250	1,3703
	125	-
	50	0,4077 ± 0,5596
3-glyceraldehyd	125	-
	50	0,2938 ± 0,065008
Dihydrotestosteron	250	-
	125	-
Dihydroxyacetonfosfát	250	-
	50	0,7435
Estron	125	0,1023
	50	1,7552 ± 1,2154
Glukosa monohydrát	125	-
	50	1,6369 ± 0,9186
Kortison	250, 125	-
	50	1,5790 ± 0,7349
Progesteron	125	-
	50	-
Prostaglandin E1	125	-
	50	0,6756 ± 0,0791
Prostaglandin E2	125	-
	50	0,5576 ± 0,2459

**Tabulka 16** - Výsledky měření enzymové aktivity lidské DHRS1 vůči xenbiotickým substrátům.

Substrát	Finální koncentrace substrátu (μM)	Enzymová aktivita (nmolxmg <sup>-1</sup> xmin <sup>-1</sup> )
1,2-naftochinon	250	14,9463
	50	-
4-benzoylpyridin	250	-
	50	0,9394
4-nitroacetofenon	250	-
4-nitrobenzaldehyd	250	-
9,10-fenantrenchinon	250	-
Acetohexamid	250	-
Benzil, Difenylethandion	250	-
Kys. fenofibrinová	250	-
Kys. flufenamová	250	-
Hexan-3,4-dion	250	-
Isatin	250	-
	50	-
Ketotifen	250	-
	50	7,7289 ± 0,1442
Menadion	250	-
Metyrapon	250	-
4-methylnitrosoamin-1-(3-pyridyl)-butan-1-on	250	-
	50	0,8115
p-benzochinon	250	-
Prednison	250, 125	-
	50	0,7875 ± 0,0226

## 6. DISKUSE

Lidská DHRS1 patří mezi málo charakterizované enzymy dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem. Řadí se do podrodiny "classical", konkrétně do klastru 3 a vykazuje fylogenetickou spojitost s některými členy dehydrogenas/reduktas rodiny SDR (DHRS3, DHRS7), se zástupci hydroxysteroiddehydrogenas (HSD11B1, HSD17B3, HSD17B4, HSD17B11, HSD17B12, HSD17B13) a retinoldehydrogenas (RDH10) (Bray et al., 2009). Vzhledem k biologické funkci těchto enzymů je možné uvažovat o zapojení lidské DHRS1 do metabolismu steroidů, retinoidů a případně detoxifikace xenobiotik.

Gen pro lidskou DHRS1 byl poprvé izolován z cDNA mozku lidského plodu a vykazuje 76% sekvenční podobnost s myším orthologem. Některé motivy, které jsou typické pro členy SDR rodiny, jako např. triáda aminokyselin serin-tyrosin-lysin vytvářející aktivní místo nebo motiv bohatý na glycin (Thr-Gly-x-x-x-Gly-x-Gly) umožňující vazbu pyrofosfátového kofaktoru, byly u DHRS1 také detekovány (Wu et al., 2001).

Pomocí metody hybridizace RNA byly objeveny 2 transkripční formy lidské DHRS1, z nichž každá vykazuje rozdílnou tkáňovou expresi. U obou forem mRNA byla detekována exprese v játrech (Wu et al., 2001). I z tohoto důvodu byla testována aktivita lidské DHRS1 vůči xenobiotikům. (Wu et al., 2001). Na první fázi biotransformace xenobiotik se podílí především systém cytochromu P450 (CYP), jehož nejdůležitější isoformy se nacházejí, stejně jako DHRS1, v membráně endoplasmatického retikula. Dalšími důležitými enzymy v první fázi biotransformace jsou karbonyl redukující enzymy. Jediný dobře prozkoumaný mikrosomální enzym, podílející se na detoxifikaci xenobiotik, je 11 $\beta$ -HSD1, ostatní mikrosomální zástupci jsou v tomto směru nedostatečně charakterizovaní. Enzymy, u kterých byla exprese detekována v játrech, a jejichž funkce souvisí s metabolismem xenobiotik, jsou např.: lidská 11 $\beta$ -HSD1, CBR1, 17 $\beta$ -HSD2 (Škarydová & Wsól, 2011). V žádné studii však zatím nebyla testována exprese proteinu DHRS1. Vzhledem k tomu, že lidská DHRS1 je s membránou asociovaný enzym, tak pro získání kompletních informací o její expresi je nutné nejprve provést extrakci DHRS1 pomocí vhodného detergentu, následně enzym purifikovat a rekonstituovat, aniž by došlo k poškození jeho struktury (Štambergová, 2013).

Lidská DHRS1 byla detekována také v některých patofyziologických procesech. Gen pro DHRS1 je součástí degradační dráhy 1- a 2-methylnaftalenu. Tato degradační dráha má vliv na faktory, které jsou spojovány s utvářením geometrie krčku stehenní kosti (Chen et al., 2010). Součástí degradační dráhy 1- a 2-methylnaftalenu jsou také jiní zástupci dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem, jako např.: DHRS3 nebo DHRS7 (Chen et al., 2011). Dále je DHRS1 pravděpodobně zapojena v patogenezi melanomu, kdy dochází při mutaci IDH1 ke zmeněné expresi lidské DHRS1. Snížená exprese byla v tomto případě detekována také u lidské alkoholdehydrogenasy 5 (Shibata et al., 2011).

Pro pochopení významu lidské DHRS1 je důležité nalézt nové informace o membránové topologii a enzymové aktivitě, které povedou k rozšíření zatím nedostatečných poznatků o vlastnostech a roli enzymu DHRS1 v lidském organismu. Lidská DHRS1 byla na základě bioinformatických dat predikována jako membránově vázaný enzym ER, přesná membránová topologie však dosud nebyla žádnou studií potvrzena. V této práci byla lidská DHRS1 experimentálně detekována jako periferní protein, který je k membráně endoplasmatického retikula vázán pouze slabými vazbami. Protein spojený takto s membránou však může být svým polypeptidovým řetězcem orientovaný buď do lumen ER, nebo do cytosolu. Orientace enzymu v membráně je úzce spjata s enzymovou aktivitou. Proteiny jsou různě dostupné pro substráty nebo kofaktory podle toho, jak je enzym v membráně orientován. Podle naměřených výsledků je lidská DHRS1 orientována do cytosolu. Stejně výsledky byly nalezeny například u DHRS3 (Lundová et al., 2014), DHRS9 (Chetyrkin et al., 2001) nebo u RoDH4 (Lapshina et al., 2003).

Výběr potenciálních ligandů pro spektrofotometrický screening probíhal na základě získaných informací o enzymové aktivitě CBR1 a 11 $\beta$ -HSD1, které vykazují redukční aktivitu vůči různým sloučeninám s karbonylovou skupinou (Hult et al., 2001; Pilka et al., 2009). Vzhledem ke zjištění, že je lidská DHRS1 orientovaná svým polypeptidovým řetězcem do cytosolu, byl pro testování katalytické aktivity vybrán NADPH kofaktor. NADPH vzniká v cytosolu během oxidativní fáze pentosového cyklu a slouží jako redukční činidlo pro řadu biosyntetických reakcí, navíc chrání buňky před oxidačním poškozením (Wamelink et al., 2008). Obecně platí, že enzymy orientované do cytosolu jsou aktivní spíše v redukčním, než oxidačním směru (Škarydová & Wsól, 2011). Za NADPH-

dependentní reduktasu je považována například lidská RDH11, která má většinu polypeptidového řetězce umístěnou na cytosolické straně membrány, stejně jako DHRS1 (Lundová et al., 2014; Kedishvili, 2013). Testování vybraných substrátů probíhalo *in vitro* za použití spektrofotometrického stanovení úbytku kofaktoru NADPH při vlnové délce 340 nm. Z výsledků je patrné, že při vyšších koncentracích substrátu v inkubační směsi (250  $\mu\text{M}$ ) nebyla téměř nikde aktivita enzymu DHRS1 detekována. Mohlo to být způsobeno finální koncentrací ethanolu ( $> 5\%$ ), protože samotný ethanol má inhibiční účinky nebo se mohlo jednat o inhibici enzymu substrátem. Při finální koncentraci ligandů 50  $\mu\text{M}$  (finální koncentrace ethanolu byla  $< 2\%$ ) byla detekována aktivita vůči některým eobiotickým i xenobiotickým sloučeninám. U eobiotických substrátů byla nejvyšší aktivita naměřena vůči estronu ( $\sim 1,8 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ), kortisonu ( $\sim 1,6 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a glukosa monohydrátu ( $\sim 1,6 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Nižší aktivita byla naměřena vůči 4-androsten-3,17-dionu ( $\sim 0,4 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 3-glyceraldehydu ( $\sim 0,3 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a prostaglandinům (PGE1  $\sim 0,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ; PGE2  $\sim 0,6 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Naměřená aktivita lidské 17 $\beta$ -HSD1 vůči estronu, která byla stanovena jako zdánlivá maximální rychlost  $V$  ( $V_{\text{max}}$ ), je  $\sim 75,2 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , což je o řád vyšší aktivita, než byla naměřena u DHRS1 (Haller et al., 2010). U xenobiotických substrátů byla nejvyšší aktivita naměřena vůči ketotifenu ( $\sim 7,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ), menší aktivita byla zaznamenána také vůči prednisonu ( $\sim 0,8 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ), NNK ( $\sim 0,8 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a 4-benzoylpyridinu ( $\sim 0,9 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Lidská CBR1 patří mezi nejaktivnější cytosolické enzymy účastníci se detoxifikace xenobiotik. Mezi xenobiotické substráty CBR1 patří sloučeniny typu chinonu (*ortho*- i *para*-chinony) a antracykliny. V porovnání relativní enzymové aktivity CBR1 (vztažené na relativní aktivitu CBR3 vůči 1,2-naftochinonu, která byla stanovena na hodnotu 1) a specifické aktivity DHRS1 vůči 1,2-naftochinonu je aktivita CBR1 ( $1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) o dva řády vyšší. Také relativní aktivita CBR1 vůči karcinogenu tabákového kouře NNK ( $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) je o 2 řády vyšší, než byla naměřena u lidské DHRS1 (Pilka et al., 2009). Jak už bylo zmíněno, lidská 11 $\beta$ -HSD1 je jediný dobře charakterizovaný mikrosomální enzym podílející se na detoxifikaci xenobiotik s karbonylovou skupinou. Kromě xenobiotických substrátů se také podílí na metabolismu například glukokortikoidů. Specifická aktivita 11 $\beta$ -HSD1 (počítána jako  $V_{\text{max}}$ ) vůči kortisonu ( $\sim 0,2 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) je o řád menší, než naměřená aktivita u lidské DHRS1. V tomto případě se jedná o zajímavé zjištění, protože aktivita

11 $\beta$ -HSD1 byla testována na stejném systému *Sf9* mikrosomů jako DHRS1 (Hult et al., 2001). Nicméně, porovnání katalytických aktivit enzymů je složité, protože nemusí být měřeny za stejných podmínek a také mohou být vyjádřeny v jiných jednotkách.

V této práci se poprvé podařilo připravit rekombinantní enzym DHRS1, u kterého bylo experimentálně potvrzeno, že se jedná o membránový protein. Dále se podařilo určit membránovou topologii, respektive orientaci polyptidového řetězce do cytosolu. Vůbec poprvé se podařilo *in vitro* stanovit specifickou aktivitu rekombinantní formy lidské DHRS1 vůči některým sloučeninám s karbonylovou skupinou.

Práce tak odkrývá tajemství lidské DHRS1, enzymu, který patří do stále ne zcela prozkoumané rodiny SDR proteinů. Výsledky by měly být základem pro další studie, které mohou zahrnovat například přípravu purifikovaného a rekonstituovaného enzymu nebo detekci aktivity lidské DHRS1 *in vivo*.

## 7. ZÁVĚR

Experimentální práce byla zaměřena na přípravu rekombinantní formy DHRS1 z nadrodiny SDR v eukaryotickém expresním systému, stanovení její topologie a testování katalytické aktivit vůči vybraným sloučeninám s karbonylovou skupinou. Na základě vytyčených cílů se podařilo:

- 1) Připravit rekombinantní formu lidské DHRS1 za využití metody klonování nezávislého na ligase a bakulovirového expresního systému.
- 2) Připravit mikrosomální frakci z *Sf9* buněk obsahující DHRS1.
- 3) Určit topologii lidské DHRS1 za využití metody alkalické extrakce, extrakce s detergentem a inkubace s proteinasou K. Lidská DHRS1 je periferní protein interagující s membránou ER s polypeptidovým řetězcem směřujícím do cytosolu.
- 4) Detekovat specifickou enzymovou aktivitu lidské rekombinantní DHRS1 vůči některým substrátům s karbonylovou funkční skupinou, jako např.: estron, kortison, glukosa monohydrát, prednison, 4-androsten-3,17-dion, NNK, 4-benzoylpyridin nebo prostaglandiny.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADH	alkoholdehydrogenasa
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid hydrochlorid
AKR	aldo-ketoreduktasy
AMP	ampicilin
Asn	asparagin
BEVS	bakulovirový expresní vektorový systém
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí bovinní sérový albumin
CBR	karbonylreduktasa
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervový systém
CRD	kortison reduktasový deficit
CoA	koenzym A
CYP	cytochrom P450
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHRS	dehydrogenasy/reduktasy SDR rodiny
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
EtOH	ethanol
FLAG	oktapeptidová sekvence
Fwd	forward primer (5'→3')
H6PDH	hexosa-fosfátdehydrogenasa
HMM	Hidden Markov Model

HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
IDH1	isocitrát-dehydrogenasa1
IPGT	ispropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KAR	ketoacyl-CoA reduktasa
LB	Luria-Broth médium
LIC	klonování nezávislé na ligase
Lys	lysin
MeOH	methanol
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukováný nikotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NNK	4-methylnitrosoamin-1-(-3-pyridyl)-butan-1-on
PCR	polymerasová řetězová reakce
PGE1	prostaglandin E1
PGE2	prostaglandin E2
PIC	koktejl inhibitorů proteas
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
RDH	retinoldehydrogenasa
Rev	reverse primer (5'→3')
SCP2	sterol carrier protein
SDR	dehydrogenasy/reduktázy s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	serin
<i>Sf9</i>	hmyzí buněčná linie z ovariálních buněk <i>Spodoptera frugiperda</i>

SOB	superoptimální růstové médium
SOC	superoptimální růstové médium s přidanou glukosou
TCA	trichloroctová kyselina
Thr	threonin
TM	transmembránová jednotka
Tyr	tyrosin
$V_{\max}$	maximální (limitní) rychlost enzymové reakce
x	náhrada za jakoukoli aminokyselinu

## POUŽITÁ LITERATURA

- Bray, J.E., Mersden, B.D., Oppermann, U., 2009. The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chem. Biol. Interact.* 178, 99-09.
- Gabrielli, F., Tofanelli, S., 2012. Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. *Gene* 511, 461-9.
- Haller, F., Moman, E., Hartmann, R.W., Adamski, J., Mindnich, R., 2010. Molecular framework of steroid/retinoid discrimination in 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and photoreceptor-associated retinol dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 399, 255-67.
- Hoffmann, F., Maser, E., 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* 39, 87-144.
- Hult, M., Nobel, C.S.I., Abrahmsen, L., Nicoll-Griffith, D.A., Jörnvall, H., Oppermann, U.C.T., 2001. Novel enzymological profiles of human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem. Biol. Interact.* 130-132, 805-14.
- Chen, Y., Xiong, D.H., Guo, Y.F., Pan, F., Zhou, Q., Zhang, F., Deng, H.W., 2010. Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of EphrinA-EphR pathway for femoral neck bone geometry. *Bone* 46, 129-36.
- Chetyrkin S.V., Belyaeva, O.V., Gough, W.H., Kedishvili, N.Y., 2001. Characterization of a novel type of human microsomal 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase: unique tissue distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 276, 22278-86.
- Jörnvall, H., Landreh, M., Östberg, L.J., 2015. Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chem. Biol. Interact.* 234, 75-9.
- Kavanagh, K., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U., 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily : functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3895-906.
- Kedishvili, N.Y., 2013. Enzymology of retinoid acid biosynthesis and degradation: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *J. Lipid Res.* 54, 1744-760.

- Kedishvili, N.Y., Chumakova, O.V., Chetyrkin, S.V., Belyaeva O.V., Lapshina, E.A., Lin D.W., Matsumura, M., Nelson, P.S., 2002. Evidence that the human gene for prostate short-chain dehydrogenase/reductase (PSDR1) encodes a novel retinal reductase (RaIR1). *J. Biol. Chem.* 277, 28909-15.
- Keller, B., Volkmann, A., Wilckens, T., Moeller, G., Adamski, J., 2006. Bioinformatic identification and characterization of new members of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248, 56-60.
- Lapshina, A.E., Belyaeva, O.V., Chumakova, O.V., Kedishvili, N.Y., 2003. Differential recognition of the free versus bound retinol by human microsomal retinol/sterol dehydrogenase: characterization of the holo-CRBP dehydrogenase activity of RoDH4. *Biochemistry* 42, 776-84.
- Lidén, M., Romert, A., Tryggvason, K., Persson, B., Eriksson, U., 2001. Biochemical defects in 11-cis-retinol dehydrogenase mutants associated with fundus albipunctatus. *J Biol Chem* 276, 4925-7.
- Lidén, M., Tryggvason, K., Eriksson, U., 2003. Structure and function of retinol dehydrogenases of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Mol. Aspects Med.* 24, 403-9.
- Lin, B., White, J.T., Ferguson, C., Wang, S., Vessella, R., Bumgarner, R., True, D.L., Hood, L., Nelson, P.S., 2001. Prostate short-chain dehydrogenase reductase 1 (PSDR1): a new member of the short-chain steroid dehydrogenase/reductase family highly expressed in normal and neoplastic prostate epithelium. *Cancer Res.* 61, 1611-8.
- Liu, S., Huang, C., Li, D., Ren, W., Zhang, H., Qi, M., Li, X., Yu, L., 2007. Molecular cloning and expression analysis of a new gene for short-chain dehydrogenase/reductase 9. *Acta Biochim Pol.* 54,213-8.
- Lukacik, P., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., 2006. Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248, 61-71.
- Lukacik, P., Keller, B., Bunkoczi, G., Kavanagh, K., Lee, W.H., Hwa Lee, W., Adamski, J., Oppermann, U., 2007. Structural and biochemical characterization of human orphan DHRS10 reveals a novel cytosolic enzyme with steroid dehydrogenase activity. *Biochem. J.* 402, 419-27.

Lundová, T., Zemanová, L., Malčecová, B., Skarka, A., Štambergová, H., Havránková, J., Šafr, M., Wsól, V., 2015. Molecular and biochemical characterisation of human short-chain dehydrogenase/reductase member 3 (DHRS3). *Chem. Biol. Interact.* 178-187.

Malátková, P., Maser, E., Wsól, V., 2010. Human carbonyl reductases. *Curr. Drug Metab.* 11, 639-58.

Mindnich, R., Haller, F., Halbach, F., Moeller, G., Hrabé de Angelis, M., Adamski, J., 2005. Androgen metabolism via 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in mammalian and non-mammalian vertebrates: comparison of the human and the zebrafish enzyme. *J. Mol. Endocrinol.* 35, 305-16.

Nikolaeva, O., Takahashi, Y., Moiseyev, G., Ma, J., 2009. Purified RPE65 shows isomerohydrolase activity after re-association with a phospholipid membrane. *FEBS J* 276, 3020-3030.

Oppermann, U., Filling, Ch., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H., 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 247-53.

Persson, B., Kallberg, Y., 2013. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact.* 202, 111-15.

Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J., Bruford, E., Dellaporta, S., Favia, A., Duarte, R., Jörnvall, H., Kavanagh, K., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T.M., Thornton, J.M., Adamski, J., Oppermann, U., 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem. Biol. Interact.* 178, 94-8.

Pilka, E.S., Niesen, F.H., Lee, W.H., El-Hawari, Y., Dunford, J.E., Kochan, G., Wsol, W., Martin, H.J., Maser, E., Oppermann, U., 2009. Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PLoS One* 4, e7113.

Shibata, T., Kokubu, A., Miyamoto, M., Sasajima, Y., Yamazaki, N., 2011. Mutant IDH1 Confers an in Vivo Growth in a Melanoma Cell Line with BRAF Mutation. *The American Journal of Pathology* 178, 1395-402.

Simon, A., Romert, A., Gustafson, A.L., McCaffery, J.M., Eriksson, U., 1999. Intracellular localization and membrane topology of 11-cis retinol dehydrogenase in the retinal pigment epithelium suggest a compartmentalized synthesis of 11-cis retinaldehyde. *Journal of Cell Science* 112, 549-558.

Škarydová, L., Wsól, V., 2011. Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug metabolism Reviews*, 2011, 1-19.

Štambergová, H. Lidské membránově vázané karbonylreduktasy. Hradec Králové, 2013. 216 s. Disertační práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Vedoucí disertační práce Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Štambergová, H., Škarydová, L., Dunford, J.E., Wsól, V., 2014. Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem. Biol. Interact.* 207, 52-57.

Štambergová, H., Zemanová L., Lundová, T., Malčková, B., Skarka, A., Šafr, M., Wsól, V., 2016. Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 155, 112-19.

Tiwari, P., Singh, N., Dixit, A., Choudhury, D., 2014. Multivariate sequence analysis reveals additional function impacting residues in the SDR superfamily. *Proteins* 82, 2842-56

Wamelink, M.M., Struys, E.A., Jakobs, C., 2008. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis.* 31, 703-17.

Wu, Q., Xu, M., Cheng, Ch., Zhou, Z., Huang, Y., Zhao, W., Zeng, L., Xu, J., Fu, X., Ying, K., Xie, Y., Mao, Y., 2002. Molecular cloning and characterization of a novel Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 gene from human fetal brain. *Molecular Biology Reports* 28, 193-98.

## Internetové zdroje

Internet 1: *RCSB PDB. PDB PROTEIN DATA BANK.* [online] [cit. 2016-05-05].

Dostupné z: [www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureid=2IUJ](http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureid=2IUJ)

Internet 2: *Western Blot. Wikipedia The Free Encyclopedia.* [online] [cit. 2016-05-05].

Dostupné z: <https://en.wikipedia.org>