

**KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra biochemie

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF SCIENCE**

Department of Biochemistry

Studijní program: Biochemie

Ph.D. study program: Biochemistry



Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis

**Enzymové a metabolické přeměny silybinu a vybraných flavonoidů
Enzymatic and Metabolic Transformation of Silybin and its Congeners**

Mgr. Kateřina Purchartová

Školitel/Supervisor: prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

Praha 2016

Abstrakt

Flavonolignany jsou přírodní látky, které mají mj. chemoprotektivní, hepatoprotektivní, antioxidační, dermatoprotektivní účinky. Tyto přírodní látky se metabolizují zejména ve II. fázi biotransformace, přičemž jednou z dominantních metabolických drah je sulfatace. Detailní struktura většiny takto vzniklých metabolitů však není dosud známa a jejich standardy nejsou komerčně dostupné. Cílem této studie bylo připravit sulfatované deriváty flavonolignanů silymarinu - silybinu, 2,3-dehydrosilybinu, isosilybinu, silychristinu a silydianinu a různých flavonoidů - kvercetin, isokvercitrinu, taxifolinu a rutinu, a tyto potenciální savčí metabolity plně charakterizovat. Pro tento účel byly použity dvě rekombinantní aryl sulfotransferasy: 1. z *Desulfitobacterium hafniense*, 2. z potkaních jater.

Sulfáty byly získány ve vysokých výtěžcích za použití *p*-nitrofenyl sulfátu jako donoru SO_3^- skupiny a PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát)-independentní bakteriální aryl sulfotransferasy z *D. hafniense*. Flavonolignany tvořily zcela výlučně monosulfatované deriváty, kde pozice sulfátu byla určena na pozici C-20 (nebo C-19 v případě silychristinu). Pouze 2,3-dehydrosilybin podléhal další sulfataci a bylo možné izolovat také jeho 7,20-*O*-disulfatovaný derivát. Isokvercitrin a rutin byly selektivně sulfatované v poloze C-4' katecholové skupiny. Také taxifolin byl preferenčně sulfatován v této poloze (C-4'), ale bylo také zjištěno menší množství C-3' isomeru. Naopak sulfatace kvercetin probíhala přednostně na C-3' poloze, ale opět byla prokázána přítomnost C-4' isomeru.

Naopak rekombinantní savčí aryl sulfotransferasa, která je PAPS-dependentním enzymem, byla méně katalytický účinná s užití substrátovou specificitou; byly izolovány pouze sulfáty silybinu B (C-20), kvercetin a taxifolinu (C-3'). Bylo prokázáno, že silybin A a glykosidy kvercetin (rutin a isokvercitrin) nejsou tímto enzymem přeměňovány.

Sulfatované produkty studovaných látek připravené pomocí obou aryl sulfotransferas byly plně charakterizovány pomocí HRMS a NMR. Tyto sulfatované

metabolity mohou být následně použity pro *in vitro* studie biologické aktivity a dále jako autentické standardy při metabolických studiích *in vivo*.

Abstract

Natural flavonoids and flavonolignans feature beneficial properties for living organisms such as antioxidant and hepatoprotective effects, anticancer, chemoprotective, dermatoprotective and hypocholesterolemic activities. Their metabolism in mammals is complex, the exact structure of their metabolites still remains partly unclear and the standards are usually not commercially available. Hence, this project focused on the preparation of potential and defined biotransformation Phase II sulfated metabolites of silymarin flavonolignans: silybin, 2,3-dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, silydianin and flavonoids quercetin, taxifolin, rutin and isoquercitrin. Pure sulfated derivatives were prepared using aryl sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* and aryl sulfotransferase from rat liver.

Using heterologously expressed PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) - independent arylsulfotransferase from *D. hafniense* and cheap *p*-nitrophenyl sulfate as sulfate donor, sulfated flavonolignans and flavonoids were obtained in high yields. Silymarin flavonolignans afforded exclusively monosulfates at the position C-20 (C-19 in the case of silychristin), except 2,3-dehydrosilybin that yielded also the 7,20-*O*-disulfated derivative. Isoquercitrin and rutin were selectively sulfated at C-4' position of the catechol moiety. Taxifolin was sulfated at the C-4' position as well, however, a minor amount of the C-3' isomer was also formed. Sulfation of quercetin proceeded preferentially at the C-3' position, but a lower proportion of the C-4' isomer was isolated as well.

On the contrary, recombinant mammalian PAPS-dependent aryl sulfotransferase was less efficient and had a narrower substrate specificity. The enzyme from rat liver catalyzed only sulfation of silybin B (at C-20), quercetin and taxifolin (at C-3') as evidenced from isolated products. Silybin A and the quercetin glycosides (rutin and isoquercitrin) remained intact.

The sulfated products prepared by both aryl sulfotransferases were fully characterized by HRMS and NMR methods. The sulfated metabolites can be used for *in vitro* evaluation of biological activities and as authentic standards for metabolic studies *in vivo*.

1 Úvod

Flavonoidy jsou přírodní látky patřící do skupiny polyfenolů, které se běžně vyskytují v potravinách, nápojích a jsou nedílnou součástí doplňků stravy a vitaminových doplňků¹.

Silymarin je extrakt z plodů (*cypsel*) ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*, (L.) Gaertn., Asteraceae). Jedná se o směs flavanolignanů (silybin, 2,3-dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, silydianin) a flavonoidů (taxifolin), z nichž většina je směsí diastereoisomerů. V silymarinu tak přirozeně nacházíme silybin A a B, 2,3-dehydrosilybin A a B, isosilybin A a B, silychristin A a B; pouze silydianin se vyskytuje jako jediný stereomer. Tyto látky mají silné antioxidační, protirakovinné a hepatoprotektivní účinky, používají se jako chemoprotektanty, dermatoprotektanty a vykazují i hypocholesteromickou aktivitu². Flavanolignany jsou špatně rozpustné ve vodě, jejich koncentrace v plazmě je po orálním podání velmi nízká (ng/ml)³. Jejich špatná biodostupnost negativně ovlivňuje jejich aktivitu *in vivo*. Roli hraje také jejich metabolismus, farmakokinetika a možné interakce s dalšími látkami či léčivy. Přestože byl metabolismus těchto látek mnohokrát studován, nebylo prozatím objasněno, jaká je struktura jejich hlavních metabolitů (s výjimkou silybinu).

Flavonoly jsou nejpočetnější skupinou flavonoidů. Tyto látky, mezi něž patří např. kvercetin⁴ či glykosidy kvercetinu (rutin⁵ či isokvercitrin⁶), hrají důležitou roli v lidské potravě. Kvůli svým rozmanitým vlastnostem a účinkům (antioxidační, antiradikálové, chemoprotektivní, antialergenní, protizánětlivé, antimikrobiální či protirakovinné)⁷ se také používají jako doplňky stravy. Některými metabolity kvercetinu se v minulých letech zabývalo několik studií, které poskytly velmi kontroverzní výsledky a ve kterých nebyli autoři schopni určit jejich přesné struktury⁸. Podobně jako u flavanolignanů, také biotransformace rutinu⁹, isoquercetinu⁶ a taxifolinu¹⁰ nebyla doposud detailně objasněna.

Metabolismus těchto látek začíná v žaludku a tenkém střevě. Následně, po jejich absorpci, dochází v játrech, ledvinách a dalších orgánech k jejich metabolickým

přeměním¹¹. Je známo, že některé druhy flavonoidů (zvláště jejich glykosidy) nejsou vstřebávány a prochází až do tlustého střeva, kde jsou štěpeny střevními bakteriemi. Obvykle tyto látky vstupují přímo do druhé fáze biotransformace a jsou preferenčně sulfatovány, glukuronidovány či methylovány pomocí sulfotransferas UDP-glukuronyltransferas, *N*-acetyltransferas, glutathion *S*-transferas, thiopurin-*S*-methyltransferas a *O*-methyltransferas¹².

Sulfotransferasy přeměňují xenobiotika i eubiotika na látky méně toxické a více rozpustné ve vodě. Tento proces poté umožňuje jejich snazší vyloučení z organismu např. žlučí či močí¹³. Tyto enzymy se vyskytují v rozličných tkáních, jako jsou ledviny, játra, mozek, nadledvinky, gastrointestinální trakt či krevní destičky¹³. Eukaryotické sulfotransferasy vyžadují přítomnost kofaktoru – 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátu (PAP). Aryl sulfotransferasy (EC 2.8.2.1) sulfatují širokou škálu fenolových látek¹⁴. Do této skupiny enzymů patří tři izoenzymy (I, II, IV), z nichž izoenzym IV je nejvýznamnější. Studovaná aryl sulfotransferasa IV (AST IV) je potkaní jaterní enzym s širokou substrátovou specificitou, nachází se v cytosolu a sulfatuje širokou škálu fenolů, aromatických hydroxylaminů či benzalkoholů. AST IV katalyzuje „přesun“ sulfátové skupiny z donoru (např. *p*-nitrofenyl sulfátu) na molekulu akceptoru za současné asistence kofaktoru - PAP¹⁵.

Prokaryotické aryl sulfotransferasy jsou enzymy, které také katalyzují přenos sulfátové skupiny z molekuly donoru na akceptor, ale nevyžadují přítomnost kofaktoru (PAP). Tyto enzymy se nacházejí převážně v periplasmě δ - a ϵ -proteobakterií¹⁶. Mykobakterie tyto enzymy využívají na tvorbu sulfatovaných metabolitů; bakterie nacházející se v lidském zažívacím traktu na sulfataci fenolů či na sulfataci antibiotik¹⁷. Obecně lze ale říci, že tato skupina enzymů má širokou substrátovou specificitu a převážná většina jejich substrátů není známá, a tudíž zatím nebyla objasněna ani jejich fyziologická role. Námi studovaná aryl sulfotransferasa z *Desulfitobacterium hafniense* (AST DH; EC 2.8.2.22) je rekombinantní enzym (ca 70

kDa) s širokým spektrem substrátové specificity, který s konverzí mezi 10 – 90 % přeměňuje jak aromatické, tak i alifatické substráty^{18, 19}.

2 Cíle práce

- nalezení enzymů vhodných pro sulfataci flavonolignanových a flavonoidových substrátů
- exprese aryl sulfotransferas z potkaních jater a z *D. hafniense* v *E. coli*
- využití těchto aryl sulfotransferas pro přípravu sulfatovaných metabolitů silybinu A&B (**1&2**), silybinu A (**1**), silybinu B (**2**), isosilybinu A (**3**), isosilybinu B (**4**), 2,3-dehydrosilybinu (**5&6**), silychristinu (**7**), silydianinu (**8**), kvercetin (**9**), taxifolinu (**10**), isokvercitrinu (**11**) a rutin (**12**)
- izolace, purifikace a detailní charakterizace těchto metabolitů

3 Materiál a metodika

V této práci byly použity následující metody (detaily jednotlivých experimentů jsou popsány v příslušných publikacích); pokud není uvedeno jinak, experimenty byly provedeny autorkou této práce:

- izolace plasmidové DNA, elektroforéza v agarosovém gelu, restriční analýza a štěpení DNA
- transformace buněk různých kmenů *E. coli* BL21(DE3)Gold, BL21, BL21(DE3)Stars, BL21(DE3)pLys, Origami(DE3)
- ko-transformace buněk *E. coli* s chaperony (GroEL/ GroES)
- kultivace bakterií
- biotransformace na celých buňkách
- stanovení proteinů podle Bradforda
- stanovení enzymových aktivit
- imobilizace enzymu
- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného
- klonování, ligace DNA fragmentů, polymerázová řetězová reakce (Dr. L. Engels)
- analytická vysokoúčinná kapalinová chromatografie (vývoj metod Ing. P. Marhol, Mgr. A. Křenková, Ph.D.)
- preparativní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (RNDr. D. Biedermann, Ph.D.)
- afinitní chromatografie
- gelová permeační chromatografie
- extrakce, extrakce na pevné fázi, srážení, analytická a preparativní tenkovrstvá chromatografie
- organická syntéza: methylace isokvercitrin sulfátu (prof. RNDr. L. Havlíček, CSc.); syntéza derivátů silybinu
- hmotnostní spektrometrie (MS/MS fragmentation, HRMS doc. RNDr. M. Šulc, Ph.D., doc. RNDr. J. Cvačka, Ph.D.)
- nukleární magnetická resonance (Mgr. H. Pelantová Ph.D., Ing. M. Kuzma, Ph.D.)

Zdroje použitých chemikálií, enzymů a mikroorganismů jsou detailně popsány v příslušných publikacích.

4 Výsledky a diskuse

Příprava enzymů použitých v této studii

Rekombinantní aryl sulfotransferasa z potkaních jater (AST IV) byla exprimována v kmenech *E. coli* BL21(DE3)Gold. AST IV byla nejvíce aktivní (3 U/ml), pokud byla exprimována v *E. coli* BL21(DE3)Gold za současného použití induktoru (IPTG, 0,1 mM) při 16 °C po dobu 16 hodin v TB médiu. Nejvyšší aktivity aryl sulfotransferasy z *D. hafniense* (AST DH) bylo dosaženo, pokud byla exprimována v *E. coli* BL21(DE3)Gold (28 500 U/ml). Buněčný lyzát obsahující AST DH nevykazoval známky sulfatasové aktivity, a proto nebyla purifikace tohoto enzymu nutná. Pro sulfataci jednotlivých substrátů byla použita purifikovaná AST IV, celé buňky obsahující AST IV, dále purifikovaná AST DH a buněčný lyzát obsahující AST DH.

Sulfatace silymarinových flavonolignanů pomocí purifikovaných enzymů

Během sulfatace silybinu bylo zjištěno, že AST IV je striktně selektivní enzym. AST IV sulfatovala pouze silybin B (**2**), silybin A (**1**) nebyl pro tento enzym vhodným substrátem. Dále bylo zjištěno, že tento enzym nelze použít pro preparativní přípravu sulfatovaných metabolitů, a to z několika důvodů. Velmi důležitou roli hrála špatná rozpustnost substrátů v polárních i nepolárních rozpouštědlech, omezená katalytická aktivita tohoto enzymu ve větších reakčních objemech (nad 1 ml) a v neposlední řadě tyto reakce limitoval přídavek drahého kofaktoru PAP (3'-fosfoadenosin-5'-fosfát). Proto byla v dalších reakcích použita biotransformace využívající celé buňky exprimující AST IV.

První izolované a charakterizované metabolity byly sulfatované deriváty silybinu A (**1**), silybinu B (**2**), isosilybinu A (**3**) a isosilybinu B (**4**), které byly připraveny pomocí purifikované AST DH. Bylo zjištěno, že stereochemie těchto substrátů ovlivňuje jejich konjugační kinetiku podobně jako u AST IV. Silybin B byl sulfatován rychleji než silybin A, podobně isosilybin A byl přeměňován rychleji než isosilybin B. Silybin A 20-*O*-sulfát (**1a**, 20 mg, 58 %), silybin B 20-*O*-sulfát (**2a**, 22 mg, 62 %), isosilybin A 20-*O*-sulfát (**3a**, 14 mg, 57 %) a isosilybin B 20-*O*-sulfát (**4a**, 11 mg, 50 %)

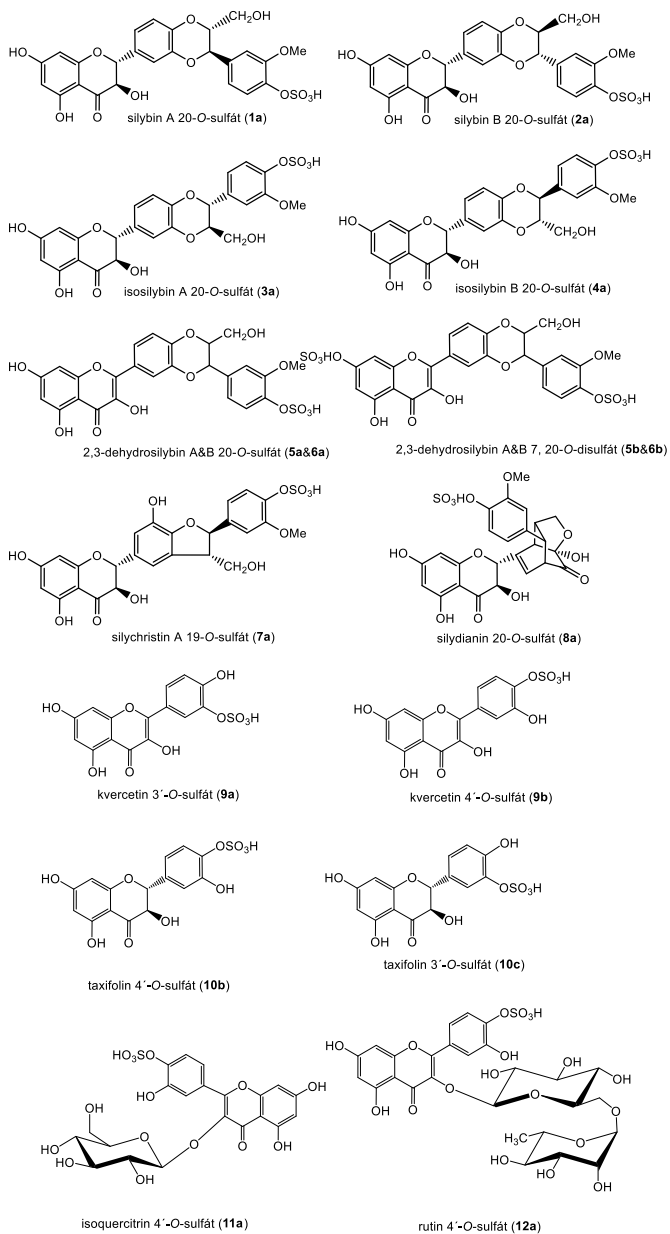
byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické resonance.

Sulfatační reakce katalyzované buněčným lyzátem a celými buňkami

Koncept katalýzy celými buňkami (AST IV) přinesl řadu vylepšení: do reakce nebylo potřeba dodávat kofaktor (PAP), byla snížena ztráta enzymové aktivity, ke které docházelo hlavně během purifikace tohoto enzymu, a zvýšila se stabilita enzymu během sulfatační reakce. Ze všech testovaných substrátů (**1**, **2**, **7-12**) byla pozorována nejvyšší konverze pro silybin B (**2**; 48 %) a silybin B 20-*O*-sulfát (**2a**, 10 mg, 25 %) byl úspěšně izolován a charakterizován. Při experimentu se směsným silybinem (A&B) bylo zjištěno, že silybin A (**1**) není inhibátorem této AST IV. Silybin B byl sulfatován ve stejném poměru, jakého bylo dosaženo při sulfataci opticky čistého silybinu B (**2**). Z tohoto pozorování vyplývá, že každý z těchto diastereomerů má specifický způsob biotransformace, což je ve shodě s literaturou^{20, 21}. Tento enzym dále přeměňoval taxifolin (**10**) na taxifolin monosulfát (**10a**, 1 mg, 1,5 %), který byl charakterizován pomocí HRMS. Předpokládáme, že se jedná o taxifolin 3'-*O*-sulfát, protože dalším produktem izolovaným z této reakce byl kvercetin 3'-*O*-sulfát (**9a**, 8 mg, 12 %), který je pravděpodobně oxidačním produktem taxifolin monosulfátu **10a**. Pro ověření možné oxidace cytochromy byl do reakční směsi přidán azid sodný a reakce byla zopakována za stejných podmínek. Přídavek azidu reakci nijak neovlivnil a byly izolovány shodné produkty. Bohužel nebylo možné jednoznačně určit, zda k oxidaci taxifolinu dochází před vlastní sulfatační reakcí nebo až po ní – pravděpodobně spontánně atmosférickým kyslíkem. Vzhledem k výsledkům, které byly získány při sulfataci kvercetinu, předpokládáme, že nejprve proběhla sulfatace molekuly taxifolinu, a následně pak oxidace taxifolin monosulfátu na kvercetin 3'-*O*-sulfát. Při sulfataci silychristinu A (**7**), silydianinu (**8**) a kvercetinu (**9**) byla pozorována spotřeba donoru sulfátu (*p*-nitrofenyl sulfát) za současného vzniku *p*-nitrofenolu (pNP), což byl přímý důkaz toho, že dochází k sulfataci daných substrátů. Přes veškerou naši snahu jsme však nebyli schopni tyto sulfatované deriváty detekovat,

izolovat a charakterizovat. Předpokládáme, že vzniklé sulfatované deriváty byly v reakční směsi ihned metabolizovány buňkami. Proto nebylo možné samotnou sulfataci těchto látek prokázat. Naopak isokvercitrin (**11**) a rutin (**12**) nebyly tímto enzymem přeměňovány vůbec (podobně jako silybin A). Nebyla pozorována ani spotřeba donoru sulfátu a ani tvorba *p*-nitrofenolu. Vzácnější flavonolignany, jako isosilybin A (**3**) a B (**4**) a směsný 2,3-dehydrosilybin (**5&6**), nebyly testovány, protože recyklace substrátů nebyla při této reakci možná.

Vzhledem k tomu, že některé sulfatované metabolity nebylo možné pomocí AST IV připravit, byly následně sulfatovány všechny substráty (**1-12**) pomocí buněčného lyzátu obsahujícího AST DH. Tento enzym reagoval se všemi substráty a produkty těchto reakcí byly izolovány a charakterizovány pomocí MS a NMR: silybin A&B 20-*O*-sulfát (**1a&2a** (1:1), 125 mg, 60 %), silybin A 20-*O*-sulfát (**1a**, 120 mg, 62 %), silybin B 20-*O*-sulfát (**2a**, 135 mg, 67 %), 2,3-dehydrosilybin A&B 20-*O*-sulfát (**5a&6a**, 10 mg, 25 %), 2,3-dehydrosilybin A&B 7,20-*O*-disulfát (**5b&6b**, 9 mg, 28 %), silychristin A 19-*O*-sulfát (**7a**, 100 mg, 57 %), silydianin 20-*O*-sulfát (**8a**, 90 mg, 75 %), isokvercitrin 4'-*O*-sulfát (**11a**, 120 mg, 69 %), rutin 4'-*O*-sulfát (**12a**, 90 mg, 53 %), neseparovatelná směs taxifolin 4'-*O*-sulfátu (**10b**) a taxifolin 3'-*O*-sulfátu (**10c**, vedlejší produkt, cca 16 %,) (190 mg, 75 %), směs kvercetin 3'-*O*-sulfátu (**9a**) a kvercetin 4'-*O*-sulfátu (**9b**, vedlejší produkt, cca 25 % - omezeně separovatelný pomocí analytické HPLC) (90 mg, 47 %). K určení struktur všech připravených sulfátů (**1a-12a**) byla použita kombinace HRMS či MS, ¹H-, ¹³C-NMR experimentů. V případě 3', 4' sulfátů byly u katecholové skupiny pozorovány typické posuny v poli uhlíkových spekter. Přehled struktur charakterizovaných produktů představuje **obrázek 1**.



Obrázek 1: Přehled připravených sulfatovaných metabolitů.

5 Závěry

V této práci byly pro sulfataci flavonolignanů a flavonolů vybrány dvě aryl sulfotransferasy: rekombinantní aryl sulfotransferasa izolovaná z potkaních jater (AST IV) a rekombinantní aryl sulfotransferasa izolovaná z *Desulfitobacterium hafniense* (AST DH). Pro všechny substráty a formy enzymů, které byly při těchto reakcích použity, byly optimalizovány reakční podmínky, jmenovitě purifikované AST IV a AST DH, buněčný lyzát obsahující AST DH a celé buňky exprimující AST IV.

Oba enzymy byly exprimovány, AST IV byla také purifikována. Vzhledem k tomu, že buněčný lyzát obsahující AST DH měl vysokou specifickou aktivitu (28 500 U/mg) a nevykazoval žádnou sulfatasovou aktivitu, nebyla purifikace AST DH nutná. AST IV se po purifikaci jevila jako velmi nestabilní a byla u ní naměřena nižší katalytická aktivita (3 U/mL). Proto byl pro preparativní reakce využit koncept katalýzy s celými buňkami exprimující AST IV a buněčný lyzát obsahující AST DH.

Při reakcích katalyzovaných celými buňkami (AST IV) bylo možno izolovat a charakterizovat silybin B 20-*O*-sulfát, taxifolin monosulfát a oxidační produkt vznikající z taxifolin monosulfátu - kvercetin 3'-*O*-sulfát. Silydianin, silychristin a kvercetin patřily též mezi substráty této aryl sulfotransferázy, ale sulfatované produkty se nepodařilo izolovat. Bylo zjištěno, že silybin A, isokvercitrin a rutin nebyly substráty této aryl sulfotransferasy.

Silybin A, silybin B, isosilybin A a isosilybin B byly sulfatovány pomocí purifikované AST DH. Obdobně jako u AST IV byl pozorován vliv stereomerie substrátu na rychlost jeho konjugace. Produkty těchto reakcí byly izolovány a charakterizovány jako silybin A 20-*O*-sulfát, silybin B 20-*O*-sulfát, isosilybin A 20-*O*-sulfát a isosilybin B 20-*O*-sulfát.

Pro sulfataci silybinu A, B, A&B, silychristinu A, silydianinu, 2,3-dehydrosilybinu, kvercetinu, isokvercitrinu a rutinu byl použit buněčný lyzát obsahující AST DH. Tyto reakce poskytly následující produkty: silybin A&B 20-*O*-sulfát, silybin A 20-*O*-sulfát, silybin B 20-*O*-sulfát, 2,3-dehydrosilybin 20-*O*-sulfát, 2,3-

dehydrosilybin 7, 20-*O*-disulfát, silychristin A 19-*O*-sulfát, silydianin 20-*O*-sulfát, isokvercitrin 4'-*O*-sulfát, rutin 4'-*O*-sulfát, neseperovatelná směs taxifolin 4'-*O*-sulfátu a taxifolin 3'-*O*-sulfátu, směs kvercetin 3'-*O*-sulfátu a kvercetin 4'-*O*-sulfátu (omezeně separovatelná pomocí analytické HPLC).

Pro každou metodu přípravy sulfatovaných produktů byla vyvinuta zvláštní metoda jejich purifikace a detekce pomocí HPLC. Všechny sulfatované metabolity byly chrakterizovány pomocí kombinace hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické resonance. Bylo zjištěno, že sulfatované produkty v závislosti na poloze sulfátu (3' a 4') vykazují charakteristické posuny v uhlíkových spektrech u katecholové skupiny. Toto zjištění v budoucnu usnadní strukturní určení sulfatovaných metabolitů podobných látek.

Tyto sulfatované metabolity mohou být následně použity pro *in vitro* studie biologické aktivity a dále jako autentické standardy při metabolických studiích *in vivo*.

6 Použitá literatura

1. Z. Chen, S. Zheng, L. Li and H. Jiang, *Curr Drug Metab*, 2014, **15**, 48-61.
2. R. Gažák, D. Walterová and V. Křen, *Curr Med Chem*, 2007, **14**, 315-338.
3. R. Schandalik, G. Gatti and E. Perucca, *Arzneimittelforschung*, 1992, **42**, 964-968.
4. M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto and G. L. Russo, *Biochem Pharmacol*, 2012, **83**, 6-15.
5. S. Sharma, A. Ali, J. Ali, J. K. Sahni and S. Baboota, *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, **22**, 1063-1079.
6. K. Valentová, J. Vrba, M. Bancířová, J. Ulrichová and V. Křen, *Food Chem Toxicol*, 2014, **68**, 267-282.
7. E. Middleton, Jr., C. Kandaswami and T. C. Theoharides, *Pharmacol Rev*, 2000, **52**, 673-751.
8. A. J. Day, F. Mellon, D. Barron, G. Sarrazin, M. R. Morgan and G. Williamson, *Free Radic Res*, 2001, **35**, 941-952.
9. K. C. Araujo, M. B. C. E. M. de, F. Pazini, M. C. Valadares and V. de Oliveira, *Food Chem Toxicol*, 2013, **51**, 93-96.
10. A. E. Weidmann, *Eur J Pharmacol*, 2012, **684**, 19-26.
11. C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert and C. Remesy, *Am J Clin Nutr*, 2005, **81**, 230S-242S.
12. V. Křen, P. Marhol, K. Purchartová, E. Gabrielová and M. Modrianský, *Curr Drug Metab*, 2013, **14**, 1009-1021.
13. L. Q. Wang and M. O. James, *Curr Drug Metab*, 2006, **7**, 83-104.
14. J. B. Mangold, D. J. McCann and A. Spina, *BBA-Protein Struct M*, 1993, **1163**, 217-222.
15. M. W. Duffel and W. B. Jakoby, *J Biol Chem*, 1981, **256**, 11123-11127.
16. G. Malojcic and R. Glockshuber, *Antioxid Redox Sign*, 2010, **13**, 1247-1259.
17. D. H. Kim, H. K. Yoon, M. Koizumi and K. Kobashi, *Chem Pharm Bull* 1992, **40**, 1056-1057.
18. M. A. van der Horst, J. F. T. van Lieshout, A. Bury, A. F. Hartog and R. Wever, *Adv Synth Catal*, 2012, **354**, 3501-3508.
19. M. A. van der Horst, A. F. Hartog, R. El Morabet, A. Marais, M. Kircz and R. Wever, *Eur J Org Chem*, 2015, DOI: DOI 10.1002/ejoc.201402875, 534-541.
20. S. R. Miranda, J. K. Lee, K. L. R. Brouwer, Z. M. Wen, P. C. Smith and R. L. Hawke, *Drug Metab Dispos*, 2008, **36**, 2219-2226.
21. P. Marhol, P. Bednar, P. Kolářová, R. Večera, J. Ulrichová, E. Tesařová, E. Vavříková, M. Kuzma and V. Křen, *J Funct Foods*, 2015, **14**, 570-580.

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF SCIENCE

Department of Biochemistry

Study program: Biochemistry

Field of study: Biochemistry



Summary of the Ph.D. Thesis

Enzymatic and metabolic transformation of silybin and its congeners

Mgr. Kateřina Purchartová

Supervisor: prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

Prague 2016

7 Introduction

Flavonoids are naturally occurring polyphenols, which play a prominent role in the human diet as abundant micronutrients, components of food supplements or herbal medicines¹.

Silymarin, a crude extract from milk thistle fruits (*Silybum marianum*, (L.) Gaertn., Asteraceae), is composed of flavonolignans (such as silybin, 2,3-dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, silydianin) and a flavonoid taxifolin. Most of them occur in nature in the form of two diastereoisomers in various proportions: silybin A and B, 2,3-dehydrosilybin A and B, isosilybin A and B, and silychristin A and B; only silydianin exists as a single stereomer. Silymarin flavonolignans possess strong antioxidant and hepatoprotective effects, but also anticancer, chemoprotective, dermatoprotective and hypocholesterolemic activities². The flavonolignans are barely soluble in water, the plasma concentrations after oral administration in humans were approx. in the scale of ng/ml³. Therefore, *in vivo* activity of flavonolignans is mainly influenced by their bioavailability. Metabolism, pharmacokinetics and possible drug-drug interactions of the flavonolignans represent another important topic. Despite numerous attempts, the exact structures of silymarin metabolites remain unexplored (except silybin).

Flavonols are a major class of flavonoids in the human diet, among them taxifolin¹⁰, quercetin⁴, quercetin glycosides rutin⁵ and isoquercitrin⁶, are largely used in food supplements. These flavonoids are generally considered to be potent antioxidants, radical scavengers and chemoprotectants having also anti-allergic, anti-inflammatory, antimicrobial or anticancer properties⁷. Although some quercetin metabolites were already described⁸, these were not fully characterized and there are controversies in the published data. Only scarce information about possible conjugation of taxifolin¹⁰, isoquercitrin⁶, and rutin⁹ was available so far.

Generally, the metabolism of flavonoids in humans starts in the stomach and in the small intestine and the post-absorption modifications occur in liver and in other

organs¹¹. Some of flavonoids and their derivatives (especially their glycosides) can pass up to the *caecum*, where they are cleaved and metabolized by intestinal microflora. The resorbed flavonoids are biotransformed mainly by the Phase II conjugation, preferably *via* sulfation, glucuronation or methylation by sulfotransferases, UDP-glucuronyltransferases, *N*-acetyltransferases, glutathione *S*-transferases, thiopurin-*S*-methyltransferases and *O*-methyltransferases¹².

Sulfotransferases convert xenobiotics and eubiotics into water-soluble and less toxic metabolites, facilitating their excretion into the bile or urine¹³. Sulfotransferases are present in various tissues including liver, kidney, brain, adrenals, gut and platelets¹³. The presence of a co-substrate, sulfate donor 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) is required for effective sulfate conjugation in eukaryotes. Aryl sulfotransferases (EC 2.8.2.1) catalyze the sulfation of a wide variety of phenolic-containing compounds¹⁴. Three isozymes (I, II, IV) were identified. Rat hepatic cytosolic isozyme IV is a major sulfotransferase. It displays the broadest substrate specificity of the isozymes. Its substrates include a wide variety of phenols, aromatic hydroxylamines and benzylic alcohols. AST IV can catalyze an 'exchange' reaction involving the PAPS-dependent transfer of sulfate from a donor (*e.g.* *p*-nitrophenyl sulfate) to an acceptor substrate¹⁵.

Prokaryotic aryl sulfotransferases catalyze the transfer of a sulfuryl group from phenolic sulfate esters onto a phenol acceptor by a PAPS-independent mechanism¹⁶. They can be mostly found in the periplasm of strains of δ - and ϵ -proteobacteria¹⁶ and are fundamental in the production of sulfated metabolites in mycobacteria; in the sulfation of a variety of phenols (bacteria from human intestinal tract)¹⁶ or phenolic antibiotics¹⁷. These enzymes exhibit broad substrate specificity and thus the majority of the natural substrates and their physiologic roles remain unknown. Aryl sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* (AST DH; EC 2.8.2.22) is a recombinant enzyme (ca 70 kDa) with a wide range of substrate specificity for phenolic and aliphatic substrates^{18,19}.

8 Aims of the study

- to find enzyme(s) suitable for sulfation of selected flavonolignans and flavonols
- to express the aryl sulfotransferases from rat liver and *D. hafniense* in *E. coli*
- to use these aryl sulfotransferases in the preparation of sulfated metabolites of silybin (A&B; **1&2**), silybin A (**1**), silybin B (**2**), isosilybin A (**3**), isosilybin B (**4**), 2,3-dehydrosilybin (A&B **5&6**), silychristin A (**7**), silydianin (**8**), quercetin (**9**), taxifolin (**10**), isoquercitrin (**11**) and rutin (**12**)
- to isolate, purify and fully characterize these metabolites

9 Materials and methods

The following methods were used in this thesis. The details of the individual experiments are described in the research publications; unless otherwise stated the experiments were performed by the author:

- isolation of plasmid DNA, agarose gel electrophoresis, restriction analysis of DNA
- transformation of various *E. coli* cell strains: BL21, BL21(DE3)Gold, BL21(DE3)Stars, BL21(DE3)pLys, Origami(DE3)
- co-transformation of *E. coli* cells with chaperons (GroEL/ GroES)
- cultivation of bacteria
- whole cells biotransformation
- Bradford protein assay
- enzyme activity assay
- enzyme immobilization
- sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
- analytical high performance liquid chromatography (method development: Ing. P. Marhol, Mgr. A. Křenková, Ph.D.)
- preparative high performance liquid chromatography (method development and measurements: (RNDr. D. Biedermann, Ph.D.)
- affinity chromatography
- gel permeation chromatography
- extraction, solid phase extraction, precipitation, analytical thin layer chromatography, preparative thin layer chromatography
- organic synthesis: methylation of isoquercitrin sulfate (prof. RNDr.L. Havlíček, CSc.); synthesis of silybin derivatives
- molecular cloning, ligation of DNA fragments, polymerase chain reaction (Dr. L. Engels)
- mass spectrometry (MS/MS fragmentation, HRMS - doc. RNDr. M. Šulc, Ph.D., doc. RNDr. J. Cvačka, Ph.D.)
- nuclear magnetic resonance (Mgr. H. Pelantová Ph.D., Ing. M. Kuzma, Ph.D.)

The source of chemicals, enzymes and microorganisms is described in detail in the research publications.

10 Results and discussion

Recombinant aryl sulfotransferase from rat liver (AST IV) could be easily expressed in *E. coli* BL21(DE3)Gold strains in TB medium. The active AST IV was obtained after 16 hours upon induction of IPTG (16 °C, 0.1 mM IPTG) and purification by gel permeation chromatography (3 U/ml). The *E. coli* BL21(DE3)Gold clones harboring the arylsulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* (AST DH) were the most active (28 500 U/mg). Purification of the enzyme was not necessary due to absent sulfatase activity in the media. Purified AST IV, whole AST IV producing cells and crude cell lysate containing AST DH were used for sulfation reaction of various substrates.

Sulfation of silymarin flavonolignans catalyzed by purified enzymes

AST IV was found to be strictly stereoselective as it sulfated exclusively silybin B (**2**), silybin A (**1**) was not the substrate of this aryl sulfotransferase. The attempts to scale-up the sulfation reaction with the purified AST IV failed due to several factors. The most important one was the extreme insolubility of the substrate. Furthermore the poor performance of the enzyme in volumes larger than 1 ml was identified and another limiting factor was the need to use an expensive cofactor PAP (3'-phosphoadenosine-5'-phosphate) during the reaction. Due to the above problems another concept of using resting *E. coli* cells expressing the rat liver AST IV was employed.

The first successfully sulfated substrates (catalyzed by AST DH) were optically pure silybin A (**1**) and B (**2**), isosilybin A (**3**) and B (**4**). The stereochemistry of respective substrates influenced strongly its conjugation kinetics analogously to the rat enzyme AST IV. Isosilybin A was conjugated faster and more efficiently than isosilybin B. Similarly silybin B was conjugated in larger extend than silybin A. After isolation and purification, silybin A 20-*O*-sulfate (**1a**, 20 mg, 58 %), silybin B 20-*O*-sulfate (**2a**, 22 mg, 62 %), isosilybin A 20-*O*-sulfate (**3a**, 14 mg, 57%), isosilybin

B 20-*O*-sulfate (**4a**, 11 mg, 50%) were obtained and fully characterized by MS and NMR.

Sulfation catalyzed by crude lysate or resting cells

Use of the resting microbial cells harboring AST IV noticeably improved the procedure by skipping laborious enzyme purification, the addition of expensive cofactor PAP and loss of activity. The only sufficient conversion of all tested substrates (**1-2**, **7-12**) was observed for silybin B (up to 48 %) and silybin sulfate could be isolated, purified with satisfactory yield (10 mg, 25%) and characterized. The experiment performed on the natural silybin (mixture of A&B) might be considered as an indirect proof that silybin A is not an inhibitor of AST IV, because we observed the same conjugation rate of silybin B in this case as with the pure silybin B. It is obvious that each silybin diastereoisomer has a specific route of Phase II metabolism^{20, 21}. Taxifolin (**10**) was another substrate utilized by AST IV. We isolated taxifolin monosulfate **10a** (1mg, 1.5%), which was characterized only by HRMS because of its paucity. We assume that it is taxifolin-3'-*O*-sulfate (**10a**), since another isolated product was identified to be quercetin-3'-*O*-sulfate **9a** (8 mg, 12%), which is plausibly an oxidation product of **10a**. We have speculated that the oxidation could be caused by cytochromes, therefore the respiration inhibitor - sodium azide - was added to the reaction mixture. Then the reaction was repeated, however no significant effect was observed and the same products (or none, respectively) were detected. We could not distinguish whether the oxidation of taxifolin skeleton occurred in the form of intact taxifolin or in the form of its sulfate. But taking into account the results obtained with quercetin, we assumed that taxifolin was sulfated first and then the sulfated product was oxidized to the respective quercetin sulfate. When silychristin A (**7**), silydianin (**8**) and quercetin (**9**) were tested as substrates in this AST IV catalyzed reaction consumption of *p*-nitrophenyl sulfate accompanied by formation of *p*-nitrophenol gave a clear evidence that sulfation reactions occurred. Despite our attempts no sulfated products were isolated and we found the recovery

of the substrate impossible. We assume that these substrates were probably sulfated but immediately metabolized by the cells; hence the sulfation reaction could not be proved. Isoquercitrin (**11**) and rutin (**12**) were not substrates transformed by this enzyme. Formation of either *p*-NP or any sulfated product was not detected. Isosilybin A and B (**3**, **4**) and 2,3-dehydrosilybin A&B (**5&6**) were not tested due to their paucity.

Due to the failure of our previous attempts to isolate and fully characterize sulfated silychristin A, silydianin, 2,3-dehydrosilybin, quercetin, isoquercetin and rutin catalyzed by AST IV from rat liver, the sulfation reaction was repeated with AST from *D. hafninese* (AST DH). Starting from respective substrate (**1-12**) respective substrate the silybin A&B 20-*O*-sulfate (**1a&2a**, 125 mg, 60 %), silybin A 20-*O*-sulfate (**1a**, 120 mg, 62 %), silybin B 20-*O*-sulfate (**2a**, 135 mg, 67 %), 2,3-dehydrosilybin A&B 20-*O*-sulfate (**5a&6a**, 10 mg, 25 %), 2,3-dehydrosilybin A&B 7,20-di-*O*-sulfate (**5b&6b**, 9 mg, 28 %); silychristin A 19-*O*-sulfate (**7a**, 100 mg, 57 %); silydianin 20-*O*-sulfate (**8a**, 90 mg, 75 %) isoquercitrin 4'-*O*-sulfate (**11a**, 120 mg, yield 69 %), rutin 4'-*O*-sulfate (**12a**, 90 mg, yield 53 %), inseparable mixture of taxifolin 4'-*O*-sulfate (**10b**) and taxifolin 3'-*O*-sulfate (**10c**, side product, ca 16 %) (190 mg, yield 75 %), mixture of quercetin 3'-*O*-sulfate (**9a**) and quercetin 4'-*O*-sulfate (**9b**, side product, ca 25% - critically separable by analytical HPLC) (90 mg, yield 47 %) were isolated, purified and fully characterized. The structure determination of all sulfated products (**1a-12a**) was achieved by the combination of HRMS or MS, ¹H-, ¹³C-NMR experiments. The typical patterns in NMR spectra (down field and up field shifts) were observed for catechol 3', and 4'-sulfates. The **Figure 1** shows the exact structures of the identified compounds.

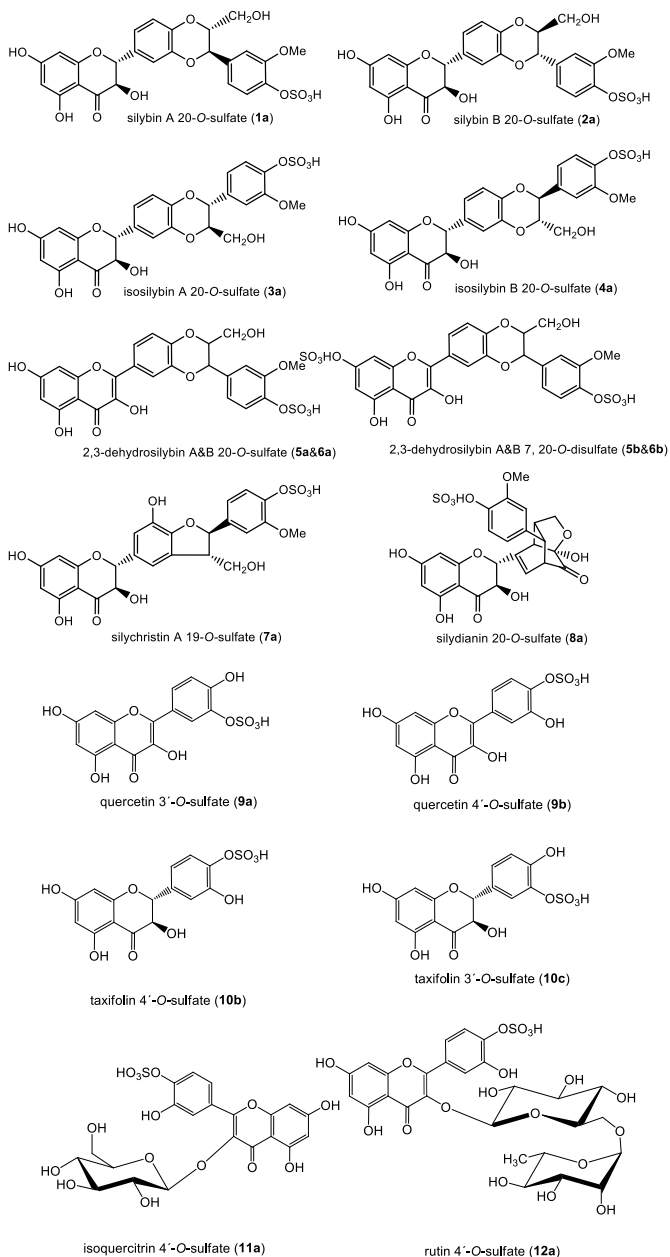


Figure1: Overview of fully characterized sulfated products

11 Conclusions

Two aryl sulfotransferases were chosen to fulfil the major aim of this thesis. The recombinant aryl sulfotransferase IV from rat liver (AST IV) and recombinant aryl sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* (AST DH) were employed in sulfation reaction of flavonolignans and flavonoids.

Both enzymes were expressed; AST IV from rat liver was purified. The purification of AST DH was not necessary due to high specific activity (28 500 U/mg) and non-detectable sulfatase activity in the media. AST IV was very unstable with low activity (3 U/ml). The concept of the resting *E. coli* cells expressing the rat liver AST IV employed in sulfation reactions together with crude cell lysate containing AST DH was finally chosen as the most effective.

The reaction conditions for each enzyme were optimized: for purified AST IV, purified AST DH, the whole cell biotransformation (AST IV) and crude cell lysate containing AST DH. When the resting *E. coli* cells expressing AST IV catalyzed the sulfation reaction, the only sufficient conversion of all tested substrates was observed for silybin B. Silybin B 20-*O*-sulfate was isolated, purified with satisfactory yield and characterized. Taxifolin yielded small amounts of taxifolin 3'-*O*-sulfate and quercetin 3'-*O*-sulfate. In the case of silychristin, silydianin and quercetin formation of *p*-NP was detected, but no sulfated products were isolated. Silybin A, isoquercitrin and rutin were not transformed by this enzyme.

Silybin A, silybin B, isosilybin A and isosilybin B were transformed by purified AST DH to silybin A 20-*O*-sulfate, silybin B 20-*O*-sulfate, isosilybin A 20-*O*-sulfate, isosilybin B 20-*O*-sulfate, which were fully characterized by MS and NMR.

Sulfation of silybin, silychristin, silydianin, 2,3-dehydrosilybin, quercetin, isoquercetin and rutin by AST DH (crude lysate) yielded silybin A&B 20-*O*-sulfate, silybin A 20-*O*-sulfate, silybin B 20-*O*-sulfate, 2,3-dehydrosilybin 20-*O*-sulfate, 2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfate, silychristin A 19-*O*-sulfate, silydianin 20-*O*-sulfate, isoquercitrin 4'-*O*-sulfate, rutin 4'-*O*-sulfate, inseparable mixture of taxifolin 4'-*O*-

sulfate and taxifolin 3'-*O*-sulfate, mixture of quercetin 3'-*O*-sulfate and quercetin 4'-*O*-sulfate.

The purification procedures for each preparation method and HPLC characterization for each sulfated product were developed. All isolated compounds were characterized by MS and NMR. Characteristic patterns in NMR spectra were identified for catechol 3'- and 4'- sulfates. These data will enable identification of analogous flavonoid metabolites.

The sulfated metabolites can be used for in vitro evaluation of biological activities and as authentic standards for metabolic studies in vivo.

12 References

1. Z. Chen, S. Zheng, L. Li and H. Jiang, *Curr Drug Metab*, 2014, **15**, 48-61.
2. R. Gažák, D. Walterová and V. Křen, *Curr Med Chem*, 2007, **14**, 315-338.
3. R. Schandalik, G. Gatti and E. Perucca, *Arzneimittelforschung*, 1992, **42**, 964-968.
4. M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto and G. L. Russo, *Biochem Pharmacol*, 2012, **83**, 6-15.
5. S. Sharma, A. Ali, J. Ali, J. K. Sahni and S. Baboota, *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, **22**, 1063-1079.
6. K. Valentová, J. Vrba, M. Bancířová, J. Ulrichová and V. Křen, *Food Chem Toxicol*, 2014, **68**, 267-282.
7. E. Middleton, Jr., C. Kandaswami and T. C. Theoharides, *Pharmacol Rev*, 2000, **52**, 673-751.
8. A. J. Day, F. Mellon, D. Barron, G. Sarrazin, M. R. Morgan and G. Williamson, *Free Radic Res*, 2001, **35**, 941-952.
9. K. C. Araujo, M. B. C. E. M. de, F. Pazini, M. C. Valadares and V. de Oliveira, *Food Chem Toxicol*, 2013, **51**, 93-96.
10. A. E. Weidmann, *Eur J Pharmacol*, 2012, **684**, 19-26.
11. C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert and C. Remesy, *Am J Clin Nutr*, 2005, **81**, 230S-242S.
12. V. Křen, P. Marhol, K. Purchartová, E. Gabrielová and M. Modrianský, *Curr Drug Metab*, 2013, **14**, 1009-1021.
13. L. Q. Wang and M. O. James, *Curr Drug Metab*, 2006, **7**, 83-104.
14. J. B. Mangold, D. J. McCann and A. Spina, *BBA-Protein Struct M*, 1993, **1163**, 217-222.
15. M. W. Duffel and W. B. Jakoby, *J Biol Chem*, 1981, **256**, 11123-11127.
16. G. Malojcic and R. Glockshuber, *Antioxid Redox Sign*, 2010, **13**, 1247-1259.
17. D. H. Kim, H. K. Yoon, M. Koizumi and K. Kobashi, *Chem Pharm Bull* 1992, **40**, 1056-1057.
18. M. A. van der Horst, J. F. T. van Lieshout, A. Bury, A. F. Hartog and R. Wever, *Adv Synth Catal*, 2012, **354**, 3501-3508.
19. M. A. van der Horst, A. F. Hartog, R. El Morabet, A. Marais, M. Kircz and R. Wever, *Eur J Org Chem*, 2015, DOI: DOI 10.1002/ejoc.201402875, 534-541.
20. S. R. Miranda, J. K. Lee, K. L. R. Brouwer, Z. M. Wen, P. C. Smith and R. L. Hawke, *Drug Metab Dispos*, 2008, **36**, 2219-2226.
21. P. Marhol, P. Bednar, P. Kolářová, R. Večera, J. Ulrichová, E. Tesařová, E. Vavříková, M. Kuzma and V. Křen, *J Funct Foods*, 2015, **14**, 570-580.

Curriculum vitae

Personal

Name: Kateřina Purchartová, Mgr.

Address: Patočkova 1706/103, Prague 169 00, Czech Republic

Email address: katerina.purchartova@gmail.com

Work experience

- **2015 to date:** R&D specialist, Medicem, Kamenné Žehrovice, Czech Republic
– head Dr. Vladimír Stoy
- **2007-2014:** Laboratory of biotransformation and biocatalysis, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences – head Prof. Vladimír Křen
Projects:
 - Enzymatic and metabolic transformation of silybin and its congeners (dissertation thesis)
 - Chemoenzymatic separation of diastereoisomers of silybin (diploma thesis)

Education

- 2010 Mgr. Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Science
- 2008 Bc. Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Science

Language skills

- Czech (native)
- English (C1), certificate FCE (2012)
- Italian (B2)
- French (A2)

Awards:

- The best diploma thesis award 2010 - the Institute of Microbiology

Other skills

- driving license B
- certificates:
 - Wet lab on phacoemulsification (ESCRS, Athens, GR, 2016)
 - Wet lab on phacoemulsification (ESCRS, Barcelona, ES, 2015)
 - Light scattering University (MALS) (Dernbach, GE, 2015)
 - Modern trends in gas chromatography (Prague, 2015)
 - Time management (Charles University, Prague, CZ, 2013)

External fellowships:

- **2014** Academic exchange with Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, via Mario Bianco 9 I, 20131 Milano, supervisor Dr. Sergio Riva
- **2012** COST STSM at National Food Institute, Technical University of Denmark Soltofts Plads Building 221, Kg. Lyngby 2800, Denmark, supervisor Dr. Caroline P. Baron
- **2009** Academic exchange with Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, via Mario Bianco 9 I, 20131 Milano, supervisor Dr. Daniela Monti
- **2009** summer school in Certosa di Pontignano, Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry. Siena, Italy

List of publications

Articles related to the presented thesis

Marhol, P., Hartogb, A.F., van der Horstb, M.A., Weverb R., **Purchartová, K.**, Fuksová, K., Kuzma, M., Cvačka, J., Křen, V.: Preparation of silybin and isosilybin sulfates by sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense*, *J Mol Catal B: Enzym*, 2013, **89**, 24-7.

Purchartová, K., Engels, L., Marhol, P., Šulc, M., Kuzma, M., Slámová, K., Elling, L., Křen, V.: Enzymatic preparation of silybin phase II metabolites: sulfation using aryl sulfotransferase from rat liver. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97**, 10391-8.

Purchartová, K., Valentová, K., Pelantová, H., Marhol, P., Cvačka, J., Havlíček, L., Křenková, A., Vavříková, E., Biedermann, D., Chambers, C. S., Křen: Prokaryotic and Eukaryotic Aryl Sulfotransferases: Sulfation of quercetin and its derivatives. *Chem cat chem*, 2015, **7**, 3152-3162.

Roubalová, L., **Purchartová, K.**, Papoušková, B., Vacek, J., Křen, V., Ulrichová, J., Vrba, J.: Sulfation modulates the cell uptake, antiradical activity and biological effects of flavonoids *in vitro*: An examination of quercetin, isoquercitrin and taxifolin. *Bioorg Med Chem*, 2015, **23**, 5402-09.

Valentová, K., Purchartová, K., Marhol, P., Pelantová, H., Cvačka, J., Biedermann, D., Křen, V. Prokaryotic and eukaryotic aryl sulfotransferases: Sulfation of unexplored flavonolignans from silymarin. *Int J Mol Sci (manuscript in preparation)*.

Reviews related to the presented thesis

Theodosiou, E., **Purchartová, K.**, Stamatis, H., Kollis, F., Křen V.: Bioavailability of silymarin flavonolignans: Drug formulations and biotransformation. *Phytochem Rev*, 2013, **13**, 1-18.

Křen, V., Marhol, P., **Purchartová, K.**, Gabrielová, E., Modrianský M.: Biotransformation of silybin and its congeners. *Curr Drug Metab*, 2013, **14**, 1009-21.

Other research articles

Vavříková, E., Gavezzotti, P., **Purchartová, K.**, Fuksová, K., Biedermann, D., Kuzma, M., Riva, S., Křen, V.: Regioselective alcoholysis of silychristin acetates catalyzed by lipases. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**, 11983-95.

Charrier, C., Azerad, R., Marhol, P., **Purchartová, K.**, Kuzma, M., Křen, V. Preparation of silybin phase II metabolites: *Streptomyces* catalyzed glucuronidation, *J Mol Catal B: Enzym*, 2014, **102**, 167-173.

Purchartová, K., Marhol, P., Gažák, R., Monti, D., Riva, S., Kuzma, M., Křen, V.: Regioselective alcoholysis of silybin A and B acetates with lipases. *J Mol Catal B: Enzym*, 2011, **71**, 119-123.

Gažák, R., **Purchartová, K.**, Marhol, P., Živná, L., Sedmera, P., Valentová, K., Kato, N., Matsumura, H., Kaihatsu, K., Křen, V.: Antioxidant and antiviral activities of silybin fatty acid conjugates. *Eur J Med Chem*, 2010, **45**, 1059-67.

Monti, D., Gažák, R., Marhol, P., Biedermann, D., **Purchartová, K.**, Fedrigo, M., Riva, S., Křen, V.: Enzymatic kinetic resolution of silybin diastereoisomers. *J Nat Prod*, **73**, 2010, 613-619.

Gažák, R., Marhol, P., **Purchartová, K.**, Monti, D., Biedermann, D., Riva, S., Cvak, L., Křen, V.: Large-scale separation of silybin diastereoisomers using lipases. *Proc Biochem*, 2010, **10**, 1657-63.

Theodosiou, E., Katsoura, M. H., Loutrari, H., **Purchartová, K.**, Křen, V., Kolisis, F. N., Stamatis, H.: Enzymatic preparation of acylated derivatives of silybin in organic and ionic liquid media and evaluation of their antitumor proliferative activity. *Biocat Biotrans*, 2009, **27**, 161–9.

Křen, V., Gažák, R., **Purchartová, K.**, Marhol, P., Biedermann, D., Sedmera, P.: Chemoenzymatic preparative separation of silybins A and B *J Mol Catal*

B: *Enzym*, 2009, **61**, 247–251.

Oral presentations:

Purchartová K.: Enzymová příprava, charakterizace a vlastnosti sulfatovaných derivátů flavonoidů a flavonolignanů. Doktorandský seminář, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Prague (23.11.2015)

Purchartová K.: Comparison of aryl sulfotransferases - metabolic studies of flavonoids and flavonolignans. 4th International Conference on Novel Enzymes, Gent, Belgium (14. - 17.10. 2014)

Purchartová K.: Regioselective alcoholysis of silybin acetates with lipases. Annual seminar of project GACR 305/09/H008 „Preparation, biotransformation and optimization of compounds with antitumor and antimicrobial effects“, Nové Hradky (9. – 11.6.2011)

Poster presentations:

Purchartová K., Valentová K., Křenková A., Marhol P., Pelantová H., Kuzma M., Cvaka J., Biedermann D., Křen V.: Arylsulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* for the preparation of sulfated metabolites of flavonoids and flavonolignans. 3rd WG Meeting of the COST Action FA1403 POSITIVE, Bucharest, Romania (15. - 17. 3. 2016)

Purchartová K., Valentová K., Křenková A., Marhol P., Pelantová H., Kuzma M., Cvaka J., Biedermann D., Křen V.: Preparation of sulfated metabolites of flavonoids and flavonolignans by aryl sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense*, 7th International Conference on Polyphenols and Health, ICPH 2015, Tours, France (27. - 30.10.2015)

Purchartová K., Valentová K., Křenková A., Marhol P., Pelantová H., Křen V.: Sulfation of quercetin and its derivatives, Biotrans 2015, Vienna Austria (26. - 30.7. 2015)

Purchartová K., Marhol P., Wever R., Křen V.: Preparation of sulfated flavonoid metabolites by sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense*, Biocat 2014, Hamburg, Germany (31.8. - 4.9. 2014)

Purchartová K., Marhol P., Hartog, A.F., van der Horst, M.A., Wever R., Křen V.: Preparation of silybin and isosilybin sulfates by sulfotransferase from *Desulfotobacterium hafniense*, 7th ISANH Congress on Polyphenols Applications, Bonn, Germany (6. - 7.6. 2013)

Purchartová K., Engels, L., Marhol, P., Slámová, K., Elling, L., Křen, V.: Enzymatic preparation of silybin metabolites: sulfation using aryl sulfotransferase from rat liver, Biotrans 2013, Manchester, United Kingdom (21. - 25.7. 2013)

Purchartová K., Marhol P., Biedermann D., Engels L., Elling L., Křen V.: Enzymatic preparation of silybin metabolites, Biocat 2012, Hamburg, Germany (2. - 5.9. 2012)

Purchartová K., Marhol P., Gažák R., Monti D., Riva S., Kuzma M., Křen V.: Regioselective alcoholysis of silybin A and B acetates with lipases, Biotrans 2011, Sicily, Italy (2. - 6.10. 2011)

Purchartová K., Marhol P., Biedermann D., Elling L., Křen V.: Silybin metabolites: Chemical and enzymatic preparation, 5th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH), Sitges (Barcelona) Spain (17. - 20.10. 2011)

Purchartová K., Monti D., Gažák R., Marhol P., Biedermann D., Riva S., Křen V.: Enzymatic kinetic resolution of silybin diastereoisomers. ESF-COST High-level research conference, Natural products chemistry, Biology and Medicine III, Aquafredda di Maratea, Italy (5.9. – 10.9.2010)

Purchartová K., Křen V., Marhol P., Gažák R., Biedermann D.: Flavonoid glycosylation: a feasible way to obtain pure compounds, Vitamins, nutrition, diagnostics 2009, Brno, Czech republic (31.8. - 2.9.2009)

Purchartová K., Gažák R., Marhol P., Biedermann D., Křen V.: Flavonoid glycosylation: feasible way to obtain optically active compounds, AngioKem, COST CM0602 – Joint Meeting of WG1 and WG2, Prague, Czech republic (3.4.- 4.4.2009)

Purchartová K., Gažák R., Marhol P., Biedermann D., Křen V.: Flavonoid glycosylation: feasible way to obtain optically active compounds, COST Training School - Cascade Chemoenzymatic Processes – New synergies between

chemistry and biochemistry, Certosa di Pontignano Congress Centre – Uni. of Siena, Italy (28.4 – 4.5. 2009)

Purchartová K., Gažák R., Křen V., Antioxidační vlastnosti esterů silybinu s masnými kyselinami, XXI. Biochemický sjezd ČSBMB, České Budějovice, Czech republic (14.9. – 17. 9. 2008)

Purchartová K., Gažák R., Živná L., Valentová K., Křen V. Antioxidant capacity of silybin conjugates with fatty acids, Vitamins 2007 – Nutrition and Diagnostics, Prague, Czech Republic (19 - 21. 9. 2007)