

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Disertační práce

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra Biochemických věd

ROLE REDUKTAS V NÁDOROVÉM ONEMOCNĚNÍ

Disertační práce

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové, 2009

Mgr. Lucie Škarydová

Výzkumné projekty a jejich výsledky popsané v této disertační práci byly prováděny na Katedře Biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a byly podpořeny granty GAUK 45508/C/2008, GAČR 303/07/0994 a GAUK 108/2006/C.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. Vladimíru Wsólvi za tuto velice zajímavou, ale také poměrně obtížnou práci. Všem pracovníkům katedry biochemických věd za vstřícné pracovní prostředí a zejména paní Alence Pakostové za pomoc s čímkoliv. Také bych chtěla poděkovat svým nejbližším spolupracovníkům, PGS studentům Romaně, Adamovi a Lucce za společné překonávání mnoha problému při purifikacích a ostatním obyvatelům dětského pokoje za dobrou náladu. Dík patří také Mgr. Martinu Hubálkovi, Ph.D. za analýzy vzorků na hmotnostním spektrometru.

Chtěla bych poděkovat i svým přátelům a kamarádům, ale největší dík patří mým rodičům, za dlouholetou podporu při studiu a také příteli Lukášovi, za pomoc při grafickém zpracování obrázků, ale hlavně za to že ho mám.

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 řádně citovány.

V Hradci Králové 26.10.2009

Mgr. Lucie Škarydová

Seznam zkratek

11 β -HSD1 - 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

15dPGJ₂ - 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂

17 β -HSD - 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa

20 α -HP - 20 α -hydroxyprogesteron

3-Adiol - 5 α -androstano-3,17 β -diol

4-Adion - 4-androsten-3,17-dion

5-Adiol - 5 α -androsten-3 β ,17 β -diol

6-AHA - 6-aminohexanová kyselina

9 α ,11 β -PGF₂ - 9 α ,11 β -prostaglandin F₂

AA - akrylamid

ADH - alkoholdehydrogenasy

AFB1 - aflatoxin B1

AKR - aldo-ketoreduktasy

ALDH - aldehyddehydrogenasy

APS - persíran amonný

AR - androgenní receptor

B - benfluron

Bis-AA - bis-akrylamid

BN-PAGE – „blue-native“ polyakrylamidová elektroforéza

C4E8 - etylenglykol monododecyleter

C12E8 - oktaetylenglykol monododecyleter

CAR - konstitutivní androstanový receptor

CBR1 - karbonylreduktasa 1

CN-PAGE – „clear-native“ polyakrylamidová elektroforéza

CYP450 - cytochrom P450

DAU - daunorubicin

DDM - dodecyl- β -maltosid

DHB - dihydroxybenfluron

DHEA - dehydroepiandrosteron

DHEA-S - dehydroepiandrosteron sulfát

DHO - 11-dihydrooracin

DHT - dihydrotestosteron

DOX - doxorubicin

E1 - estron

E1S - estron sulfát

E2 - estradiol

ER - endoplasmatické retikulum

EsR - estrogení receptor

GR - glutathionreduktasa

GSH - glutathion

GSSH - glutathiondisulfid

HIC - hydrofobně-interakční chromatografie

HMG-CoA-reduktasa - 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA-reduktasa

HSD - hydroxysteroiddehydrogenasa

IEX - iontově-výměnná chromatografie

MDR - dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem

MS - hmotnostní spektrometrie

Nitro-PAH - nitrované polyaromatické uhlovodíky

NNAL - 4-metylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanonol

NNK - 4-metylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon

NSAID - nesteroidní antiflogistika

P - progesteron

PAGE - polyakrylamidová elektroforéza

PAH - polyaromatické uhlovodíky

PGD₂ - prostaglandin D₂

PGF_{2α} - prostaglandin F_{2α}

PGH₂ - prostaglandin H₂

PPAR - receptor aktivovaný peroxisomovými aktivatory

PR - progesteronový receptor

PXR - pregnan X receptor

QR - chinonreduktasy

RA - kyselina retinová

RAR - receptor pro kyselinu retinovou

RXR - retinoid X receptor

S.D. - směrodatná odchylka

SDR - dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

SDS - dodecylsulfát sodný

TCA - trichloctová kyselina

TR - thioredoxinreduktasa

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Metabolismus karbonylových sloučenin	3
2.2	Karbonylreduktasy.....	5
2.2.1	Aldo-keto reduktasy (AKR)	5
2.2.1.1	Nomenklatura AKR nadrodiny	5
2.2.1.2	Lidské AKR proteiny	6
	AKR1A1 - aldehydreduktasa.....	6
	AKR1B1 - aldosareduktasa.....	6
	AKR1B10 - aldosareduktasa tenkého střeva	7
	AKR1C1-C4 - hydroxysteroiddehydrogenasy	7
	AKR1D1 - Δ^4 -3-ketosteroid-5 β -reduktasa	7
	AKR7A2-A3 - aflatoxinreduktasy	8
2.2.2	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem	8
2.2.2.1	Nomenklatura SDR nadrodiny	9
2.2.2.2	Lidské SDR proteiny	9
	Karbonylreduktasa 1	10
	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1	10
	Retinoldehydrogenasy	12
	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy	12
2.2.3	Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem	13
2.3	Role karbonylreduktas v nádorovém onemocnění	14
2.3.1	Hormon-dependentní nádorová onemocnění	14
2.3.1.1	Hormon-dependentní nádory prsu	15
2.3.1.2	Hormon-dependentní nádory endometria	17
2.3.1.3	Hormon-dependentní nádory prostaty	18
2.3.1.4	Shrnutí role karbonylreduktas v hormon-dependentních nádorech.....	19
	Fytoestrogeny	19
2.3.2	Nádory nezávislé na hormonech	20
2.3.2.1	Role karbonylreduktas v metabolismu prostaglandinů	20
2.3.2.2	Role karbonylreduktas v metabolismu kyseliny retinové	21
2.3.3	Metabolismus karcinogenních látek	22
2.3.3.1	Metabolismus tabák-specifického karcinogenu NNK.....	22
2.3.3.2	Metabolismus aflatoxinu B1	24
2.3.3.3	Metabolismu polyaromatických uhlovodíků	25
2.3.4	Metabolismus protinádorových léčiv	25
2.3.4.1	Antracyklinová cytostatika	25
2.3.4.2	Metabolismus oracinu.....	27

2.3.4.3	Metabolismus benfluronu.....	29
2.3.5	Shrnutí role karbonyl reduktas v nádorovém onemocnění	29
3	Cíl práce	30
4	Experimentální část	31
4.1	Materiálové vybavení	31
4.1.1	Použitý materiál	31
4.1.2	Přístrojové vybavení	33
4.2	Inhibice enzymu AKR1C3 sloučeninami ze skupiny flavonoidů	33
4.2.1	Klonování, exprese a purifikace rekombinantní AKR1C3	33
4.2.2	Purifikace AKR1C1 a AKR1C2	34
4.2.3	Stanovení enzymové aktivity AKR1C3.....	34
4.2.4	Stanovení inhibice enzymu AKR1C3 flavonoidy	35
4.2.5	Stanovení selektivity vybraných inhibitorů pro AKR1C3	35
4.2.6	Určení typu inhibice	36
4.2.7	HPLC metoda pro stanovení redukční aktivity	36
4.2.8	Výpočet inhibiční konstanty	36
4.3	Purifikace a charakterizace nové mikrosomální karbonylreduktasy účastnící se metabolismu xenobiotik.....	36
4.3.1	Příprava lidských jaterních mikrosomů	36
4.3.2	Solubilizace mikrosomů a její optimalizace.....	37
4.3.3	Purifikace nové mikrosomální karbonylreduktasy	37
4.3.3.1	Odsolení solubilizovaných mikrosomů.....	37
4.3.3.2	První purifikační krok - separace na Q-sefaroze	38
4.3.3.3	Optimalizace druhého purifikačního kroku.....	38
4.3.4	Stanovení enzymové aktivity a enzymové stereospecifity	38
4.3.5	Stanovení preference pro kofaktor.....	39
4.3.6	Stanovení enzymové kinetiky	39
4.3.7	HPLC podmínky pro stanovení redukční aktivity	39
4.3.8	HPLC podmínky pro stanovení enzymové stereospecifity.....	40
4.3.9	Stanovení koncentrace proteinů	40
4.3.10	Stanovení stability mikrosomů a purifikovaných frakcí.....	40
4.3.11	Elektroforéza.....	40
4.3.11.1	SDS-elektroforéza	40
4.3.11.2	Nativní elektroforéza 1	41
4.3.11.3	Nativní elektroforéza 2.....	41
4.3.11.4	Clear-native elektroforéza.....	42
4.3.12	Barvení elektroforetických gelů	43
4.3.12.1	Barvení stříbrem dle Ohsawy	43
4.3.12.2	Barvení stříbrem dle Chevallet	43
4.3.12.3	Barvení na redukční aktivitu	43

5	Výsledky a diskuse	44
5.1	Inhibice enzymu AKR1C3 sloučeninami ze skupiny flavonoidů	44
5.1.1	Screening inhibičních účinků flavonoidů na AKR1C3	44
5.1.2	Určení IC ₅₀ vybraných inhibitorů AKR1C3 a typu inhibice	45
5.1.3	Stanovení selektivity inhibice AKR1C3	47
5.1.4	Shrnutí a diskuse výsledků inhibice AKR1C3 flavonoidy	48
5.2	Purifikace a charakterizace nové mikrosomální karbonylreduktasy účastnící se metabolismu xenobiotik	49
5.2.1	Optimalizace solubilizace	50
5.2.2	Purifikace nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy	52
5.2.2.1	První krok purifikace - separace na Q-sefaroze	53
5.2.2.2	Optimalizace druhého purifikačního kroku	55
5.2.2.3	Shrnutí purifikace	58
5.2.3	Charakterizace částečně purifikované frakce	59
5.2.3.1	Stanovení preference ke kofaktoru	59
5.2.3.2	Stanovení kinetických parametrů	60
5.2.4	Stanovení stability mikrosomů a purifikovaných frakcí	61
5.2.5	Elektroforéza	63
5.2.5.1	Nativní elektroforéza	63
5.2.5.2	SDS elektroforéza	66
5.2.6	Shrnutí výsledků purifikace a charakterizace nové mikrosomální karbonylreduktasy účastnící se metabolismu xenobiotik	68
6	Závěr	71
7	Souhrn	73
8	Summary	75
9	Literatura	77
10	Přílohy	93

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v civilizovaných zemích hned po kardiovaskulárních onemocněních. S tím jak se prodlužuje střední délka života lidí a zhoršuje kvalita životního prostředí, dochází stále k častějšímu výskytu nádorů. Cílem veškerých opatření je časná diagnóza přítomnosti nádoru v organismu a následně účinná léčba, ale ani jedno zatím není na takové úrovni, jak bychom si představovali. Nádorové onemocnění je multifaktoriální onemocnění, k jehož rozvoji je nutný mnohastupňový proces, který zahrnuje nahromadění mutací v genech, které kontrolují proliferaci, diferenciaci a zánik buněk. Výsledkem je to, že se buňka vymkne kontrole a začne se nekontrolovaně množit a vytvářet nádorovou tkáň. Existuje velké množství typů nádorů, které mohou být odvozeny prakticky od jakékoliv buňky organismu, a příčin, proč se určitá buňka vymkne buněčné kontrole ještě víc. Výzkum nádorových onemocnění je tedy velice komplexní a tím i zdlouhavý.

Důležitou roli v rozvoji a léčbě nádorových onemocnění hrají enzymy. Ať už to jsou ty, které se podílí na signálních drahách v buňce, nebo ty, které jsou zodpovědné za biotransformaci karcinogenů a také látek používaných pro léčbu nádorových onemocnění. Dlouho opomíjenou skupinou enzymů nejen ve výzkumu nádorových onemocnění byly redukční enzymy, ale jak se dnes ukazuje, hrají významnou roli jak v rozvoji určitých typů nádorových onemocnění, tak i v metabolismu karcinogenních látek a protinádorových léčiv.

2 Teoretická část

Člověk je aerobní organismus a dlouho se předpokládalo, že v jeho metabolismu mají význam zejména oxidační reakce. Jak metabolismus eobiotik, tak biotransformace xenobiotik byly intenzivně studovány zejména z tohoto úhlu pohledu. V posledních desetiletích se výzkum ubíral i směrem redukčních reakcí a přinesl spoustu zajímavých poznatků. Důležité je zjištění, že redukční enzymy je nutné považovat za významnou součást biochemických pochodů jak u nižších organismů, tak u člověka.

Je možné nalézt celou řadu redukčních enzymů, které jsou pro život člověka, ale i dalších organismů, naprosto nezbytné. Mezi takové patří sukcinát-CoQ-reduktasa, NADH-CoQH₂-reduktasa nebo CoQH₂-cytochrom-c-reduktasa, které jsou součástí multiproteinových komplexů účastnících se transportu elektronů ve vnitřní membráně mitochondrií. HMG-CoA-reduktasa je zase důležitým enzymem v dráze syntézy cholesterolu. Katalyzuje redukci 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA (HMG-CoA) na mevalonát a tato reakce je považována za rychlost limitující krok syntézy. Inhibitory toho enzymu, statiny, jsou klinicky využívaná léčiva při léčbě hypercholesterolémie (Murray et al. 1993). Další redukční enzymy se podílejí na syntéze mastných kyselin. Velice důležitou reduktasou je glutathionreduktasa (GR), podílejší se na ochraně organismu před oxidačním stresem. Glutathion (GSH) se účinkem volných kyslíkových radikálů oxiduje na glutathiondisulfid (GSSH). Ten je pak účinkem GR zpět redukován na GSH, čímž zajišťuje dostatečnou kapacitu pro ochranu před oxidačním stresem a udržení redoxního stavu buňky (Voet and Voet 2004). 5 α -reduktasa, která přeměňuje testosteron na dihydrotestosteron, je naprosto nebytná pro správný embryonální vývoj zevního genitálu samců a také hraje roli v nádorovém onemocnění prostaty (Zhu and Imperato-McGinley 2009). Výše uvedené enzymy jsou pouze příklady, existuje celá řada dalších redukčních enzymů, které mají neméně důležité postavení v přeměnách endogenních látek či xenobiotik u člověka.

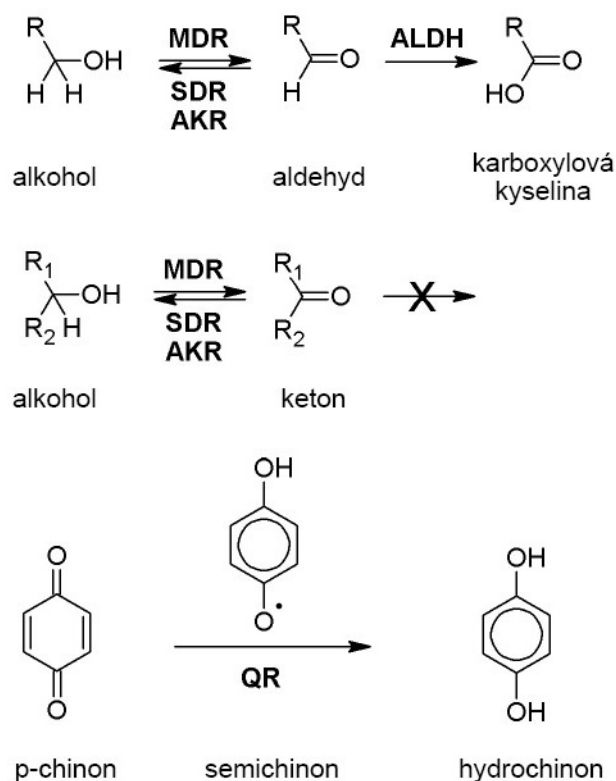
Protože je výzkum redukčních enzymů na naší katedře zaměřen zejména na karbonylreduktasy a výsledky prezentované v této disertační práci se budou též týkat těchto enzymů, budu se i v teoretické části disertační práce zaměřovat převážně na jejich význam v nádorovém onemocnění. Nicméně je prokázáno, že v rozvoji či léčbě nádorového onemocnění mohou hrát roli i jiné redukční enzymy. Příkladem může být thioredoxinreduktasa (TR), která redukuje disulfidy thioredoxinů a je tak součástí důležité signální dráhy ovlivňující proliferaci a apoptózu buňky. Byla prokázána zvýšená exprese TR v řadě nádorových linií a také v lidských nádorech, která koreluje se zvýšenou agresivitou daných nádorových buněk. TR se pravděpodobně účastní procesu zvýšení ochrany nádorových buněk před oxidačním stresem a jejich zvýšené proliferace, a proto může být TR

vhodným cílem protinádorové terapie (Nguyen et al. 2006). Jiným příkladem mohou být nitrované polyaromatické uhlovodíky (nitro-PAH), které pro svou aktivaci a uplatnění svého genotoxického efektu potřebují aktivaci pomocí redukce nitroskupiny na N-hydroxyarylaminy. Tato redukční reakce může být obecně katalyzována cytosolickými reduktasami jako je xantinoxidasa nebo aldehydoxidasa. Mutagenní a karcinogenní nitro-PAH 3-nitrobenzantron, obsažený ve výfukových plynech dieslových motorů, je aktivován nitroredukcí katalyzovanou NADPH-Cytochrom P450 reduktasou a samotným cytochromem P450, čímž se tyto enzymy také mohou podílet na rozvoji nádorového onemocnění (Arlt et al. 2003).

2.1 Metabolismus karbonylových sloučenin

Karbonylová redukce je reakce, při které dochází k přeměně aldehydových nebo ketonových skupin na hydroxylové skupiny. Tento typ reakce je poměrně důležitý, protože řada endogenních látek jako jsou pohlavní hormony, glukokortikoidy, žlučové kyseliny, cukry a eikosanoidy obsahují karbonylové skupiny. Vedle těchto sloučenin je možné karbonylové skupiny nalézt také v léčivech, složkách potravy, látkách znečišťujících životní prostředí a také v produktech lipidové peroxidace. Karbonylové skupiny často určují biologickou aktivitu daných molekul. Například karbonylová léčiva jsou často deaktivována právě účinkem enzymů redukcujících jejich karbonylovou skupinu.

Metabolický osud ketonů je jednoduchý, protože mohou být pouze redukovány na příslušný sekundární alkohol. Proti tomu aldehydy mohou být buď redukovány na primární alkohol, nebo také oxidovány na příslušnou karboxylovou kyselinu. Chinony, které se též řadí ke karbonylovým sloučeninám, jsou přeměňovány jednoelektronovou redukcí na toxický semichinon radikál, který pak může reagovat s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu. Dvouelektronovou redukcí pak vzniká hydrochinon a dochází tak k detoxikaci chinonů (Oppermann 2007; Oppermann and Maser 2000). Obecně platí, že enzymy podílející se na metabolismu karbonylových sloučenin lze rozdělit do čtyř skupin - dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), aldo-ketoreduktasy (AKR) a aldehyddehydrogenasy (ALDH). Navíc existuje speciální skupina metabolizující pouze chinony chinon reduktasy (QR) (Barski et al. 2008; Bianchet et al. 2008; Jaiswal 2000; Jez et al. 1997; Jornvall et al. 1995; Nordling et al. 2002; Oppermann et al. 2003; Persson et al. 2008; Vasiliou et al. 2000). Úloha jednotlivých enzymových nadrovin v metabolismu karbonylových sloučenin je znázorněna na obr. 1.



Obr. 1 - Metabolická konverze sloučenin obsahující karbonylovou skupinu. Na oxidaci alkoholů se podílí enzymy z nadrodiny MDR, zatímco na redukci aldehydů a ketonů enzymy ze dvou nadrodin - SDR a AKR. Aldehydy mohou být navíc oxidovány pomocí ALDH na karboxylové kyseliny. QR se podílí výlučně na redukci chinonů a nikoliv aldehydů a ketonů

Redukce karbonylových látek vykazuje zajímavý rys - pokud je redukován asymetrický keton, vzniká chirální centrum a metabolit se může vyskytovat ve formě dvou enantiomerů. Takový chirální metabolismus je popsán pro celou řadu pro-chirálních karbonylových sloučenin. Příkladem mohou být xenobiotika jako je haloperidol, pentoxifylin, NNK a oracin (Rosemond and Walsh 2004). Je nutné zde zmínit, že nejen při metabolismu karbonylových látek může vznikat nové chirální centrum. Takový metabolismus je popsán i pro oxidaci sulfidických látek nebo při hydroxylaci některých sloučenin. Důležitým termínem je zde enzymová stereospecifita, která popisuje schopnost daného enzymu tvořit určitý poměr enantiomerů metabolitu. Přičemž enzymová stereospecifita se pro jednotlivé enzymy může lišit a být tak jednou z jejich důležitých charakteristik. Tuto charakteristiku je možné využít pro hledání nových enzymů, které se podílí na metabolismu daných pro-chirálních látek. Na toto téma máme připravený souhrnný článek, který bude v blízké době publikován. I naše pracovní skupina tuto charakteristiku využívá při hledání nové mikrosomální karbonylreduktasy, jak bude popsáno v experimentální části a výsledcích (část 4.3 a 5.2).

2.2 Karbonylreduktasy

Karbonylreduktasy jsou převážně NADPH-dependentní enzymy, které jsou hojně rozšířené, a pro které je charakteristická široká substrátová specifita. Podílí se na metabolismu jak eobiotik, tak xenobiotik. Jak je patrné z obr. 1, na redukci karbonylových sloučenin se podílí pouze enzymy patřící do dvou nadrodin - dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-ketoreduktasy (AKR). Zástupci rodiny dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) katalyzují hlavně oxidaci alkoholů na karbonylové sloučeniny a je o nich krátce pojednáno v části 2.2.3.

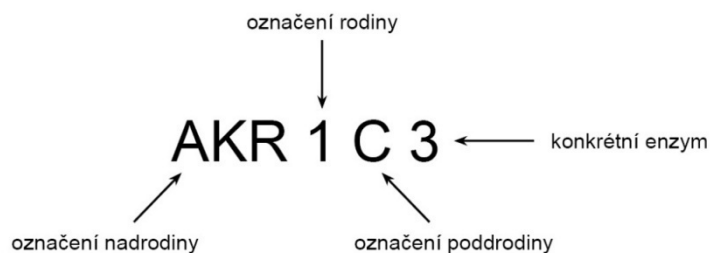
2.2.1 Aldo-keto reduktasy (AKR)

Aldo-ketoreduktasy (AKR) jsou skupinou asi 160 NAD(P)(H)-dependentních oxidoreduktas, které lze najít prakticky u všech forem života. Typický zástupce je monomerní cytosolický protein obsahující 320 aminokyselin se strukturou $(\alpha/\beta)_8$ -soudku. Aktivní místo se nachází na C-terminální části proteinu a skládá se z katalytické tetrády aminokyselin (tyrosin, lysin, aspartát a histidin). Charakteristickým rysem je široká substrátová specifita. AKR se podílí na metabolismu řady eobiotických i xenobiotických substrátů jako jsou monosacharidy, steroidy, prostaglandiny, polyaromatické uhlovodíky, alifatické aldehydy a léčiva obsahující ketonovou skupinu (Hyndman et al. 2003; Jez and Penning 2001). Veškeré novinky, které se o enzymech z nadrodiny AKR objeví, jsou uvedené na domovské internetové stránce AKR nadrodiny (<http://www.med.upenn.edu/akr/>).

I když je na začátku uvedeno, že AKR patří mezi oxidoreduktasy, bylo prokázáno, že katalyzují zejména redukci aldehydů a ketonů. Jako alkoholdehydrogenasy jsou relativně neúčinné (Pollak et al. 2007). To souvisí i s distribucí kofaktorů NADP⁺/NADPH v cytosolu buněk, v lidském jaterním cytosolu je poměr NADP⁺/NADPH 0,01. Cytosolické enzymy s kofaktorem NAD(P)(H) katalyzují spíše redukční než oxidační reakce (Veech et al. 1969).

2.2.1.1 Nomenklatura AKR nadrodiny

Zástupci AKR nadrodiny byly většinou identifikováni podle substrátové specifity a také podle toho získali svůj název. To vedlo k mnoha zmatkům, kdy například enzym AKR1C3 lze v literatuře nalézt pod čtyřmi dalšími názvy - 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa (HSD) 2, 17 β -HSD5, dihydrodioldehydrogenasa typ X a prostaglandin-F-syntasa (Jez and Penning 2001). Aby se zamezilo těmto nejasnostem, byla v roce 1997 zavedena nomenklatura AKR nadrodiny založená na sekvenci aminokyselin. Všechny enzymy jsou označeny zkratkou AKR plus dvěma arabskými číslicemi a písmenem, jejichž význam je vysvětlen na obr. 2 (Jez et al. 1997).



Obr. 2 - Nomenklatura AKR nadrodiny

Enzymy náležící do určité podrodiny sdílejí alespoň 40% identitu na úrovni aminokyselinové sekvence, v dané rodině je pak shoda aminokyselinové sekvence větší než 60 %.

2.2.1.2 Lidské AKR proteiny

Do dnešní doby bylo popsáno 13 lidských AKR proteinů, které náleží do 3 rodin - AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1-C4, AKR1D1, AKR6A3, 6A5, 6A9 a AKR7A2-3. Zástupci rodiny AKR6 jsou proteiny asociované s napětově řízenými draselnými kanály a nebyla u nich nikdy prokázána katalytická aktivita (Barski et al. 2008). Ostatní AKR s různou účinností katalyzují redukci celé řady aldehydů a ketonů. V následujících odstavcích je uvedena stručná charakteristika lidských AKR reduktas, přičemž je zdůrazněno, které z nich mají určitý vztah k nádorovému onemocnění. Významné postavení má zejména enzym AKR1C3, který byl používán v rekombinantní formě v jednom z projektů popsaných v této disertační práci (viz část 4.2 a 5.1).

AKR1A1 - aldehydreduktasa

Enzym AKR1A1 je NADPH-dependetní reduktasa, která je exprimována ve většině tkání a vykazuje širokou substrátovou specifitu. Podílí se na metabolismu celé řady aromatických aldehydů a steroidních aldehydů. U hlodavců je to nezbytný enzym pro biosyntézu vitamínu C (Barski et al. 2005; Barski et al. 2008), ale skutečná fyziologická role u člověka zatím nebyla popsána. Zatím není známo, že by tento enzym hrál nějakou roli v nádorovém onemocnění.

AKR1B1 - aldosaeduktasa

AKR1B1 je nejvíce studovaným AKR enzymem a to kvůli tomu, že jeho hlavní funkce je redukce glukosy. Předpokládá se totiž, že může přispívat k poškození tkání při hyperglykémii a k rozvoji sekundárních diabetických komplikací (Srivastava et al. 2005). Vedle toho se podílí také na redukci produktů lipidové peroxidace a látek ze znečištěného prostředí (např. akrolein) (Srivastava et al. 1995).

AKR1B10 - aldosareduktasa tenkého střeva

Enzym AKR1B10 byl identifikován v roce 1998 jako zatím poslední zástupce z lidských AKR enzymů (Hydman and Flynn 1998). Oproti AKR1B1, která je exprimovaná ve všech tkáních, lze AKR1B10 nalézt především v tenkém a tlustém střevě a také v játrech (Cao 1998). AKR1B10 se podílí na redukci celé řady aldehydů (methylglyoxal, glyceraldehyd), složek cigaretového kouře (akrolein, krotionaldehyd), ale také léčiv jako je daunorubicin a dolasetron (Martin et al. 2006; Yan et al. 2007). Významný je též fakt, že AKR1B10 je zvýšeně exprimována v karcinomech jater a plic a také nádorech tlustého střeva a dělohy, jak bude diskutováno v části 2.3.2.2 (Fukumoto et al. 2005; Yoshitake et al. 2007). Navíc bylo prokázáno, že AKR1B10 se také podílí na regulaci biosyntézy mastných kyselin díky asociaci s enzymem acetyl-CoA-karboxylasou, která je důležitou součástí syntetické dráhy mastných kyselin. Nicméně fyziologický význam této regulace zatím nebyl zjištěn (Ma et al. 2008).

AKR1C1-C4 - hydroxysteroiddehydrogenasy

Podrodina AKR1C obsahuje čtyři enzymy, které mezi sebou sdílí 84% homologii. Všechny čtyři enzymy jsou exprimovány v játrech a mimo AKR1C4 lze také nalézt v extrahepatálních tkáních jako je prostata nebo mléčná žláza (Penning et al. 2000). Jejich eobiotickými substráty jsou steroidy a také prostaglandiny, z čehož je patrné, že budou hrát významnou roli v hormon-dependentních i hormon-independentních nádorech jak bude diskutováno v částech 2.3.1 a 2.3.2. Mají velmi variabilní vazebné místo, takže dokážou rozpoznávat různé steroidní sloučeniny a vykazovat různě velkou 3 α -, 17 β - i 20 α -hydroxysteroiddehydrogenasovou aktivitu a navíc vykazují překrývající substrátovou specifitu (Bauman et al. 2004).

Vedle eobiotických substrátů se podílí také velmi významně na metabolismu různých léčiv (dolasetron, naloxon, oracin, ketotifen, haloperidol atd.) a toxikologicky důležitých látek (NNK, různé chinony, aromatické aldehydy atd.) (Matsunaga et al. 2006). Díky metabolismu hlavního tabák-specifického karcinogenu NNK se mohou také podílet na rozvoji nádorového onemocnění zcela jinou cestou než přes pohlavní hormony a prostaglandiny (Atalla et al. 2000; Breyer-Pfaff et al. 2004). Ačkoliv je o nich známo mnoho důležitých faktů, jejich skutečná fyziologická role v organismu zůstává zatím skryta.

AKR1D1 - Δ^4 -3-ketosteroid-5 β -reduktasa

AKR1D1 je jediný enzym, který katalyzuje 5 β -stereospecifickou redukci, která je nezbytná pro biosyntézu žlučových kyselin. Jeho význam je patrný z toho, že jeho deficiencie vede až k selhání jater. Navíc se může podílet také na redukci dalších

steroidních sloučenin jako je testosteron, progesteron, kortisol atd. Protože se podílí na jejich degradaci, může spolu s AKR1C enzymy přispívat k hormon-dependentním procesům a potenciálně tedy i rozvoji takových nádorů (Bauman et al. 2004).

AKR7A2-A3 - aflatoxinreduktasy

Aflatoxinreduktasy tvoří celou skupinu enzymů, z nichž u člověka byly objeveny pouze dvě isoformy AKR7A2 a 7A3. Oba tyto enzymy jsou na rozdíl od ostatních AKR enzymů dimery a ukazuje se, že jsou pravděpodobně asociovány s Golgiho aparátem (Kelly et al. 2002). Oba dva jsou schopné metabolizovat aflatoxin B₁ dialdehyd, což je toxický metabolit, vznikající aktivací aflatoxinu B₁. Aflatoxinreduktasy tuto toxickou látku deaktivují na netoxický aldehyd, takže omezují její karcinogenní účinky. AKR7A2 je v organismu všudypřítomná a vykazuje velkou aktivitu vůči sukcinát semialdehydu a byla také popsána jako sukcinátsemialdehydreduktasa, takže její fyziologická funkce je pravděpodobně v metabolismu γ -hydroxybutyrátu (Lyon et al. 2007). Byla u ní popsána i aktivita vůči aromatickým aldehydům, α -dikarboxylovým sloučeninám a dokonce nízká aktivita k daunorubicinu a etakrynové kyselině (Matsunaga et al. 2006). Pravděpodobně důležitější roli v biotransformaci výše uvedených xenobiotik bude hrát AKR7A3, která je exprimována hlavně v játrech, navíc vykazuje daleko vyšší aktivitu vůči aflatoxin B₁ dialdehydu a dalším toxickým aldehydům jako je akrolein a methylglyoxal (Gardner et al. 2004), čímž také může ovlivňovat rozvoj nádorového onemocnění.

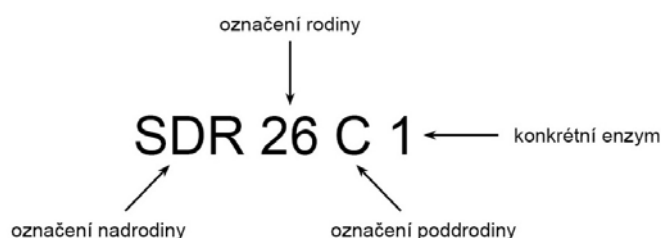
2.2.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) je jednou z největších proteinových nadrodin vůbec. V sekvenčních databázích lze nalézt více než 46 000 zástupců a je známo více než 300 krystalových struktur (Persson et al. 2009). SDR nadrodina je heterogenní skupinou, sekvenční shoda mezi jednotlivými zástupci je velice nízká, pouze 15-30 % (Oppermann et al. 2001). Do této skupiny patří NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy se širokou substrátovou specifikou, které se podílí na metabolismu steroidních hormonů, prostaglandinů, alifatických i aromatických aldehydů, chinonů, syntéze mastných kyselin a také na biotransformaci celé řady xenobiotik (Oppermann 2007; Oppermann et al. 2001). Nicméně do této nadrodiny nepatří jen oxidoreduktasy, ale také třeba zástupci isomeras a synthetas a navíc i proteiny, u nichž zatím žádná katalytická aktivita nebyla prokázána. SDR nadrodina se dělí do pěti typů - většina zástupců patří mezi „klasický“ a „prodloužený“ typ (Kallberg et al. 2002). Důležitým rysem SDR nadrodiny je to, že vedle cytosolických forem proteinů obsahuje i membránově vázané proteiny peroxisomů, mitochondrií a endoplasmatického retikula. Typický zástupce SDR nadrodiny má asi 250 aminokyselinových zbytků, charakteristická je

přítomnost strukturního motivu tzv. Rossmannova záhybu, který slouží k vazbě kofaktoru a katalytické tetrády aktivního místa (serin, tyrosin, lysin a kyselina asparagová). Podobně jako u nadrodiny AKR byla pro SDR též stanovena domovská internetová stránka (<http://www.sdr-enzymes.org/>), kde se publikují aktuální informace.

2.2.2.1 Nomenklatura SDR nadrodiny

Jednou z vysoce aktuálních problematik je nomenklatura SDR nadrodiny. Jak je uvedeno výše, SDR je jednou z největších nadrodin proteinů a okolo 25 % všech dehydrogenas patří právě do ní. Díky velkému množství členů dochází samozřejmě ke zmatkům v názvech jednotlivých proteinů, takže již delší dobu je ve vědeckých kruzích snaha zavést nomenklaturu této velké SDR nadrodiny, která by byla analogická k výše uvedené nomenklatuře AKR (část 2.2.1.1). Kvůli nízké sekvenční shodě mezi jednotlivými proteiny je tento úkol velice obtížný. V roce 2009 Persson et al. publikovali první článek o hlavních rysech připravované nomenklatury. Zatím byly pouze lidské SDR enzymy rozděleny do 48 rodin, které byly označeny arabskou číslicí. Na obr. 3 je uvedený význam jednotlivých členů označení příslušného SDR enzymu.



Obr. 3 - Nomenklatura SDR nadrodiny

Příkladem nových názvu může být SDR21C1, což je označení pro karbonylreduktasu 1 nebo SDR26C1 pro 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasu 1. Po označení všech lidských SDR proteinů bude názvosloví rozšířeno na savčí a další eukaryotické i prokaryotické zástupce a je postaveno tak aby bylo možné zahrnout stále se objevující nové zástupce této skupiny (Persson et al. 2009).

2.2.2.2 Lidské SDR proteiny

Z lidského genomu je známo 73 různých zástupců SDR nadrodiny, přičemž 71 jich bylo prokázáno na úrovni mRNA či proteinu. Zajímavé je, že z tohoto počtu proteinů je pouze 14 forem dobře charakterizováno, ostatní jsou charakterizovány jen do určité míry či prakticky vůbec. Z hlediska projektu, který je popsán v části 4.3 a 5.2, a který se zabývá hledáním nové mikrosomální karbonylreduktasy účastníci se metabolismu xenobiotik, je zajímavý fakt, že z těchto 73 SDR proteinů je 17 vázaných na membránu endoplasmatického retikula (ER) a u 31 není zatím známa ani jejich subcelulární

lokalizace. Zde se tedy otevírá široké pole působnosti v oblasti mikrosomálních forem karbonylreduktas, i když ne všechny lidské SDR enzymy jsou reduktasami. Dalším zajímavým faktem je i to, že dosud jedinou známou mikrosomální karbonylreduktasou hrající roli v metabolismu xenobiotik je 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD1). Takže zde jistě existují i některé mikrosomální karbonylreduktasy s dobře popsanou rolí v metabolismu eobiotik, ale dosud nepopsaným významem v biotransformaci xenobiotik (Bray et al. 2009).

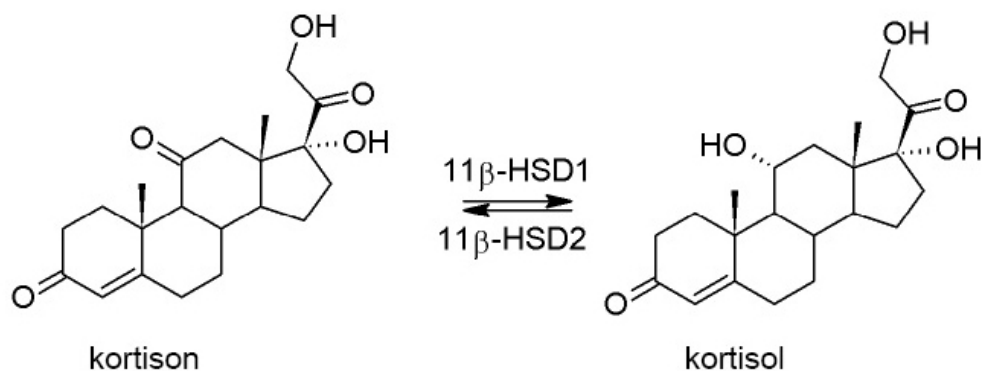
Protože se v této disertační práci zabývám rolí karbonylreduktas v nádorovém onemocnění, pokusím se zde upozornit na některé důležité zástupce, které v tomto procesu mohou hrát roli. Hluběji se v našem výzkumu zabýváme zejména mikrosomálními formami těchto enzymů, tak i zde se na ně zaměřím. Z cytosolických forem zde bude poukázáno pouze na nejdůležitějšího zástupce, a sice karbonylreduktasu 1.

Karbonylreduktasa 1

Karbonylreduktasa 1 (CBR1) je cytosolický monomerní enzym z SDR nadrodiny, který lze nalézt v celé řadě lidských tkání, jako jsou játra, tenké střevo, ledviny, hladká svalovina atd. (Forrest and Gonzalez 2000). CBR1 je NADPH-dependentní monomerní enzym, který se podílí na metabolismu celé řady biologicky i farmakologicky důležitých karbonylových sloučenin. Endogenní substráty CBR1 jsou prostaglandiny a 3-ketosteroidy. Za nejlepší substráty CBR1 jsou považovány různé chinony (např. menadion či 9,10-fenantrenchinon), dále ketoaldehydy (např. fenyglyoxal) a různé aldehydy (Wermuth 1981). Velice významnou roli hraje CBR1 v metabolismu antracyklinových cytostatik doxorubicinu a daunorubicinu, díky čemuž se zdá být důležitým faktorem zodpovědným za jejich kardiotoxicitu a rezistenci nádorových buněk vůči nim, jak bude diskutováno dále v části 2.3.4.1 (Forrest and Gonzalez 2000; Kassner et al. 2008). CBR1 se také podílí na metabolismu dalších klinicky užívaných léčiv jako je haloperidol, loxoprofen, metyrapon a další (Matsunaga et al. 2006). Neméně důležitou roli má také v metabolismu toxikologicky významných látek jako jsou produkty lipidové peroxidace a karcinogenu NNK (Breyer-Pfaff et al. 2004; Oppermann 2007). Vedle karbonylreduktasy 1 byla u člověka popsána ještě cytosolická karbonylreduktasa 3 (Miura et al. 2008) a mitochondriální karbonylreduktasa 4 (Endo et al. 2008).

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD1) je dalším dobře známým zástupcem SDR nadrodiny, který má důležitou fyziologickou roli v metabolismu glukokortikoidů. U člověka konkrétně redukuje inaktivní glukokortikoid kortison na aktivní formu kortisol. Zpětnou oxidační reakci katalyzuje 11 β -HSD2, jak je patrné na obrázku 4.



Obr. 4 - Fyziologická role 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas v metabolismu glukokortikoidů

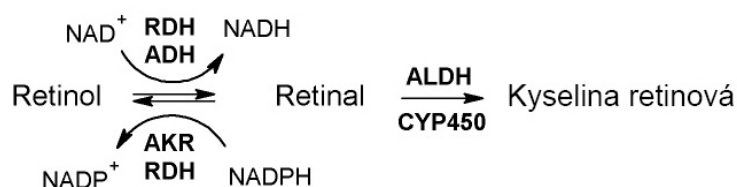
Na rozdíl od CBR1 je 11 β -HSD1 vázán na membránu ER a vyskytuje se ve formě diméru. Tento enzym je NADP(H)-dependentní, v purifikované formě a v tkáňových homogenátech dokáže katalyzovat jak oxidační, tak redukční reakce, nicméně za fyziologických podmínek 11 β -HSD1 funguje pouze jako reduktasa (Maser et al. 2002). Bylo prokázáno, že 11 β -HSD1 je zakotven do membrány ER tak, že katalytická část je orientována do lumenu ER, kde je ale spíše oxidativní prostředí a membrána ER není pro NADPH kofaktor volně prostupná. Byla zde tedy velká snaha odhalit, kde 11 β -HSD1 získává NADPH pro svojí redukční aktivitu. Bylo zjištěno, že je 11 β -HSD1 asociována s enzymem hexosa-6-fosfátdehydrogenasou, který se účastní prvních dvou kroků pentosového cyklu, při kterých vznikají molekuly NADPH, které pak přímo využívá 11 β -HSD1 (Atanasov et al. 2004; Atanasov et al. 2008).

Jak je uvedeno výše, 11 β -HSD1 je zatím pouze jediná dobře popsaná mikrosomální karbonylreduktasa podílející se na metabolismu xenobiotik. Byla popsána celá řada léčiv, na jejichž metabolismu se 11 β -HSD1 podílí - ketoprofen (Hult et al. 2001), prednisolon (Ding et al. 2009), triadimefon (Kenneke et al. 2009), metyrapon (Maser and Oppermann 1997) a potenciální protinádorová léčiva benfluron (Skalova et al. 2002) a oracin (Wsol et al. 2004). Vedle nich také deaktivuje toxikologicky významné látky, jako jsou 7-ketocholesterol (Hult et al. 2004), karcinogen tabáku NNK (Breyer-Pfaff et al. 2004) a menadion (Maser and Oppermann 1997).

Díky jeho fyziologické roli v metabolismu kortikosteroidů je zapletený do onemocnění spojených s jejich poruchami, jako je metabolický syndrom a z něho vyplývající obtíže (Wamil and Seckl 2007). Roli v nádorovém onemocnění může hrát pouze ve spojení s metabolismem protinádorových léčiv a karcinogenu NNK.

Retinoldehydrogenasy

Retinoldehydrogenasy (RDH) jsou skupinou 10 mikrosomálních enzymů z SDR nadrodiny, z nichž některé (RDH5, RDH10, RDHL, RoDH-4, RL-HSD) jsou NAD^+ -dependentní a katalyzují oxidaci retinolu, zatímco zbytek (RDH11, RDH12, RDH14, retSDR1 a prRDH) jsou NADPH -dependentní enzymy katalyzující redukci hlavně retinalaldehydu a případně dalších aldehydických sloučenin (Belyaeva et al. 2005; Kedishvili 2002; Liden and Eriksson 2006). Poměrně dobře prostudovaná je jejich role v oku, kde mají nezbytnou funkci v procesu vidění. Bylo prokázáno, že některé enzymy této skupiny se vyskytují pouze v oku (RDH10, prRDH (Maeda et al. 2005; Wu et al. 2004)), ale další RDH enzymy jsou významně exprimovány i v extraokulárních tkáních, jako jsou játra nebo plíce. Mimo oko se podílí hlavně na metabolismu kyseliny retinové. Jak je vidět na obrázku 5 mimo RDH se na jejich metabolismu podílí i další enzymy z různých skupin.



Obr. 5 - Metabolismus kyseliny retinové a skupiny enzymů, které se na něm podílejí

Dosud nebylo přesně zjištěno, které enzymy jsou v metabolismu kyseliny retinové ty nejdůležitější, ale některé experimenty naznačují významnou roli právě RDH (Gallego et al. 2006; Pares et al. 2008), i když cytosolické alkoholdehydrogenasy (ADH) jsou také důležité. Jisté je, že hladina kyseliny retinové je velice pečlivě udržovaná, protože hraje důležitou roli v diferenciaci buněk a může se v určitých podmínkách podílet i na karcinogenezi (Fields et al. 2007). Díky tomu i enzymy podílející se na jejím metabolismu mohou hrát určitou roli v rozvoji nádorového onemocnění (viz část 2.3.2.2).

17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy

Podobně jako v případě retinoldehydrogenas i 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD) tvoří větší skupinu enzymů - u člověka jich bylo popsáno 12. Jediný z nich, 17 β -HSD5, nepatří do SDR nadrodiny, jeho systematický název je totiž AKR1C3. Všichni zástupci 17 β -HSD se podílí na metabolismu androgenů a estrogenů. Je možné je rozdělit na dvě skupiny - enzymy katalyzující oxidační reakce (17 β -HSD typy 2, 4, 8, 10, 11, 14) a enzymy katalyzující redukční reakce (17 β -HSD typy 1, 3, 5, 7, 12) (Lukacik et al. 2006). U posledního objeveného zástupce, 17 β -HSD13 zatím nebyla zjištěna

enzymatická aktivita, takže zatím není možné zařadit ho (Horiguchi et al. 2008; Liu et al. 2007). Z 12 popsanych je 6 asociováno s membránou endoplasmatického retikula - typy 2, 3, 7, 11, 12, 13 (Moeller and Adamski 2006; Moeller and Adamski 2009).

Některé 17 β -HSD navíc vykazují některé přídavné aktivity jako 20 α -HSD nebo 3 α -HSD aktivitu. Obecně platí, že 17-keto formy pohlavních hormonů jsou inaktivní, zatímco 17-hydroxy formy jsou aktivní a váží se na příslušné receptory (Mindnich et al. 2004). Vedle zodpovědnosti za správný vývoj gonád, sekundárních pohlavních znaků a sexuálního chování mají aktivní pohlavní hormony také obecně vliv na proliferaci buněk v cílových tkáních. Zvýšená hladina pohlavních hormonů ve tkáních může mít tedy vliv na rozvoj hormon-dependentních nádorů (Mindnich et al. 2004).

Člověk a další primáti mají unikátní schopnost tvořit aktivní estrogeny a androgeny ve tkáních i mimo gonády. Hovoříme pak o intrakrinní produkci estrogenů a androgenů z prekursorů produkovaných nadledvinami jako je dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S) a androstendion (4-Adion). Vzniklé pohlavní hormony pak působí pouze na místě svého vzniku. Koncentrace intrakrinně vzniklých pohlavních hormonů v tkáních jsou pak velmi vysoké (Luu-The 2001) a mohou při disbalancích významně přispívat k rozvoji výše uvedených nádorových onemocnění. Zajímavé je, že tímto způsobem je u mužů tvořeno asi 50 % všech androgenů, u žen před menopausou podobné množství a po menopause až 100 % (Sasano et al. 2008). V intrakrinní produkci estrogenů a androgenů hrají hlavní roli právě 17 β -HSD, aromatasa a enzymy z podrodiny AKR1C (Labrie et al. 1997; Labrie et al. 2000a; Labrie et al. 2000b; Penning and Byrns 2009). Role 17 β -HSDs v rozvoji nádorového onemocnění je zatím ta nejdůležitější oblast výzkumu těchto enzymů a o podrobnostech je pojednáno v části 2.3.1.

2.2.3 Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem

Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR) jsou poměrně velkou heterogenní skupinou enzymů nacházejících se u všech druhů, která na konci roku 2007 čítala 11 000 členů v sekvenčních databázích. Během 5 let došlo k více než 10násobnému nárůstu počtu členů. Patří sem enzymy, jako jsou alkoholdehydrogenasy (ADH), leukotrien B4 dehydrogenasy, chinonoxidoreduktasy, enzymy podílející se na biosyntéze mastných kyselin (např. mitochondriální trans-2-enoyl-CoA-reduktasa) atd. U člověka bylo popsáno 25 zástupců MDR skupiny z nichž nejvýznamnější a nejlépe popsanou je zinek-dependentní ADH1, což je hlavní enzym zodpovědný za metabolismus etanolu. Další ADH se podílí na metabolismu celé řady alkoholů (např. retinolu) a žlučových kyselin (Nordling et al. 2002; Persson et al. 2008)

2.3 Role karbonylreduktas v nádorovém onemocnění

Nádorové onemocnění je druhou nejčastější příčinou úmrtí v civilizovaných zemích, hned po kardiovaskulárních onemocněních. Podle statistik Státního zdravotního ústavu v ČR ročně umírá na nádorová onemocnění 27 tisíc pacientů, což představuje přibližně 23 % celkové úmrtnosti. Obecně lze říci, že nádorové onemocnění je genetickým onemocněním, kdy na základě hromadění mutací v určitých oblastech DNA dochází k významným změnám v buněčné signalizaci vedoucí k nekontrolované proliferaci buněk a vzniku nádorového onemocnění. Na vznik nádorového onemocnění má vliv řada agens jako je záření, některé viry a hlavně chemické látky. Výzkum nádorových onemocnění a jejich molekulové podstaty je dnes velmi intenzivně studovanou problematikou a bude zaměstnávat vědce ještě mnoho desetiletí.

Obsáhnout všechny molekuly a enzymy hrající roli v nádorovém onemocnění je naprosto nemožné. Stejně tak je nemožné zabývat se rolí všech redukčních enzymů. Protože výsledky prezentované v této disertační práci se týkají karbonylreduktas, budu se zabývat pouze jejich rolí v rozvoji a léčbě nádorových onemocnění. Karbonylreduktasy hrají významnou a asi i zatím nejvíce prozkoumanou roli v hormon-dependentních nádorech. Vedle toho mohou také určitým způsobem ovlivňovat i hormon-independentní nádory. Navíc se podílí na biotransformaci karcinogenních látek a protinádorových léčiv. Mohou tedy i tímto způsobem ovlivňovat nádorová onemocnění, jak bude diskutováno v následujících kapitolách.

2.3.1 Hormon-dependentní nádorová onemocnění

Termín hormon-dependentní nádorová onemocnění byl zaveden v roce 1982 a zahrnuje nádorová onemocnění, v jejichž karcinogenezi mají nezbytnou úlohu hormony - zvyšují proliferaci buněk a díky jejich zvýšenému dělení také dochází k větší možnosti vzniku mutací. Patří sem nádory prsu, prostaty, endometria, varlat, vaječnicků, štítné žlázy a osteosarkomy. Právě hormon-dependentní formy tvoří 35-40 % všech nádorových onemocnění (Henderson and Feigelson 2000; Labrie et al. 2000b). Karbonylreduktasy hrají významnou roli, zejména v prvních třech typech nádorů, kde se významnou měrou podílí na lokální syntéze estrogenů a androgenů v tkáních (jak je zmíněno už v části 2.2.2.2). Obecně platí, že estrogény a androgeny ve svých cílových tkáních působí proliferačně, takže udržení rovnováhy mezi jejich tvorbou a degradací je nezbytné. Předpokládá se, že rozvoj výše uvedených karcinomů je spojen se snížením oxidační a zvýšením redukční aktivity k estrogenům a androgenům. Oboje pohlavní hormony jsou totiž aktivní jako hydroxyformy (Mindnich et al. 2004). Progesterony působí naopak antiproliferačně

a disbalance v jejich produkci se zatím výrazně uplatňuje pouze v rozvoji karcinomu endometria, jak bude diskutováno dále (Smuc and Rizner 2009a).

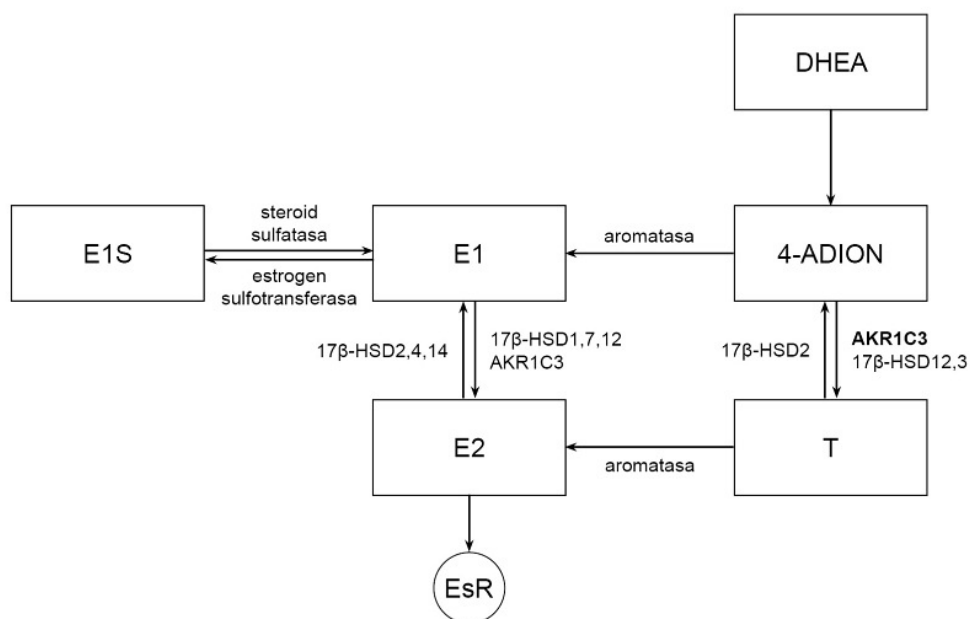
Roli v intrakrinní tvorbě estrogenů, androgenů z prekurzorů jako je DHEA, DHEA-S a 4-Adion v extragonadálních tkáních hrají z karbonylreduktas důležitou roli, jak zástupci 17 β -HSD, tak enzymy z podrodiny AKR1C. Vedle nich jsou dalšími nebytnými enzymy aromatasa (CYP19) a pro androgeny též 5 α -reduktasa. Úloha jednotlivých enzymů v produkci estrogenů a androgenů je znázorněna v příloze 1. Míra exprese enzymů v tkáních se liší, takže i význam jednotlivých enzymů u různých typů hormon-dependentních karcinomů je rozdílný.

V současné době je problematika hormon-dependentních nádorů intenzivně studována a je stále publikováno mnoho zajímavých článků. Nicméně faktem zůstává, že znalosti o těchto nádorech a roli enzymů podílejících se na disbalanci příslušných hormonů (jejich růstových faktorů) nejsou zatím ucelené a zbývá ještě mnoho práce. Proto v dalších kapitolách bude význam karbonyl reduktas v hormon-dependentních nádorech naznačen jen v hlavních rysech.

2.3.1.1 Hormon-dependentní nádory prsu

Nádory prsu jsou nejčastějším typem nádoru u žen a vyvíjí se v převážné části případů až po menopauze, kdy je většina estrogenů tvořena pouze intrakrinním způsobem ve tkáních (Song et al. 2006). Většina karcinomů prsu (60-80 %), alespoň v počátečních fázích, exprimuje estrogení receptor (EsR) a pro jejich růst a vývoj jsou nezbytné estrogény, zejména aktivní forma estadiol (E2) (Jansson 2009; Sasano et al. 2008).

Estrogény získávají nádorové buňky prsu v zásadě hlavními dvěma cestami - sulfatasovou a aromatasovou cestou, které jsou znázorněny na obrázku 6. Sulfatasová cesta spočívá v přeměně inaktivního estron sulfátu (E1S) z krve na estron (E1) za katalýzy steroidsulfatasy a následuje jeho aktivace na E2. Aromatasová cesta zahrnuje aromatisaci testosteronu (T) na E2 nebo 4-Adionu na E1 (Aka et al. 2009). Která z těchto cest je důležitější zatím nebylo dostatečně dobře prokázáno, nicméně inhibitory aromatasy (např. letrozol, anastrozol) se v některých případech nádorů prsu s úspěchem klinicky používají. Dalším klinicky využívaným léčivem pro hormon-dependentní nádory prsu je antagonist EsR, tamoxifen (Henderson and Feigelson 2000).



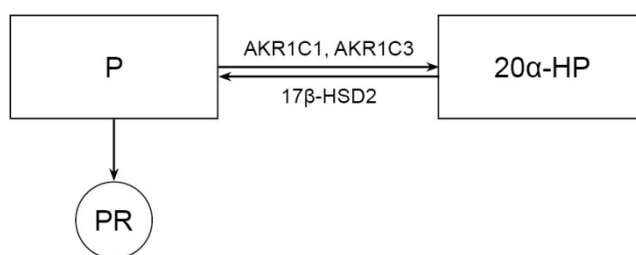
Obr. 6 - Biosyntéza estradiolu (E2) v buňkách nádoru prsu, znázornění účasti jednotlivých karbonylreduktas a dalších nezbytných enzymů

Pro aktivaci E1 na E2 jsou nebytné právě karbonylreduktasy. V normálním epitelu prsu jsou dominantními formami enzymů, které udržují rovnováhu estron-estradiol, redukční 17β -HSD1 a oxidační 17β -HSD2, ale v tkáni rakoviny prsu je exprese 17β -HSD2 výrazně snížena zatímco množství 17β -HSD1 je mnohem vyšší (Jansson et al. 2006). V současné době je silná snaha zjistit, který z enzymů odpovídajících za tvorbu E2 v nádorových buňkách prsu je ten hlavní, nejvýznamnější. Obecně se za tento enzym považuje 17β -HSD1, ale v poslední době se objevily i práce popisující významnou roli i dalších redukčních enzymů - 17β -HSD7, 17β -HSD12 a AKR1C3 (Laplante et al. 2009; Nagasaki et al. 2009; Penning and Byrns 2009; Sasano et al. 2006; Smuc and Rizner 2009b; Song et al. 2006). Samozřejmě záleží na typu používaných nádorových buněk či buněčných linií, i z tohoto důvodu, jsou výsledky jednotlivých vědeckých skupin zatím dost nekonzistentní. Tento výzkum si bude žádat ještě velmi mnoho práce. Pokud by se podařilo nalézt karbonylreduktasu, která je nezbytná pro syntézu E2 alespoň v některých typech nádoru prsu, pak případný selektivní inhibitor pro daný enzym by byl klinicky využitelný obdobně jako inhibitory aromatasy.

U nádoru prsu je zajímavé také to, že vedle EsR tyto buňky exprimují také androgenní receptor (AR). Zdá se, že androgeny v tkáni prsu, na rozdíl od prostaty, působí antiproliferačně a případné podávání androgenů spolu s antiestrogenní léčbou by mohlo přinášet větší efekt v léčbě nádorů prsu (Sasano et al. 2008). Role progesteronu v nádoru prsu zatím nebyla jednoznačně určena (Henderson and Feigelson 2000).

2.3.1.2 Hormon-dependentní nádory endometria

Karcinom endometria je běžnou gynekologickou malignitou a čtvrtým nejčastějším nádorovým onemocněním žen. Až 80 % všech karcinomů endometria jsou hormon-dependentní formy (exprimují EsR, ale i receptory progesteron (PR)) a vyskytují se jak před menopausou tak po ní (Smuc and Rizner 2009a). Stejně jako nádory prsu, i tyto karcinomy jsou estrogen-senzitivní a vznikají při dlouhodobém působení estrogenů na buňky endometria, bez toho aby tento účinek byl vyvážen působením progesteronu. Progesteron (P) totiž zastavuje proliferaci buněk endometria a způsobuje jejich následnou diferenciaci, čímž brání nádorovému bujení (Ito et al. 2006; Yang et al. 2001). Estradiol v nádorových buňkách endometria vzniká podobným mechanismem jako v nádoru prsu (viz obr. 6). Je dobře prokázáno, že exprese 17 β -HSD2 je v buňkách tohoto karcinomu snižena, což přináší zvýšenou koncentraci estradiolu v nádorové tkáni. Navíc byla prokázána zvýšená exprese AKR1C3 (Rizner et al. 2006). S oběma pak souvisí i snížená koncentrace ochranného P. V odpovídajících buněčných liniích nebyla prokázána ani exprese 17 β -HSD1 ani aromatasy, ale poměrně vysoká exprese 17 β -HSD12 a steroidsulfatasy, které by mohly být nezbytnými v nadměrné produkci estradiolu (Fournier and Poirier 2009; Smuc and Rizner 2009b). Velice důležitými se v rozvoji a případné léčbě karcinomu endometria zdají být enzymy odpovědné za vznikající množství ochranného P, tedy 17 β -HSD2, AKR1C3 a hlavně AKR1C1 (Bauman et al. 2004; Smuc and Rizner 2009a).

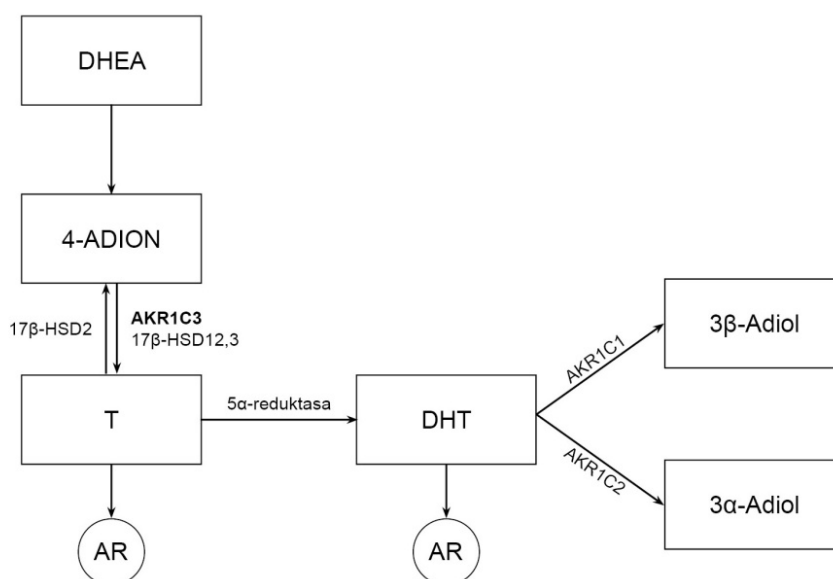


Obr. 7 - Účast karbonylreduktas na deaktivaci a zpětné reaktivaci progesteronu v nádorových buňkách endometria

Jak je patrné z obrázku 7, AKR1C1 a 1C3 metabolisují P na inaktivní 20 α -hydroxyprogesteron (20 α -HP). Zpětnou reakci pak katalyzuje 17 β -HSD2, který je ale prokazatelně v nádorech endometria exprimován sniženě, naopak u AKR1C1 a AKR1C3 byla prokázána zvýšená exprese. AKR1C1 je považován za případný cíl pro léčbu hormon-dependentního karcinomu endometria zvýšenou koncentrací P (Bauman et al. 2004; Brozic et al. 2006; Rizner et al. 2006).

2.3.1.3 Hormon-dependentní nádory prostaty

Prostata je jedním z cílových orgánů androgenů a androgeny mohou hrát roli v rozvoji hormon-dependentního nádoru. Hlavní androgen v krvi je testosteron (T), který je tvořen v Leydigových buňkách varlat. V cílových tkáních, jako je právě třeba prostata, dochází k jeho přeměně na daleko silnější androgen dihydrotestosteron (DHT) katalyzované 5 α -reduktasou. DHT se pak váže stejně tak jako T na AR receptor. Vedle této cesty, může v prostatě vznikat také testosteron intrakrinním způsobem přímo v tkáních z 4-Adionu či DHEA produkovanými nadledvinami (Soronen et al. 2004). Hladina androgenů je pečlivě regulovaná pomocí enzymů, pokud dojde k disbalanci směrem ke zvýšené produkci či snížené deaktivaci aktivních androgenů, mohou začít hrát roli karcinogenů a zvyšovat proliferaci buněk a vést až k rozvoji karcinomu prostaty. Hlavní terapií u karcinomu prostaty je androgen ablační terapie, která spočívá ve snížení hladiny androgenů. Chirurgickou kastrací se dosáhne sice 90% snížení androgenů v plasmě, ale ve tkáni se koncentrace androgenů sníží významně méně, což koresponduje s jejich popsanou tkáňovou syntézou. Klinicky se používají pro snížení koncentrace DHT inhibitory 5 α -reduktasy (např. finesterid) (Zhu and Imperato-McGinley 2009), nicméně je nutné nalézt ještě inhibitory enzymů nezbytných pro syntézu T přímo v tkáni prostaty.



Obr. 8 - Intrakrinní produkce testosteronu v buňkách nádoru prostaty a role jednotlivých karbonylreduktas v tomto mechanismu

Jak je patrné z obrázku 8, centrální roli v produkci T z 4-Adionu má AKR1C3, který je skutečně v buňkách karcinomu prostaty nadměrně exprimován (Penning and Byrns 2009). Oproti tomu snížené množství bylo nalezeno u enzymu 17 β -HSD2, který T deaktivuje (Soronen et al. 2004). AKR1C3 se zdá být významným cílem protinádorové terapie

karcinomu prostaty. Ke snaze nalézt účinný a selektivní inhibitor tohoto enzymu a tedy i případné protinádorové léčivo se přidala i naše pracovní skupina. Snažili jsme se nalézt silný a selektivní inhibitor AK31C3 ze skupiny přírodních látek, flavonoidů, jak je popsáno v experimentální části a výsledcích projektu (viz části 4.2 a 5.1).

2.3.1.4 Shrnutí role karbonylreduktas v hormon-dependentních nádorech

Obecně lze říci, že hormon-dependentní nádorová onemocnění tvoří významnou část nádorů u člověka. Jako karcinogeny zde působí estrogeny (nádor endometria, prsu) či androgeny (nádor prostaty), které zvyšují proliferaci buněk a tím i možnost vzniku mutací DNA. Je jasné, že koncentrace pohlavních hormonů v tkáních je velice pečlivě udržována v rovnováze k čemuž slouží celá síť enzymů, na určité reakci se většinou podílí více enzymů. Z výše uvedeného je jasné (viz obrázky 6-8 a příloha 1), že těmito regulačními enzymy jsou různé karbonylreduktasy, které tedy hrají v rozvoji hormon-dependentních nádorových onemocnění klíčovou roli. Výzkum a jejich případné klinické využití čeká ještě dlouhá cesta, nicméně redukční enzymy se podílí na tvorbě aktivních estrogenů či androgenů, takže jejich inhibice se zdá být důležitým terapeutickým zásahem do léčby těchto nádorových onemocnění. Snaha o nalezení silných a selektivních inhibitorů enzymů hrajících roli v těchto nádorech je poměrně intenzivní. Byla testována řada látek, ale žádná zatím nebyla tak vynikající, aby se začala klinicky zkoušet. Inhibitory se hledají mezi látkami jak přírodního charakteru (např. fytoestrogeny), tak i syntetického původu (např. NSAID, pyrazolaminy). Z toho, co zatím víme o roli jednotlivých karbonylreduktas v hormon-dependentních nádorech, se zdá být využitelná inhibice 17 β -HSD1 (Allan et al. 2006; Schuster et al. 2008), AKR1C1 (Brozic et al. 2006; El-Kabbani et al. 2009) a AKR1C3 (Byrns and Penning 2009; Krazeisen et al. 2001).

Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou nesteroidní látky rostlinného původu, které jsou součástí naší stravy. Lze je rozdělit do čtyř hlavních skupin - flavonoidy, kumestany, stilbeny a lignany. V posledních letech stále přibývají důkazy o jejich prospěšném vlivu na lidské zdraví, co se týče kardiovaskulárních a nádorových onemocnění a menopausy. Mechanismus působení je různý, mohou být agonisty či antagonisty estrogenních receptorů (EsR), pregnan X receptoru (PXR) a konstitutivního androstanového receptoru (CAR). Mohou také zasahovat do signalizačních drah v buňce (inhibice tyrosinkinas) a do biosyntézy estrogenů a androgenů, protože inhibují enzymy, které se účastní těchto drah (Brozic et al. 2006; Yao et al. 2004). Tato jejich funkce je důležitá z hlediska terapie hormon-dependentních nádorových onemocnění.

V experimentální části bude popsána inhibice enzymu AKR1C3 flavonoidy (viz část 4.2 a 5.1), takže z celé skupiny fytoestrogenů bych zde chtěla vyzvednout právě je. Flavonoidy jsou velkou skupinou více než 8 000 látek, které se dále dělí do 10 skupin podle chemické povahy. Lze je najít prakticky ve všech rostlinách, v lidské stravě se vyskytují hlavně flavanony (převážně v citrusových plodech), flavony (v semenech a žlutých plodech), isoflavonoidy (zejména v pokrmech ze soji), antokyaniny (v jahodách a podobných plodech), flavonoly (sem patří tři nejběžnější flavonoidy - kvercetin, kemferol a myricetin). Podobné flavonoidům jsou ještě katechiny, které se vyskytují převážně v čaji a červeném víně (Manach et al. 2004; Yao et al. 2004). Biologická role flavonoidů v rostlinách není zcela jasná, někteří zástupci asi působí jako přírodní fungicidy, UV-protektanty nebo pigmenty (Krazeisen et al. 2001). U člověka pak bylo popsáno mnoho prospěšných funkcí, na kterých se podílí - udržují integritu kapilár, působí antihypertenzivně, protizánětlivě, antihepatotoxicky, protinádorově atd. Vedle inhibice karbonylreduktas mohou flavonoidy modulovat i další enzymy např. CYP450 (Hodek et al. 2002). Jejich koncentrace v plazmě člověka závisí na jeho stravovacích návycích, pohybují se v řádu nízkých μM až nM . O jejich koncentraci v buňkách jsou zatím publikovány pouze velice kusé informace (Erlund et al. 2002; Manach et al. 2005; Paganga and Rice-Evans 1997).

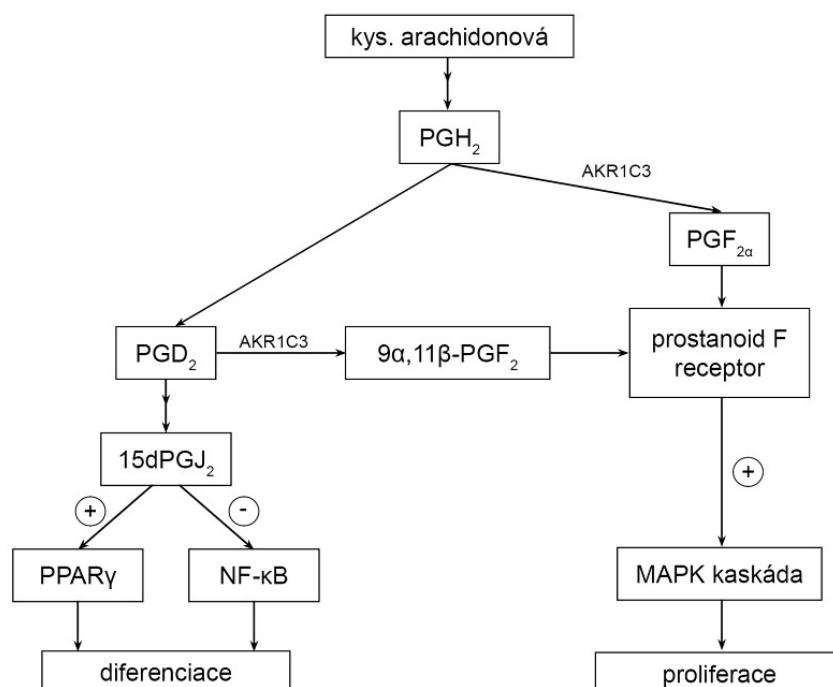
2.3.2 Nádory nezávislé na hormonech

Pokud role jednotlivých karbonylreduktas v hormon-dependentních nádorech není zcela jasná a plně probádaná, pak znalost jejich působení v nádorech, které závislost na hormonech nevykazují, je ještě menší. Jsou zde pouze určité částečné znalosti o tom, jak sloučeniny, které karbonylreduktasy metabolizují, zasahují do signálních drah v buňce. Těchto mechanismů pravděpodobně využívají i původně hormon-dependentní nádory, protože během vývoje často ztrácí svojí závislost na hormonech. To v důsledku musí vést ke změně protinádorové terapie.

2.3.2.1 Role karbonylreduktas v metabolismu prostaglandinů

Prostaglandiny jsou tzv. místní hormony, které jsou v místě potřeby rychle syntetizovány z mastných kyselin, převážně kyseliny arachidonové. V organismu ovlivňují celou řadu procesů, jako srážení krve, zánětlivé procesy atd. Mohou také ovlivňovat proliferaci a diferenciaci buněk a tak zasahovat i do případného nádorového bujení. Důležitým molekulárním přepínačem mezi proliferací a diferenciací buňky ovlivněnou prostaglandiny se zdá být karbonylreduktasa AKR1C3. AKR1C3 se také nazývá prostaglandin F syntasa (Suzuki-Yamamoto et al. 1999) a může katalyzovat přeměnu prostaglandinu H_2 (PGH_2) na prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) a také prostaglandinu D_2 (PGD_2) na $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$. Bez

přítomnosti AKR1C3 je PGD_2 převáděn na 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (15dPGJ₂), který aktivuje receptor aktivovaný peroxisomovými aktivátory γ (PPAR γ) a inhibuje NF- κ B signální dráhu a vede tak k diferenciaci buňky. V přítomnosti AKR1C3 (která je navíc v nádorových buňkách exprimována ve zvýšené míře) dochází tedy ke vzniku prostaglandinů ze skupiny F_2 , které aktivují prostanoid F receptor a také aktivují MAPK signalizační kaskádu, čímž vedou k proliferaci buňky (Byrns et al. 2008; Penning and Byrns 2009; Suzuki-Yamamoto et al. 1999). Jak je zde naznačeno, AKR1C3 se pravděpodobně neúčastní karcinogeneze jen hormon-dependentních nádorů tím, že se podílí na tvorbě estradiolu a testosteronu, ale je i důležitým molekulárním přepínačem mezi proliferací a diferenciací buňky (viz obr. 9). Jeho inhibitory tedy mohou zasahovat i do těchto dějů a posouvat nádorové buňky směrem k diferenciaci (Bauman et al. 2004).



Obr. 9 - Role prostaglandinů a karbonylreduktasy AKR1C3 v diferenciaci a proliferaci buňky a tedy jejich potenciální význam v hormon-independetních nádorech

2.3.2.2 Role karbonylreduktas v metabolismu kyseliny retinové

Vitamín A a jeho deriváty retinoidy jsou nezbytné pro správný embryonální vývoj a také u dospělých jsou důležité v růstu a diferenciaci normálních i transformovaných buněk. Bylo prokázáno, že retinoidy se váží na receptor pro retinovou kyselinu (RAR) a retinoid X receptor (RXR), ty tvoří homo či heterodimery a ovlivňují transkripci některých genů a přispívají k diferenciaci buněk. Při snížení hladiny kyseliny retinové (RA) v buňkách dochází ve výsledku k jejich dediferenciaci. Z toho důvodu se syntetické retinoidy využívají i klinicky jako podpůrné chemoprotektivní či chemoterapeutické agens u některých

nádorových onemocnění - akutní promyelocytární leukemie a nádor prsu (Fields et al. 2007; Soprano et al. 2004).

Díky tomu, že RA hraje v buňce tak důležitou roli, je její hladina pečlivě regulovaná. Jak je patrné na obr. 5, na jejím metabolismu se podílí řada enzymů z různých proteinových nadrobin. První část oxidace retinolu na retinaldehyd je reakce vratná, zatímco oxidace na RA je reakce nevratná, proto enzymy katalyzující první část budou zodpovědné za případné změny v hladině RA (Gallego et al. 2007). Bylo například zjištěno, že v buňkách nádoru prostaty je hladina kyseliny retinové 5-8krát snížena ve srovnání s normálními buňkami prostaty (Kedishvili et al. 2002) a prokázána zvýšená přítomnost redukční retinoldehydrogenasy RDH11 (Lin et al. 2001). Též v buňkách kolorektálního karcinomu byla prokázána snížená koncentrace RA a nízká hladina exprese oxidačních enzymu RDH5 a RDHL, které se podílí na jejím vzniku (Jette et al. 2004; Nadauld et al. 2006). Výzkum role jednotlivých retinoldehydrogenas z SDR nadrobin v karcinogenezi je zcela na začátku, protože větší pozornost byla zatím věnována jejich funkci v oku.

Enzymem, který je v tomto ohledu intenzivně studován je AKR1B10. Jeho fyziologická role zatím nebyla prokázána, ale byl popsán jeho podíl na biotransformaci celé řady xenobiotik (část 2.2.1.2) a také výrazná aktivita v redukci retinaldehydu (Gallego et al. 2007). Byla prokázána jeho zvýšená exprese u celé řady nádorových buněčných linií a nádorových buněk, jako je třeba hepatocelulární karcinom, orofaryngeální karcinom, karcinom plic a nádor endometria. Uvažuje se o tom, že právě AKR1B10 může být zapojen do snížení koncentrace RA, která vede k dediferenciaci buněk a případnému rozvoji nádorovému onemocnění (Ruiz et al. 2009). Tuto hypotézu je nutné potvrdit, ale faktem je, že AKR1B10 je považován za potenciální diagnostický marker pro některé nádory plic (Fukumoto et al. 2005).

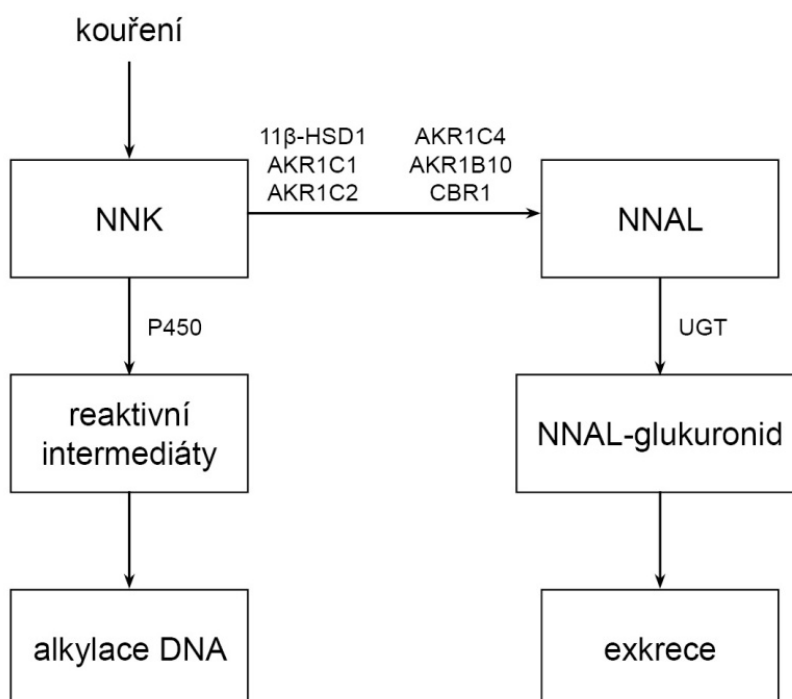
2.3.3 Metabolismus karcinogenních látek

Karbonylreduktasy jsou důležité enzymy v první fázi biotransformace xenobiotik. Podílí se na metabolismu celé řady léčiv, ale také toxikologicky významných látek jako jsou karcinogeny nebo chinony. Výsledkem první fáze biotransformace je většinou, v případě karcinogenů, ale i léčiv, jejich detoxikace/deaktivace. V některých případech ale může také dojít k zachování či zvýšení aktivity metabolitu proti parentní látce (např. dolasetron, aktivace PAH) (Rosemond and Walsh 2004).

2.3.3.1 Metabolismus tabák-specifického karcinogenu NNK

V tabáku a tabákovém kouři je více než 40 různých karcinogenů, z nichž nejsilnější a nejúčinnější je NNK (4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon). NNK indukuje

u laboratorních zvířat nádory plic a pankreatu a předpokládá se, že může hrát roli i v rozvoji těchto typů nádorů u člověka (Upadhyaya et al. 2000). Aby se mohl projevit karcinogenní potenciál NNK, je nutná jeho aktivace pomocí cytochromu P450 (CYP450). Následně dochází vzniklými intermediáty k alkylaci DNA. Aktivační reakci pak konkuruje detoxifikace NNK, která je katalyzována karbonylreduktasami za vzniku příslušného alkoholu NNAL (4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanonol), který může být také aktivován na alkylační intermediáty, ale častěji je konjugován s kyselinou glukuronovou a následně vyloučen z organismu. Protože NNK je asymetrický keton, vznikající alkohol se vyskytuje ve formě dvou enantiomerů (S)-NNAL, (R)-NNAL (Breyer-Pfaff et al. 2004).



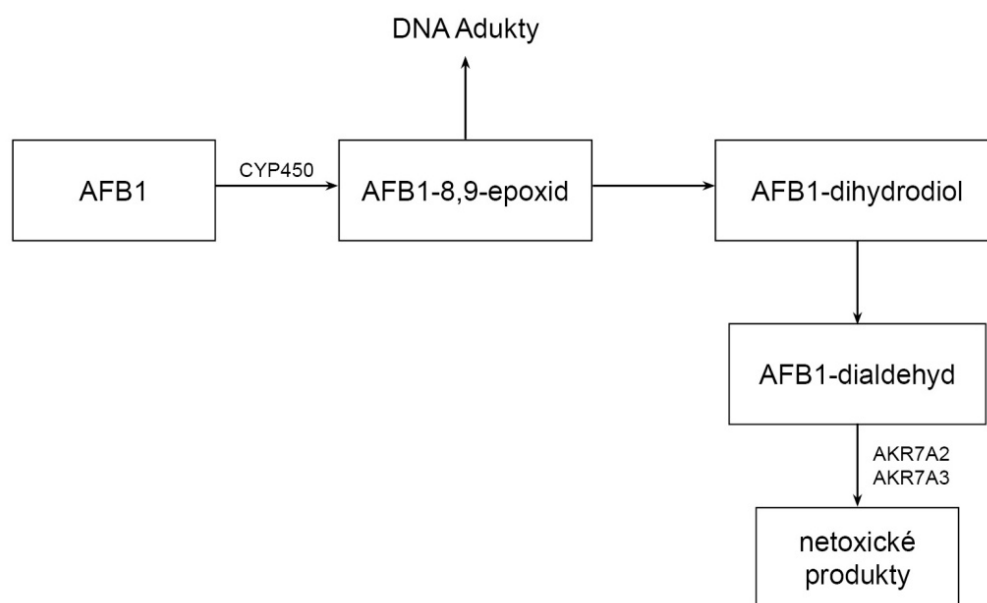
Obr. 10 - Metabolismus tabák-specifického karcinogenu NNK u člověka. Jsou zde znázorněné dva možné metabolické osudy NNK - aktivace P450 nebo detoxifikace katalyzovaná karbonylreduktasami

U člověka probíhá detoxifikace NNK jak v cytosolu, tak v mikrosomech, především jaterních buněk. Zatím bylo popsáno pět cytosolických karbonylreduktas - CBR1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4, AKR1B10 a jeden mikrosomální enzym - 11 β -HSD1, které se podílejí na metabolismu NNK (Atalla et al. 2000; Breyer-Pfaff et al. 2004; Maser and Bannenberg 1994). Který enzym má hlavní roli v detoxifikaci NNK zatím nebylo určeno. Nicméně je jasné, že vnímavost tkání ke vzniku nádorů způsobených NNK se může lišit v závislosti na míře konkurence aktivační a detoxifikační dráhy (viz obr. 10). Obě dráhy a tedy i náchylnost ke vzniku NNK-indukovaných nádorů může ovlivňovat celá řada

faktorů - různá míra exprese příslušných enzymů v tkáních, genetický polymorfismus, modulace enzymové aktivity (inhibice, indukce) atd. (Hoffmann and Maser 2007).

2.3.3.2 Metabolismus aflatoxinu B1

Aflatoxin B1 (AFB1) je produktem plísně *Aspergillus flavus* a může se vyskytovat při špatném skladování v potravinách, jako jsou cereálie, ořechy, maso a ryby. Aflatoxin B1 je hepatotoxická a prokarcinogenní látka, která vyžaduje metabolickou aktivaci CYP450 (viz obr. 11). Dochází ke vzniku AFB1-8,9-epoxidu, který vykazuje karcinogenní aktivitu, tím že vytváří adukty s DNA (Guengerich and Johnson 1999). Tento epoxid může podléhat hydrolyze na AFB1-8,9-dihydrodiol a AFB1-dialdehyd, který má též významné karcinogenní vlastnosti. AFB1-dialdehyd je detoxifikován karbonylovou redukcí, katalyzovanou enzymy z nadrodiny AKR - u člověka se mohou podílet enzymy AKR7A2 a AKR7A3, přičemž 7A3 vykazuje mnohem větší účinnost (Jin and Penning 2007; Knight et al. 1999).



Obr. 11 - Metabolismu aflatoxinu B1 u člověka. CYP450 aktivuje AFB1 na toxický a karcinogenní meziprodukt, který pak AKR enzymy detoxifikují

Karbonylová redukce AFB1-dialdehydu je důležitým detoxifikačním krokem, který chrání člověka před aflatoxinem B1 indukovanou hepatotoxicitou a karcinogenezí. U potkaní formy aflatoxinreduktasy (AKR7A1) byla popsána indukce etoxykinem, která zvýšila u potkana resistenci vůči aflatoxinem indukovanému hepatocelulárnímu karcinomu. U lidských forem, zatím indukovatelnost nebyla popsána, ale i tak hraje AKR7A3 významnou úlohu v ochraně před aflatoxinem B1 (Barski et al. 2008).

2.3.3.3 Metabolismu polyaromatických uhlovodíků

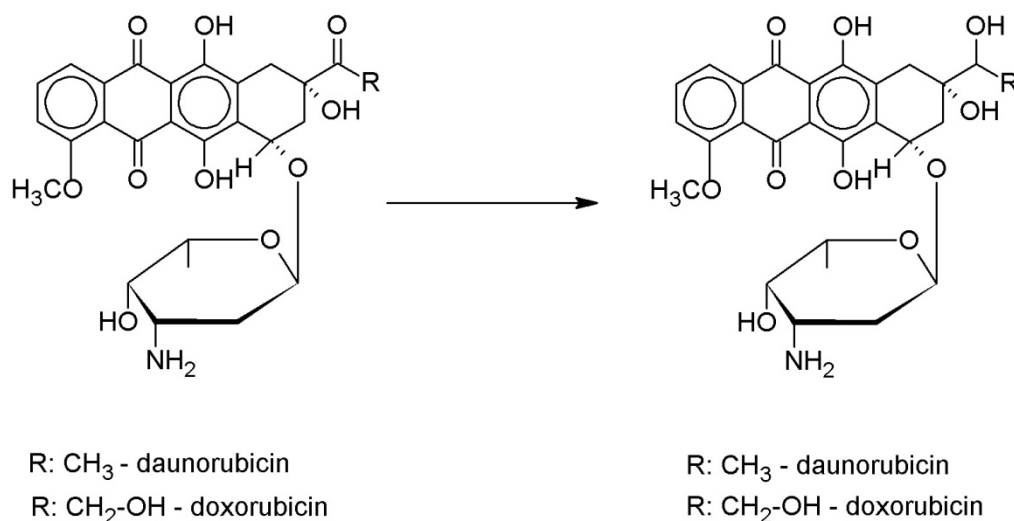
Příkladem, kde se karbonylreduktasy podílejí na aktivaci karcinogenních látek, může být aktivace polyaromatických uhlovodíků (PAH), které jsou polutanty životního prostředí. PAH vyžadují metabolickou aktivaci, která může být katalyzována buď CYP450 nebo právě AKR enzymy. AKR enzymy z PAH tvoří reaktivní a redox aktivní o-chinony. Zvláštní na této aktivaci je to, že AKR1A1 a enzymy podrodiny AKR1C zde katalyzují NADP⁺-dependentní oxidaci. Vzniklé o-chinony podstupují redoxní cyklus, při kterém vznikají toxické volné kyslíkové radikály. AKR obecně katalyzují redukční reakce, ale zde je oxidace termodynamicky preferována (Jin and Penning 2007; Penning 2004).

2.3.4 Metabolismus protinádorových léčiv

Karbonylreduktasy jsou enzymy, které jsou důležitou částí první fáze biotransformace celé řady běžně užívaných léčiv (např. warfarin, ketoprofen, acetohexamid, ketotifen), ale hrají také významnou roli v metabolismu protinádorových léčiv (Rosemond and Walsh 2004). Patří sem klinicky používaná antracyklinová cytostatika jako je doxorubicin a daunorubicin a také potenciální léčiva - oracin a benfluron.

2.3.4.1 Antracyklinová cytostatika

Doxorubicin (DOX) a daunorubicin (DAU) jsou antracyklinová cytostatika, která byla izolována z bakterie *Streptomyces peucetius* už v šedesátých letech 20. století. Prakticky od té doby se s úspěchem klinicky používají. DAU se používá zejména v léčbě akutních leukemií, zatímco DOX má mnohem širší využití, často se používá v kombinaci k léčbě hematologických malignancí, ale také řady solidních tumorů (např. nádor prsu). I přesto, že se tato léčiva používají již tak dlouhou dobu, stále se vede diskuse o jejich mechanismu působení - vedle interkalace do DNA, inhibice topoisomerasy se uvažuje i o produkci volných kyslíkových radikálů. Hlavní nevýhodou těchto cytostatik je jejich kardiotoxicita, která může vést při dlouhodobém používání až k selhání srdce (Simunek et al. 2009). Mechanismus jejich kardiotoxicity je stále intenzivně studován.



Obr. 12 - Schéma metabolismu antracyklinových cytostatik. Redukce na pozici 13 vede k deaktivaci doxorubicinu i daunorubicinu

Obě dvě cytostatika jsou redukována za vzniku 13-hydroxy metabolitů - doxorubicinolu resp. daunorubicinolu (Obr. 12). Tyto alkoholy vykazují významně nižší protinádorovou aktivitu, ale vyšší kardiotoxicitu než parentní látky. Karbonylová redukce je tedy důležitým mechanismem odpovídajícím za detoxifikaci těchto antracyklinových látek, ale pravděpodobně i za jejich hlavní vedlejší účinek, kardiotoxicitu. Bylo popsáno šest cytosolických enzymů podílejících se na metabolismu DOX - CBR1, AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR1C4. Hlavním místem deaktivace DOX jsou játra a enzym, který tam převážně odpovídá za jeho metabolismus, je CBR1 (Kassner et al. 2008). DOX je metabolizován také v buněčné línii nádoru prsu MCF-7, hlavním enzymem je také CBR1, který je podáváním DOX indukován (Gavelova et al. 2008). Zatím byly popsány čtyři enzymy, které jsou odpovědné za metabolismus DAU - AKR1A1, AKR1C2, CBR1, AKR1B10 (Martin et al. 2006; Ohara et al. 1995). V nedávné době byl ale publikován článek, který účast AKR1C2 na metabolismu DAU popírá (Takahashi et al. 2008). Nicméně, za hlavní DAU reductasu je považována AKR1B10 (Balendiran et al. 2009). Jako v případě DOX i při v buněčné línii EPG85-257 karcinomu žaludku byla v přítomnosti DAU pozorovaná indukce karbonylredukční aktivity (Ax et al. 2000).

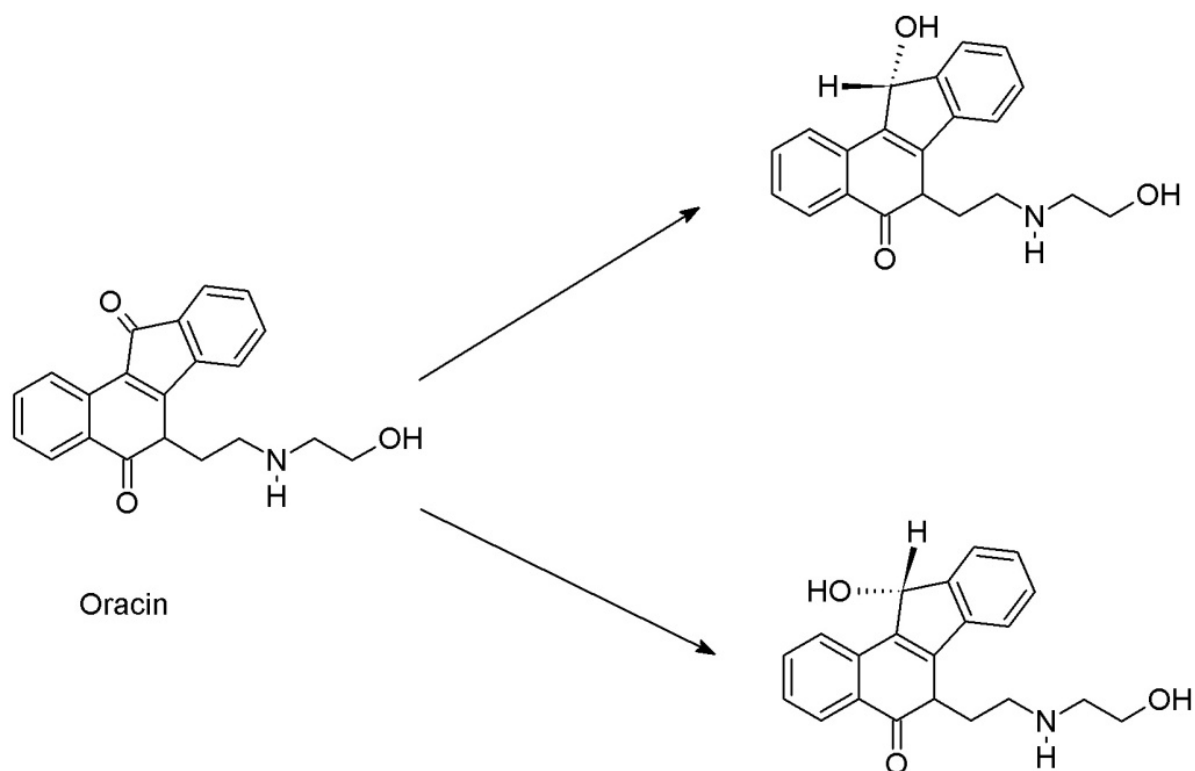
Resistence nádorových buněk vůči cytostatikům, která může být způsobena různými mechanismy, je hlavním problémem protinádorové terapie. I při léčbě antracyklinovými cytostatiky se rezistence vyskytuje a není způsobená pouze změnami v příjmu daného léčiva, ale podílí se na ní také zvýšený metabolismus DOX a DAU v nádorových buňkách. Jak je uvedeno výše, v nádorových liniích vystavených DOX či DAU byla pozorována indukce enzymů odpovídajících za jejich biotransformaci (Ax et al. 2000; Gavelova et al.

2008). Díky ní dochází ke zrychlené deaktivaci daného léčiva a tím i rezistenci buněk. Takové karbonylreduktasy, které se zdají být odpovědné za resistenci nádorových buněk vůči DOX a DAU mohou být tedy důležitým cílem při snaze zvýšit odpověď nádorových buněk na chemoterapii. Podávání inhibitorů karbonylreduktas společně s antracykliny může být vhodný způsob pro překonání nádorové resistance. Bohužel zatím nebyly nalezeny dostatečně silné a zároveň selektivní inhibitory pro enzymy hrající důležitou roli v tomto mechanismu, i když už mnoho látek vykazujících inhibici bylo popsáno, ať už se jednalo o látky přírodního (flavonoidy) nebo syntetického charakteru (Balendiran et al. 2009; Carlquist et al. 2008).

Vedle inhibice karbonylreduktas může být druhým možným mechanismem zlepšení odpovědi na chemoterapii antracykliny, modifikace molekul léčiv tak, aby došlo ke snížení jeho deaktivace karbonylovou redukcí. Tomu bylo věnováno velké úsilí, ale nebyl zatím nalezen analog, který by měl výrazně lepší protinádorovou účinnost a nevykazoval kardiotoxicitu. Pouze jako alternativy k DOX a DAU se používají epirubicin a idarubicin (Simunek et al. 2009).

2.3.4.2 Metabolismus oracinu

Oracin je potenciální protinádorové léčivo, které vykazuje účinnost vůči nádorovým buňkám řady tumorů hlodavců a také člověka (Melka 1993). Hlavním mechanismem účinku je interkalace do DNA, ale na jeho účinku se podílí celá řada dalších mechanismů (např. inhibice topoisomerasy II). Největší jeho výhodou by byla možnost perorálního podávání a hlavně nepřítomnost kardiotoxicity, která je hlavním problémem antracyklinových chemoterapeutik (Gersl et al. 1996). Na obr. 13 je hlavní biotransformační cesta vedoucí k deaktivaci oracinu, tedy redukce na dva enantiomery 11-dihydrooracinu (DHO) (Wsol et al. 2000).



Obr. 13 - Metabolismus potenciálního protinádorového léčiva oracinu. Redukce na pozici 11 je hlavní detoxifikační drahou a dochází ke vzniku dvou enantiomerů 11-dihydrooracinu

Biotransformace oracinu probíhá jak v cytosolu, tak mikrosomech lidských hepatocytů. Z cytosolických enzymů se na ní podílí AKR1C1-C4 (Novotna et al. 2008; Wsol et al. 2007). Jednotlivé enzymy, u nichž je známá stereospecifita a celá cytosolická frakce lidských hepatocytů, metabolisují oracin se stereospecifitou pro (+)-enantiomer DHO (Wsol et al. 2007). V lidských jaterních mikrosomech je situace v biotransformaci oracinu zcela jiná. Dochází k mírné preferenci tvorby (-)-DHO (60 %), přičemž zatím jediný známý mikrosomální enzym podílející se na metabolismu oracinu 11 β -HSD1 tvoří větší množství (-)-DHO (76 %) (Wsol et al. 2004). Na základě této difference, která naznačuje účast dalšího mikrosomálního enzymu na metabolismu oracinu, je založen i jeden z cílů mé práce, tedy purifikace dosud neznámé mikrosomální karbonylreduktasy, jak je popsáno v části 4.3 a 5.2.

V buněčné línii karcinomu prsu MCF-7 byl po expozici buněk oracinem, stejně jako v případě DOX, pozorován nárůst redukční aktivity CBR1, která se podílí na zvýšené deaktivaci oracinu (Gavelova et al. 2008). Díky tomu, že se oracin klinicky nevyužívá, nebylo mu zatím z hlediska možné nádorové rezistence věnováno více úsilí, ale protože je to látka podobná antracyklinům je pravděpodobné, že by se rezistence spojená se zvýšením metabolismu také vyskytovala.

2.3.4.3 Metabolismus benfluronu

Benfluron (B) je potenciální protinádorové léčivo, u kterého bylo popsána aktivita vůči celé řadě experimentálních nádorů *in vitro* a *in vivo*. Předpokládaný mechanismus účinku je interkalace do DNA. U člověka je hlavním metabolitem dihydrobenfluron (DHB), vznikající redukcí karbonylové skupiny. Na metabolismu se podílí cytosolická CBR1 a 11 β -HSD1. Benfluron nevykazuje příliš příznivou farmakokinetiku, je příliš rychle deaktivován, takže byl modifikován na 3,9-dimetoxybenfluron. I tento derivát je biotransformován stejnými enzymy, ale substituce zapříčinila pomalejší metabolismus, což je zde kýžená změna, která zapříčinila zlepšení protinádorových účinků (Skalova et al. 2002).

2.3.5 Shrnutí role karbonyl reduktas v nádorovém onemocnění

Jak si lze povšimnout z předchozích stránek, karbonyl reduktasy hrají roli v nádorovém onemocnění pomocí celé řady mechanismů. Jednak se podílí na tvorbě růstových faktorů (hormonů) pro hormon-dependentní nádory, ale mohou také zasahovat do buněčné signalizace a opět přispívat ke karcinogenezi. Na rozvoji nádorových onemocnění se podílí velké množství molekul a mechanismů. Jak důležitá je mezi nimi role karbonylreduktas, zatím nebylo spolehlivě určeno. Na druhé straně karbonylreduktasy přispívají k detoxifikaci karcinogenních látek (NNK, AFB1-dialdehyd), čímž naopak rozvoji nádorového onemocnění brání. Význam tohoto účinku může v budoucnosti nabírat na významu, protože se stále objevují nové a nové látky s karcinogenním potenciálem, z nichž některé mohou být aktivovány nebo detoxikovány právě redukcí karbonylové skupiny. Významnou roli hrají karbonylreduktasy v rezistenci nádorových buněk na léčbu antracyklinovými antibiotiky. Jako odpověď na jejich podávání dochází v buněčných liniích nádorových buněk k indukci aktivity karbonyl reduktas a tedy i příliš rychlému odbourání těchto léčiv, než aby se mohla projevit jejich protinádorová účinnost.

Díky roli karbonylreduktas v rezistenci nádorových buněk i v tvorbě aktivních androgenů a estrogenů v hormon-dependentních nádorech se zdá být účinným prostředkem, pro omezení těchto negativních důsledků jejich aktivity, inhibice enzymů odpovědných za tyto dopady. Je tedy nutné zjistit, které enzymy jsou zodpovědné jak za tvorbu hormonů, tak ty které jsou indukované podáním protinádorových léčiv přímo v nádorových buňkách. Pro ty pak nalézt dostatečně silný a hlavně selektivní inhibitor, který by se dal klinicky využívat.

3 Cíl práce

Cíl této disertační práce lze rozdělit na dvě části, stejně tak jako jsou principiálně dva hlavní mechanismy zásahu karbonylreduktas do rozvoje nádorového onemocnění. Jednak hrají roli v rozvoji nádorových onemocnění tím, že se podílí na vzniku eobiotických látek, které ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk, a pak se podílí na metabolismu xenobiotických karcinogenů a také protinádorových (ale také dalších) léčiv. Obě tyto oblasti jsou velice důležité a cílem této disertační práce je přinést nové poznatky do obou těchto oblastí.

První část zahrnuje hledání specifického inhibitoru enzymu AKR1C3, který se zdá být důležitý v rozvoji hormon-dependentních nádorů prostaty a zřejmě i prsu. Cílem experimentů s rekombinantní AKR1C3 bylo:

- 1) zjistit, zda se AKR1C3 podílí na metabolismu oracinu a jestliže ano, stanovit redukční aktivitu AKR1C3 pomocí HPLC metody po inkubaci s oracinem;
- 2) vybrat širší skupinu flavonoidů a příbuzných látek a zmapovat jejich vliv na redukční aktivitu;
- 3) pro nejsilnější inhibitory AKR1C3 stanovit inhibiční koncentraci IC_{50} , jejich selektivitu pro AKR1C3 a případně typ inhibice.

Druhá část práce se zabývá purifikací nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy, podílející se na metabolismu protinádorového léčiva oracinu. Na základě rozdílu ve stereospecifitě metabolismu oracinu v celé mikrosomální frakci lidských hepatocytů a purifikovanou lidskou 11 β -HSD1 se předpokládá, že musí existovat ještě další mikrosomální enzym/y účastnící se jeho metabolismu a to s preferenční tvorbou (+)-enantiomeru metabolitu 11-dihydrooracinu. Cílem experimentů zabývajících se purifikací nové reduktasy bylo:

- 1) navrhnout a optimalizovat solubilizaci lidských jaterních mikrosomů, která zajistí zachování aktivity cílového enzymu;
- 2) zavést vhodné purifikační schéma, které umožní získat purifikovanou frakci obsahující cílovou mikrosomální karbonylreduktasu;
- 3) částečně charakterizovat purifikovaný mikrosomální enzym.

4 Experimentální část

4.1 Materiálové vybavení

4.1.1 Použitý materiál

11-dihydrooracin (Výzkumný ústav pro Farmacii a Biochemii, Česká republika)

1-hexansulfonát sodný monohydrát (Sigma-Aldrich, Německo)

6-aminohexanová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, Německo)

Amicon Ultra-15 10 K, zkumavky na ultracentrifugaci (Millipore, USA)

Amoniak (Penta, Česká Republika)

Běžné chemikálie v čistotě p.a. (Penta, Česká republika; Sigma-Aldrich, Německo)

Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, Německo)

Coomassie R (Sigma-Aldrich, Německo)

Detergenty (Sigma-Aldrich, Německo; Fluka Německo)

Dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, Německo)

Flavonoidy a další fenolické látky (vitelin, isovitexin, 2'-hydroxyflavanon, 4'-hydroxyflavanon, 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon, 7-hydroxyflavon, kvercetin dihydrát, kávová kyselina, naringenin, chlorogenová kyselina, rutin hydrát, 4-hydroxybenzoová kyselina, kvercitrin hydrát, epigallokatechin galát, kyanin chlorid, luteolin, (\pm)-taxifolin hydrát, silibinin, apigenin) (Sigma-Aldrich, Německo; Fluka, Německo)

Formaldehyd (Penta, Česká republika)

Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, Německo)

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche, Německo)

Glycin (Sigma-Aldrich, Německo)

Chloristan sodný monohydrát (Fluka, Německo)

Imidazol (Sigma-Aldrich, Německo)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Německo)

Kit pro stanovení bílkoviny BCA Quanti-Pro (Sigma-Aldrich, Německo)

Kolona BDS Hypersil C₁₈, 250 x 4 mm, 5 µm (Thermo Electron Corporation, UK)

Kolona HiTrap Desalting 5 ml (GE Healthcare, Švédsko)

Kolona HiTrap Octyl FF (GE Healthcare, Švédsko)

Kolona HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) (GE Healthcare, Švédsko)

Kolona HiTrap Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare, Švédsko)

Kolona HiTrap Q FF 1 ml (GE Healthcare, Švédsko)

Kolona OD-R Chiracel 240 x 4,6 mm (Daicel Chemical Industries, Japonsko)

Kyselina boritá (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trichloroctová (Penta, Česká republika)

Meldolova modř (Sigma-Aldrich, Německo)

Metanol (Sigma-Aldrich, Německo)

Monosacharidy - různé (Sigma-Aldrich, Německo)

NADP⁺ (Sigma-Aldrich, Německo)

NADPH (Sigma-Aldrich, Německo)

Octan etylnatý (Sigma-Aldrich, Německo)

Oracin (Výzkumný ústav pro Farmacii a Biochemii, Česká republika)

p-jodonitrotetrazoliova sůl (Sigma-Aldrich, Německo)

Polyetylglykol 2000 (Sigma-Aldrich, Německo)

Precision plus Protein, marker pro SDS-PAGE (Bio-rad, USA)

Thiosíran sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

Tricín (Sigma-Aldrich, Německo)

Trietylamin (Fluka, Německo)

4.1.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius CP225D (Sartorius, Německo)

Centrifuga Heraeus BiofugeStratos (Thermo Electron Corporation, USA)

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

Centrifuga Avanti J-30 I (Beckman Coulter, USA)

Gel Doc XR (Bio-rad, USA)

Hlubokochladicí box HeraFreeze HFU 486 TOP (Thermo Electron Corporation, USA)

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

HPLC systém Agilent 1100 - gradientová pumpa, autosampler, odplyňovač, termostatovaná část pro kolonu, fluorescenční detektor (Agilent Technologies, USA)

Minicentrifuga Eppendorf MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)

Mini-Protean elektroforéza (Bio-rad, USA)

Minitřepačka IKA lab dancer (IKA, Německo)

Purifikátor Äkta purifier (GE Healthcare, Švédsko)

Software GraphPad Prism 5.00 (Graphpad Software, USA)

Spektrofotometr Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)

Termomixér komfort (Eppendorf, Německo)

Vakuový koncentrátor Eppendorf 5301 (Eppendorf, Německo)

4.2 Inhibice enzymu AKR1C3 sloučeninami ze skupiny flavonoidů

4.2.1 Klonování, exprese a purifikace rekombinantní AKR1C3

Na přípravě rekombinantního enzymu jsem se osobně nepodílela, ale protože je i tato část pro celý projekt důležitá, stručně zde celý postup uvedu. Tato příprava rekombinantního AKR1C3 byla provedena standardními technikami. cDNA pro lidskou AKR1C3 bylo amplifikováno z komerčně dostupné full-length cDNA pomocí PCR. Byly použity primery o následující sekvenci: 5'-primer: 5'-GGA ATT CCA TAT GGA TTC CAA ACA CCA G-3' (obsahuje restriční místo pro restriční enzym *NdeI*), 3'-primer: 5'-CGC GGA TCC TTA ATA TTC ATC TGA ATA TG-5' (obsahuje restriční místo pro restriční enzym *BamHI*),

kteřé jsou komplementární ke koncům kódující oblasti AKR1C3. Získané PCR fragmenty byly klonovány do pCR2.1-TOPO, kódová sekvence (CDS) byla potvrzena sekvenací provedenou firmou MWG. Po vyštěpení CDS pomocí NdeI a BamHI restričních restričních endonukleas byla tato vložena do expresního vektoru pET-15b. Vektor byl transformován do kompetentních *E.coli* BL21(DE3), které byly indukovány 1 mM IPTG za účelem exprese AKR1C3.

Pro následnou purifikaci AKR1C3 byly buňky mechanicky porušeny metodou French press a buněčné zbytky sedimentovány ultracentrifugací. Supernatant byl purifikován na systému ÄKTA Purifier přímou aplikací pomocí Ni-afinitní chromatografie. Kolona byla promyta 20 ml startovacího pufru a rekombinantní AKR1C3 značený His sekvencí byl pak z kolony eluován pomocí 500 mM imidazolu přidaného do pufru. Úspěšnost exprese AKR1C3 a jeho purifikace byla potvrzena pomocí SDS-PAGE. Enzymatická aktivita připraveného AKR1C3 byla ověřena inkubací se substrátem 5 α -androstendion. Do purifikovaných frakcí obsahující připravený rekombinantní AKR1C3 byl přidán glycerol (výsledná koncentrace 20 %) a protein byl nakonec zkoncentrován na 1,76 mg/ml v 20 mM fosfátovém pufru, pH 7,4.

4.2.2 Purifikace AKR1C1 a AKR1C2

Enzymy AKR1C1 a AKR1C2 purifikované z lidského jaterního cytosolu byly získány od skupiny prof. Masera z Ústavu toxikologie a farmakologie pro přírodovědce v Kielu, kde byly purifikovány podle postupu publikovaného Breyer-Pffaf a Nill (Breyer-Pffaf and Nill 2000).

4.2.3 Stanovení enzymové aktivity AKR1C3

Redukční aktivita rekombinantní AKR1C3 byla stanovena inkubací s oracinem za přítomnosti NADPH-generujícího systému. Standardní inkubace byly provedeny v mikrozkušnicích Eppendorff, směsi se skládaly vždy z 10 μ l AKR1C3 (odpovídající 1,76 μ g v inkubační směsi), 40 μ l NADPH-generujícího systému a 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4. Protože inhibitory se rozpouštěly v metanolu, bylo ještě do kontrolních inkubačních směsí přidáno 5 % metanolu, aby bylo vyloučeno ovlivnění následné inhibice flavonoidy metanolem. Reakce byly vždy nastartovány přidáním 20 μ l roztoku oracinu (výsledná koncentrace 0,5 mM). Celkový objem inkubačních směsí byl 200 μ l. Čas inkubace byl 30 min a inkubovalo se při 37 °C. Složení používaného NADPH-generujícího systému - 0,8 mM NADP⁺, 6 mM glukosa-6-fosfátu, 35 U glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3 mM MgCl₂ v 0,1 mM fosfátovém pufru, pH 7,4. Po uplynutí doby inkubace byly reakce zastaveny přidáním 80 μ l 26% NH₄OH a inkubační směs byla ochlazená na 0 °C na ledové tříšti. Metabolit 11-dihydrooracin (DHO) byl extrahován do 600 μ l octanu etylnatého při 10 s intenzivním míchaní na třepačce. Vzorky byly následně centrifugovány 2 min

v mikrocentrifuze. Organické fáze byly pak přeneseny do nových mikrozkušavek Eppendorf a extrakty byly odpařeny pod vakuem při teplotě 45 °C. Odparky byly následně rozpuštěny v 250 µl mobilní fáze a připraveny pro HPLC analýzu. Jednotlivé inkubace byly provedeny ve čtyřech paralelních stanoveních.

4.2.4 Stanovení inhibice enzymu AKR1C3 flavonoidy

První sada inhibičních experimentů byla provedena pro všechny flavonoidy, jež jsme měli k dispozici tak, že jejich výsledná koncentrace v inkubační směsi byla 20 µM. Všechny látky byly rozpuštěny v metanolu na zásobní roztoky o koncentraci 1 mM, ty byly pak zředěny směsí metanol:voda 1:1 (v/v) na 0,2 mM roztoky. Pro zjištění míry inhibice jednotlivých látek byly provedeny inkubace a zastavení reakce stejným způsobem jak je popsáno v části 4.2.3, jen s tím rozdílem, že do inkubační směsi bylo přidáno místo metanolu 20 µl 0,2 mM roztoků jednotlivých flavonoidů a byla tak získána jejich výsledná koncentrace v inkubační směsi 20 µM. Míra inhibice byla vyhodnocena a flavonoidy s největším inhibičním efektem na AKR1C3 byly podrobeny dalšímu testování.

V druhé sadě inhibičních experimentů byla hledána inhibiční koncentrace IC_{50} pro sedm vybraných nejúčinnějších látek. Jejich koncentrace v inkubačních směsích byly vybrány tak aby pokryly celé inhibiční rozmezí. Pro jednotlivé látky bylo vybráno 4 - 5 koncentrací. Jednotlivé inkubace byly provedeny ve čtyřech paralelních stanoveních.

2'-hydroxyflavanon - 1; 10; 50; 100, 500 nM

7-hydroxyflavon - 0,5; 1; 3; 7,5; 15 µM

Naringenin - 0,5; 1; 3; 7,5; 15 µM

Kvercetin - 5; 10; 20; 30 µM

Apigenin - 5; 10; 20; 30 µM

Luteolin - 10; 20; 30; 40 µM

Silibinin - 5, 10, 20, 30 µM

4.2.5 Stanovení selektivity vybraných inhibitorů pro AKR1C3

Nalezené nejsilnější inhibitory AKR1C3, 2'-hydroxyflavanon a 7-hydroxyflavon, byly testovány pro zjištění jejich selektivity pro AKR1C3. Oba flavonoidy byly inkubovány s AKR1C1 a AKR1C2 (stejně jako s AKR1C3 - popsáno v části 4.2.3) ve třech různých koncentracích, aby bylo možné stanovit IC_{50} . Jednotlivé inkubace byly provedeny ve čtyřech paralelních stanoveních.

AKR1C1: 2'-hydroxyflavanon - 0,5; 5; 20 μ M

7-hydroxyflavon - 0,1; 1; 3 μ M

AKR1C2: 2'-hydroxyflavanon - 5; 20; 40 μ M

7- hydroxyflavon - 3; 10; 40 μ M

4.2.6 Určení typu inhibice

Pro nejúčinnější inhibitor 2'-hydroxyflavanon byl stanoven i typ inhibice. Inkubace byly opět provedeny stejně, jak je popsáno v části 4.2.3 pouze s tím rozdílem, že byly použity různé koncentrace oracinu (20; 30; 40; 80; 120 a 200 μ M) a pro každou pak koncentrace 2'-hydroxyflavanonu - 0; 100; 300; 1000 nM. Jednotlivé inkubace byly provedeny ve třech paralelních stanoveních.

4.2.7 HPLC metoda pro stanovení redukční aktivity

Pro stanovení redukční aktivity enzymů a míry její inhibice byla použita HPLC metoda na stanovení metabolitu oracinu 11-dihydrooracinu (DHO), která byla vyvinuta v předchozích letech na naší katedře (Wsol et al. 1996). Mobilní fáze se skládá z 10 mM hexansulfonanového pufru s 0,1 M TEA, pH 3,27 a acetonitrilu v poměru 75:25 (v/v). Kolona BDS Hypersil C₁₈, rychlost průtoku mobilní fáze je 1,5 ml/min. DHO se měří pomocí fluorescenčního detektoru při excitační/emisní vlnové délce 340/418 nm. DHO se eluuje v retenčním čase 2,8 min. Detekční limit metody je 10 pmol/ml DHO. Ukázka chromatogramu je na obrázku 14.

4.2.8 Výpočet inhibiční konstanty

Inhibiční účinnost jednotlivých flavonoidů byla charakterizována pomocí jejich IC₅₀, které byly vypočítány pomocí programu GraphPad Prism 5.00.

4.3 Purifikace a charakterizace nové mikrosomální

karbonylreduktasy účastnící se metabolismu xenobiotik

4.3.1 Příprava lidských jaterních mikrosomů

Vzorky lidských jater byly získány z Transplantačního centra Fakultní nemocnice Hradec Králové v souladu s legislativou České republiky. Vzorky tkání byly skladovány při teplotě -80 °C a sloužily jako zdroj pro přípravu mikrosomů. Lidské jaterní tkán o hmotnosti 3 g byla homogenizována za použití homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema ve třech objemech 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,4. Homogenát byl centrifugován 20 min při 5 000x g, aby sedimentovalo vazivo, zbytky buněk a jádra. Vzniklý supernatant byl dále centrifugován

60 min při 20 000x g, kdy sedimentují mitochondrie a v supernatantu zůstávají mikrosomy a cytosol. Ty se oddělí třetí centrifugací při 105 000x g, 60 min. Mikrosomy utvoří peletu a supernatant je tvořen cytosolem. Mikrosomální peleta se pak třikrát resuspenduje v jednom objemu homogenizačního pufru a třikrát se centrifuguje za stejných podmínek, aby se odstranily zbytky cytosolu. Po promytí se mikrosomální peleta resuspenduje v jednom objemu homogenizačního pufru s 20 % glycerolu a takto připravené mikrosomy se mohou uchovávat při -80 °C nebo ihned zpracovat. Všechny tyto centrifugace a mezikroky se provádí při 4 °C aby se předešlo ztrátám enzymatické aktivity. Pro kontrolu případné kontaminace cytosolem se stanovuje aktivita laktátdehydrogenasy, která se v čistých mikrosomech nevyskytuje.

4.3.2 Solubilizace mikrosomů a její optimalizace

Solubilizační proces vychází z postupu použitého při purifikaci 11 β -HSD1 (Maser et al. 2002). Tento postup byl optimalizován, co se týče typu a koncentrace detergentu v solubilizačním pufru. Byly připraveny rozdílné solubilizační pufrы, přičemž všechny obsahovaly 10 mM NaH₂PO₄; 1 mM EDTA; 1 M NaCl a 40 % (v/v) glycerolu; pH 7,4 a navíc různé detergenty v různých koncentracích. Byly vybrány čtyři různé neionogenní detergenty - oktaetylglykol monododecyleter (C12E8), etylglykol monododecyleter (C4E8), dodecyl- β -D-maltosid (DDM) a Triton X-100 v koncentracích 5; 10; 20; 40 mM, což odpovídá poměru detergent:protein 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 (w/w). Jednotlivé pufrы byly smíchány s lidskými jaterními mikrosomy v poměru 1:1. Tato směs pak byla jemně míchána 45 min na ledu a následně centrifugovaná v centrifuze Sorvall za použití rotoru TST 60.4 při 38 000 rpm (60 min, 4 °C). Karbonylredukční aktivita vzniklého supernatantu a resuspendované pelety byly stanoveny pomocí inkubace s oracinem. Účinnost solubilizace byla vyjádřena jako % původní redukční aktivity mikrosomů v supernatantu, tedy solubilizovaných mikrosomech. Jako nejvhodnější detergent se jevil triton X-100, proto pro purifikaci byl použit tento detergent v poměru protein:detergent 1:2 (w/w).

4.3.3 Purifikace nové mikrosomální karbonylreduktasy

4.3.3.1 Odsolení solubilizovaných mikrosomů

Solubilizované mikrosomy byly odsoleny pomocí gelové filtrace. Kolona HiTrap Desalting byla nejprve ekvilibrována puftrem A (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol; 1 % (w/v) Triton X-100). Následně byly solubilizované mikrosomy aplikované na kolonu, kde došlo k oddělení proteinů a soli. Separace probíhala ve stejném pufru jako ekvibrace kolony, průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min a eluce proteinů a solí byla sledována pomocí

absorbance při 280 nm, respektive konduktivity. Vzorky obsahující proteiny byly pak koncentrovány pomocí ultrafiltrace v Amicon Ultra-15 10 K zkumavkách (5 000x g, 4 °C).

4.3.3.2 První purifikační krok - separace na Q-sefarose

Zakoncentrované odsolené mikrosomy o obsahu proteinu 5,5 mg byly aplikovány na anion-výměnnou chromatografickou kolonu, HiTrap Q FF 1ml, která byla ještě předtím ekvilibrována pufrém A, který byl použit i při odsolení (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol; 1 % (w/v) Triton X-100). Pro eluci proteinů z kolony byl použit pufr B (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol; 1 % (w/v) Triton X-100; 1 M NaCl). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a objem sbíraných frakcí 1 ml. Eluční program byl zahájen pufrém A (segment 0-6 ml), následoval postupný gradient NaCl až do koncentrace 1 M NaCl (segment 7-22 ml) a nakonec byl aplikován čistý pufr B (22-26 ml). Každá frakce byla uschována, byla stanovena její redukční aktivita vůči oracinu, stereospecifita reakce a obsah proteinů.

4.3.3.3 Optimalizace druhého purifikačního kroku - hydrofobně-interakční chromatografie

Z frakcí získaných po separaci na Q-sefarose byla vybrána ta, která měla vysokou redukční aktivitu a vhodné vlastnosti týkající se enzymové stereospecifity, tedy preferenční tvorbu (+)-DHO (frakce Q12). Q12 frakce s celkovým obsahem proteinů 0,27 mg byla aplikovaná na různé hydrofobně-interakční kolony - HiTrap Phenyl-sepharose 6 FF (low sub), HiTrap Octyl FF a HiTrap Phenyl-sepharose HP. Tyto kolony se liší jednak velikostí matrice a také funkční skupinou navázanou na matrici. Všechny byly nejprve ekvilibrovány pufrém C (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), pak byl nadávkován vzorek a pro eluci byl použit pufr D (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol). Eluční program startoval pufrém C (segment 0-5 ml), následoval postupně sestupný gradient $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6-20 ml) a program byl ukončen elucí pufru D (segment 21-30ml). V případě kolon HiTrap Phenyl-sepharose 6 FF (low sub) a HiTrap Octyl-sepharose 5 FF byl průtok pufrů kolonou 1 ml/min, zatímco u kolony HiTrap Phenyl-sepharose HP jenom 0,5 ml/min. Frakce byly sbírány po 1 ml a u každé byla proměřena redukční aktivita, stereospecifita a obsah proteinů.

4.3.4 Stanovení enzymové aktivity a enzymové stereospecifity

Redukční aktivita jednotlivých frakcí získaných během purifikačního procesu byla stanovena inkubací s oracinem za přítomnosti NADPH-generujícího systému. Standardní inkubace byly provedeny v mikrozkuvkách Eppendoff, vždy v celkovém objemu 100 μl a teplotě 37 °C. Směsi se skládaly z 5 μl mikrosomální suspenze (což odpovídá 5 mg původní tkáně) nebo 50 μl purifikovaných frakcí, 20 μl NADPH-generujícího systému a 0,1 M fosfátovém

pufu o pH 7,4. Reakce byly vždy startovány přidáním 10 μ l roztoku oracinu (výsledná koncentrace 0,5 mM). Složení používaného NADPH-generujícího systému - 0,8 mM NADP⁺; 6 mM glukosa-6-fosfátu; 35 U glukosa-6-fosfátdehydrogenasy; 3 mM MgCl₂ v 0,1 M fosfátovém pufru; pH 7,4. Po 30 min inkubaci při 37 °C byly reakce zastaveny přidáním 40 μ l 26 % NH₄OH a inkubační směs byla ochlazena na 0 °C na ledové tříšti. Metabolit 11-dihydrooracin (DHO) byl extrahován do 300 μ l octanu etylnatého při 10 s intenzivním míchaní na třepačce. Vzorky byly následně centrifugovány 2 min v mikrocentrifuze. Organické fáze byly pak přeneseny do nových mikroskumavek Eppendorf a extrakty odpařeny pod vakuem při teplotě 45 °C. Odparky byly následně rozpuštěny v 250 μ l příslušné mobilní fáze a připraveny pro HPLC analýzu pro zjištění redukční aktivity nebo enzymové stereospecifity. Kontrolní inkubace bez biologického materiálu byly provedeny pro zjištění míry neenzymové konverze substrátu.

4.3.5 Stanovení preference pro kofaktor

Výrazně purifikovaná frakce obsahující novou mikrosomální karbonylreduktasu po druhém purifikačním kroku F12 byla charakterizovaná, co se týče preference pro kofaktor. 20 μ l frakce bylo inkubováno buď s NADH nebo NADPH. V případě NADPH byl použit NADPH-generující systém (viz část 4.3.4). Pro stanovení enzymové aktivity za přítomnosti NADH bylo do reakce přidáno NADH ve výsledné koncentraci 6 mM. Postup inkubace zůstal stejný, jak je popsáno v části 4.3.4.

4.3.6 Stanovení enzymové kinetiky

Vedle stanovení preference pro kofaktor byla frakce po druhém purifikačním kroku F12 také charakterizována kinetickými parametry pro redukci oracinu. Inkubace byla provedená v celkovém objemu 100 μ l podobně jako v části 4.3.4 při stanovení redukční aktivity purifikovaných frakcí. 20 μ l výrazně purifikované frakce bylo inkubováno s oracinem v konečných koncentracích 0,05-0,8 mM za přítomnosti NADPH-generujícího systému v 0,1 M fosfátovém pufru. Další zpracování vzorků bylo stejné jako v části 4.3.4. Kinetické parametry byly určeny pomocí softwaru GraphPad Prism 5.00. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.D. z triplicátů.

4.3.7 HPLC podmínky pro stanovení redukční aktivity

Pro stanovení redukční aktivity jednotlivých purifikovaných frakcí a také preference výrazně purifikované frakce pro kofaktor a její enzymovou kinetiku byla použita HPLC metoda na stanovení celkového množství metabolitu oracinu - 11-dihydrooracinu (DHO), která byla vyvinuta v předchozích letech na naší katedře (Wsol et al. 1996) a popsána v části 4.2.7.

4.3.8 HPLC podmínky pro stanovení enzymové stereospecifity

Enzymové stereospecifita jednotlivých frakcí během purifikace byla stanovena pomocí chirální HPLC metoda pro stanovení obou enantiomerů DHO, která byla také vyvinuta na naší katedře (Wsol et al. 1999). Mobilní fáze se skládá z 0,3 M chloristanového pufru (pH 3,0) a acetonitrilu v poměru 69:31 (v/v), která protéká přes kolonu OD-R Chiracel 240 mm x 4,6 mm rychlostí 0,5 ml/min. Enantiomery DHO jsou detekovány fluorescenčně při excitační/emisní vlnové délce 340/418 nm. Enantiomer (+)-DHO má retenční čas 9 min a druhý enantiomer (-)-DHO 12 min.

4.3.9 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v mikrosomech a ve všech frakcích z prvního purifikačního kroku byla kvůli přítomnosti detergentu Triton X-100 stanovována BCA metodou (stanovení s kyselinou bicinchoninovou) pomocí komerčně dostupných kitů s různým detekčním limitem. Frakce získané po druhém purifikačním kroku byly stanoveny modifikovanou Bradfordovou metodou podle (Georgiou et al. 2008), protože komerčně dostupné kity nemají dostatečně nízký detekční limit.

4.3.10 Stanovení stability mikrosomů a purifikovaných frakcí

Vybrané frakce po separaci na Q a Fenyl-sefaroze byly testovány na jejich stabilitu při laboratorní teplotě. Během práce se tyto vzorky uchovávají na ledu, proto jsme je vystavili ještě extrémnějším podmínkám. Jednotlivé frakce byly ponechány ve stojánku při laboratorní teplotě, resp. na ledu a v pravidelných intervalech byly odebíraný vzorky, které byly ihned zamrazeny pro následnou inkubaci s oracinem (viz část 4.3.4) a stanoveny změny v redukční aktivitě v průběhu času.

4.3.11 Elektroforéza

4.3.11.1 SDS-elektroforéza

Koncentrované a odsolené mikrosomy společně s vybranými frakcemi z Q-sefarozy (Q12) a Fenyl-sefarozy byly analyzovány na 1,5 mm silném gelu SDS-polyakrylamidové elektroforézy (PAGE). Bylo použito klasické provedení na Tris-glycinovém SDS gelu.

Složení gelů:

Separáční gel	Zaostřovací gel
12 % akrylamid (AA)	4 % AA
0,33 % bis-akrylamid (bis-AA)	0,1 % Bis-AA
0,37 M Tris-HCl pH 8,8	0,13 M Tris-HCl pH 6,8
0,1 % SDS	0,1 % SDS
0,06 % persíran amonn� (APS)	0,06 % APS
0,04 % TEMED	0,04 % TEMED

Vzorky na elektroforézu byly smíchány s třikrát koncentrovan m vzorkov m puřem (150 mM Tris-HCl; 6 % SDS; 18 % (w/v) glycerol; 3 % (w/v) 2-merkaptoetanol; 0,012 % (w/v) bromfenolov  modř) v poměru 2:1 a zahřáty 3 min na 95  C. Vzorky byly pak aplikovány na gel a jako elektrodiv  puř byl pouřit roztok slořen  z 0,1 M Tris-HCl pH 8,3; 1 M glycinu a 5% SDS. Separace probíhala při 100 V v zaostřovacím gelu a při 200 V v gelu separačním. N sledn  byl gel obarven (viz  st 4.3.12.1 a 4.3.12.2).

4.3.11.2 Nativní elektroforéza 1

Nativní elektroforéza 1 byla provedena stejn  jako SDS elektroforéza, pouze s tím rozdílem, že gel, vzorkov  puř i elektrodiv  puř byl prost  SDS. Vzorky nebyly samozřejmě před nadávkováním na gel převařen y a separace probíhala i v separačním gelu při 100V.

4.3.11.3 Nativní elektroforéza 2

Vhodn jř  podoba nativní elektroforézy je typ 2, kde slořen  gelů a puřů je jin  a m  pro zachování nativních vlastností lepř  pH. Opět byl pouřit 1,5 mm gel, kter  měl  st zaostřovací a  st separační.

Složení gelů:

Separáční gel	Zaostřovací gel
15 % AA	4 % AA
0,325 % bis-AA	0,13 % bis-AA
0,375 M Tris-HCl, pH 7,0	0,125 M Bis-Tris, pH 7,0
0,1 % APS	0,1 % APS
0,023 % TEMED	0,035 % TEMED

Vzorky byly uchovávány na ledu, aby nedocházelo k jejich degradaci a těsně před aplikací na gel smíchány se vzorkovým pufrům (10 mM Tris-HCl pH 7,0; 50 % (v/v) glycerol; 0,01 % brofenolová modř) v poměru 1:1. Separace probíhala s elektrodovým pufrům o složení 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 0,19 M glycin při konstantním proudu 25 mA za intenzivního chlazení (Seymour and Lazarus 1989). Po ukončení byl gel obarven (viz část 4.3.12.3 a 4.3.12.3). Ve složení elektrodového pufru byla provedena později také jedna modifikace, kdy pufr v katodovém prostoru byl změněn na 125 mM Tris-HCl; 0,95 M glycin s přídatkem 0,25 % cholátu sodného a 0,25 % Tritonu X-100 (Wittig et al. 2007).

4.3.11.4 Clear-native elektroforéza

Clear-native elektroforéza (CN-PAGE) je varianta tzv. blue-native PAGE (BN-PAGE), která je obecně doporučovaná pro elektroforézu membránově vázaných proteinů, ale s barvením, které bylo použito (část 4.3.12.3) není kompatibilní. Proto byla provedena právě CN-PAGE.

Složení gelů:

Separáční gel	Zaostřovací gel
12 % AA	4 % AA
0,32 % bis-AA	0,13 % bis-AA
14 % glycerol	-
0,025 M imidazol, pH 7,0	0,025 M imidazol, pH 7,0
0,5 M 6-aminohexanov� kyselina (6-AHA)	0,5 M 6-AHA
0,5 % APS	0,5 % APS
0,05 % TEMED	0,05 % TEMED

Vzorky byly uchovány na ledu a těsně před aplikací byl přidán vzorkov  pufr (0,0375 M imidazol pH 7,0; 0,75 M 6-AHA; 0,1 % Ponceau S) v poměru 2:1. U této elektroforézy se lišil elektrodov  pufr v katodovém (50 mM Tricin; 7,5 mM imidazol s přídatkem 0,05 % cholátu sodného a 0,05 % Tritonu X-100) a anodovém (25 mM imidazol-HCl pH 7,0) prostoru. Separace probíhala za konstantního proudu 15 mA a intenzivního chlazení (Wittig et al. 2007). Po ukončení elektroforézy byl gel obarven (části 4.3.12.2 a 4.3.12.3). Tento typ elektroforézy byl ještě dále optimalizován, co se týče obsahu detergentů v katodovém pufru podle zmíněného článku.

4.3.12 Barvení elektroforetických gelů

4.3.12.1 Barvení stříbrem dle Ohsawy

Vysoce citlivá metoda stříbření, u které se uvádí detekční limit až 100 pg proteinu. Barvení je velice citlivé protože během fixace dochází ke smrštění gelu a vytlačení SDS z komplexu SDS-protein. Elektroforetický gel tloušťky 1,5 mm bylo nutné nejprve fixovat 1 hodinu pomocí roztoku 5 % PEG 2000 v 50% roztoku isopropanolu. Následovalo barvení ve vodném roztoku 0,2 % AgNO_3 ; 0,25 % NH_4OH a 0,2 % NaOH po 30 minut. Po třínásobném krátkém opláchnutí gelu vodou následovalo ponoření do vyvíjecího roztoku (0,005% kyselina citronová a 0,02% formaldehyd) až do ztmavnutí proužků (cca 20 min) (Ohsawa and Ebata 1983; Oosawa et al. 1986).

4.3.12.2 Barvení stříbrem dle Chevallet

Tato metoda je zatím jediná publikovaná metoda stříbření elektroforetických gelů, která je plně kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (MS). Zde totiž není používané stříbro redukováno formaldehydem, jenž pak brání MS analýze proteinů, ale monosacharidy díky kterým se metoda nazývá také „sladké stříbření“. Gel po ukončení elektroforézy bylo nutné nejprve fixovat přes noc v roztoku 30% (v/v) etanolu a 10% (v/v) kyseliny octové. Po čtyřnásobném krátkém opláchnutí vodou následovala senzitivace gelu pomocí 8 mM thiosíranu sodného. Po opláchnutí vodou bylo dalším krokem 30 minutové stříbření 12 mM AgNO_3 . Po stříbření byl gel velmi krátce opláchnut vodou a ponořen do vývojky (2 % (w/v) ribosa; 100 mM kyselina boritá; 150 mM NaOH ; 50 μM thiosíran sodný; pH 12,7), kde se po 20-30 minutách vytvořili tmavě hnědé proužky. Pro uchování obarveného gelu se gel ponořil do roztoku složeného z 40% Tris a 20% kyseliny octové.

4.3.12.3 Barvení na redukční aktivitu

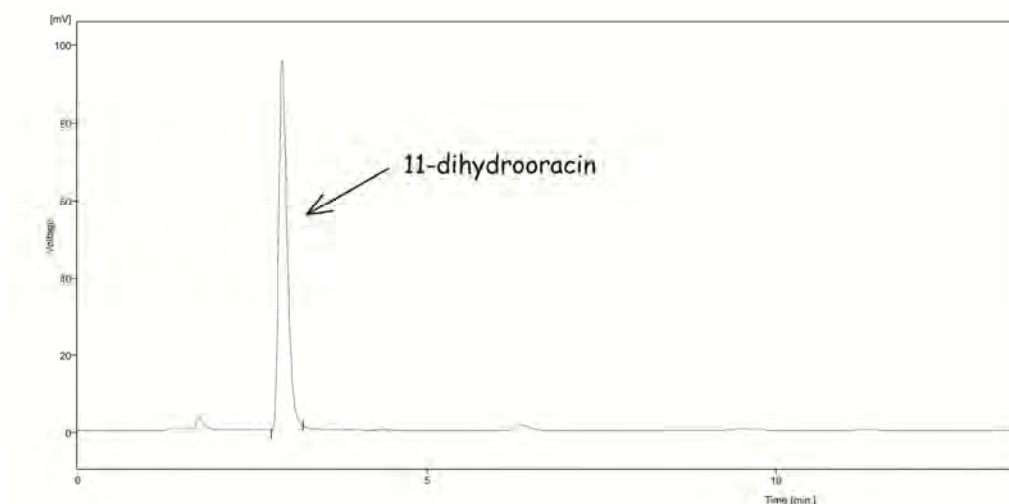
Tento typ barvení využívá enzymatickou aktivitu redox enzymů, která po nativní elektroforéze zůstává zachována. Dokáže tedy přiřadit elektroforetický proužek pouze enzymu s příslušnou enzymatickou aktivitou. Tento typ barvení se používá hlavně pro barvení oxidas (získají se fialové proužky na průhledném pozadí), my jsme použili v podstatě opačný postup, kdy výsledkem je tmavě fialový gel s enzymaticky aktivními prosvětlenými proužky. Principem metody je redukce tetrazoliové soli pomocí NADPH na fialový nerozpustný formasan (Gabriel and Gersten 1992). Po nativní elektroforéze byl gel okamžitě inkubován s 0,5 mM oracinem a 1 mM NADPH v 0,2 M Bis-Tris-HCl, pH 7,0 (nebo lze rozpouštět v 10 mM fosfátovém pufru, pH 7,4) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Gel byl pak opláchnut vodou a vložen do barvicího roztoku (0,31 mM p-jodonitrotetrazolum; 0,05 mM Meldolova modř v 0,2 M Bis-Tris, pH 7,0 nebo 10 mM fosfátovém pufru, pH 7,4) kde byl ponechán do rána.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Inhibice enzymu AKR1C3 sloučeninami ze skupiny flavonoidů

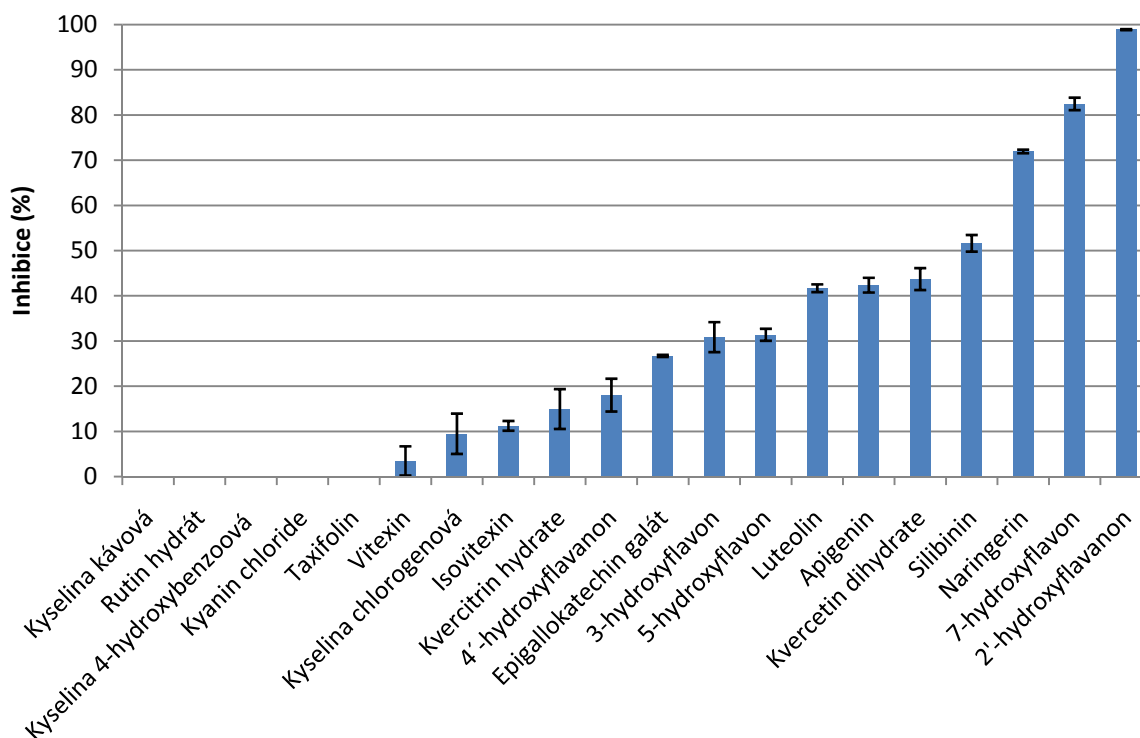
5.1.1 Screening inhibičních účinků flavonoidů na AKR1C3

Pro testování inhibičního účinku AKR1C3 jsme si vybrali 20 flavonoidů a příbuzných fenolických látek, které se poměrně hojně vyskytují v lidské stravě - vitelin, isovitexin, 2'-hydroxyflavanon, 4'-hydroxyflavanon, 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon, 7-hydroxyflavon, kvercitin dihydrát, kávová kyselina, naringenin, chlorogenová kyselina, rutin hydrát, 4-hydroxybenzoová kyselina, kvercitrin hydrát, epigallokatechin galát, kyanin chlorid, luteolin, (±)-taxifolin hydrát, silibinin, apigenin. Jejich struktury a výskyt ve stravě jsou uvedeny v příloze 2. Na obrázku 14 je ukázka chromatogramu HPLC metody pro stanovení redukční aktivity AKR1C3 (viz 4.7).



Obr. 14 - Chromatogram HPLC metody pro stanovení celkového množství 11-dihydrooracinu (DHO), metabolitu oracinu, která se používá pro výpočet redukční aktivity AKR1C3 a míry jeho inhibice a také určení redukční aktivity purifikovaných frakcí. Retenční čas DHO 2,8 min

Jako první jsme stanovili inhibiční účinek všech vybraných látek na AKR1C3 při koncentraci 20 μM . Tuto koncentraci jsme si vybrali z toho důvodu, abychom se pohybovali v takových koncentracích flavonoidů, které by případně mohly mít klinický dopad a které jsou, byť po opakovaném podávání, dosažitelné v lidském organismu. Je totiž známo, že hladiny flavonoidů v plazmě se obvykle pohybují v nízkých μM až nM koncentracích v závislosti na složení stravy (Paganga and Rice-Evans 1997; Scalbert and Williamson 2000).

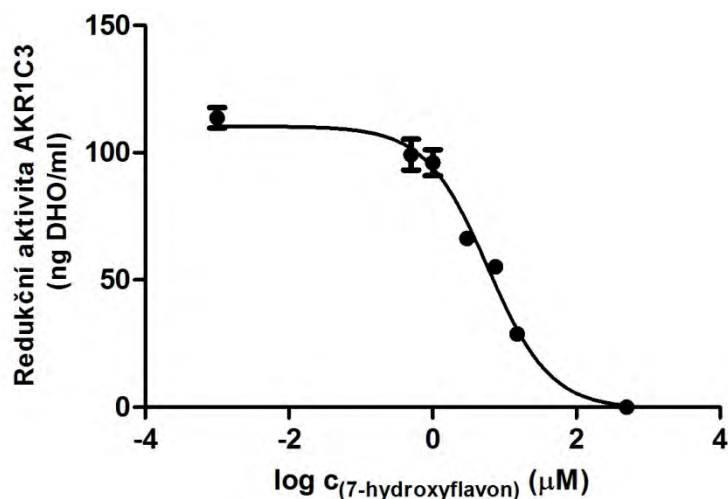


Ob. 15 - Inhibiční efekt vybrané skupiny flavonoidů a příbuzných fenolických látek v koncentraci 20 μM na aktivitu AKR1C3

Jak je vidět na obrázku 15, pět látek nevykazuje v koncentraci 20 μM žádný inhibiční efekt na AKR1C3 a dalších osm látek v dané koncentraci vykazují nepříliš velký inhibiční efekt na sledovaný enzym. Nejsilnějšími inhibitory v koncentraci 20 μM AKR1C3 jsou 2'-hydroxyflavanon (98,9% inhibice), 7-hydroxyflavon (82,5% inhibice) a naringenin (71,9% inhibice). Dalšími docela silnými inhibitory jsou luteolin, apigenin, kvercetin a silibin (inhibice kolem 50 %). Všechny tyto látky byly dále testovány a byla určena jejich IC_{50} .

5.1.2 Určení IC_{50} vybraných inhibitorů AKR1C3 a typu inhibice

Vybrané flavonoidy byly podrobeny dalšímu testování, byla sledována míra inhibice AKR1C3 při různých koncentracích tak, jak je popsáno v části 4.2.4 a z těchto výsledků byly určeny inhibiční koncentrace IC_{50} pro jednotlivé látky v softwaru GraphPad Prism 5.00. Tyto hodnoty byly určeny ze závislosti redukční aktivity enzymu na log koncentraci inhibitoru, jak je ukázáno na obrázku 16.



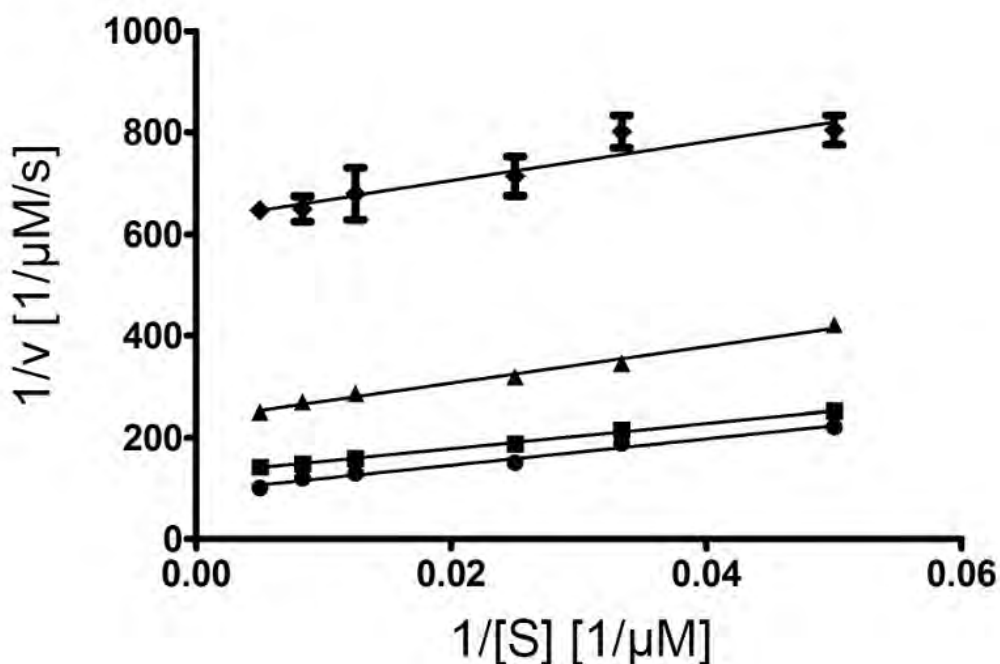
Obr. 16 - Graf závislost redukční aktivity AKR1C3 na log koncentrace inhibitoru, z kterého se určuje poloviční inhibiční konstanta IC_{50}

Z tabulky 1 je patrné, že nejsilnějším inhibítorem je 2'-hydroxyflavanon s velmi nízkou hodnotou IC_{50} . Za silné inhibitory lze ještě považovat naringenin, 7-hydroxyflavon a silibinin. Ostatní látky vykazují vyšší hodnotu IC_{50} , kolem 20 μM .

Tab. 1 - Hodnoty IC_{50} pro nejsilnější inhibitory AKR1C3 z vybrané skupiny testovaných flavonoidů

Flavonoid	IC_{50} (μM)
2'-hydroxyflavanon	0,3
Naringenin	2,4
7-hydroxyflavon	4,9
Silibinin	6,2
Kvercetin	18,8
Apigenin	21,8
Luteolin	37,4

Pro nejsilnější inhibitor AKR1C3 2'-hydroxyflavanon byl také stanoven typ inhibice (viz obr. 17). Výsledek je poměrně zajímavý, protože z grafu je patrné, že inhibice je akompetitivní, což znamená, že inhibitor se může na enzym vázat, pouze v případě, když už je přítomen substrát, nikoliv však na volný enzym.



Obr. 17 - Dvojitě reciproký graf Lineweavera a Burka závislosti rychlosti reakce na koncentraci oracinu při různých koncentracích 2'-hydroxyflavanonu. Použité koncentrace 2'-hydroxyflavanonu (●) 0 nM, (■) 100 nM, (▲) 300 nM, (◆) 1000 nM

5.1.3 Stanovení selektivity inhibice AKR1C3

Dva silné inhibitory 2'-hydroxyflavanon a 7-hydroxyflavon byly vybrány pro stanovení selektivity inhibice pro AKR1C3. Dle popsaného postupu v části 4.2.5 byly tyto flavonoidy inkubovány vedle AKR1C3 také s AKR1C1 a AKR1C2. V tabulce 2 je uvedeno porovnání jejich IC_{50} . 2'-hydroxyflavanon inhibuje AKR1C3 20krát silněji než AKR1C1. Zajímavě se ukázalo, že 7-hydroxyflavon je daleko silnější inhibitor AKR1C1 než AKR1C3, vykazuje totiž 65krát silnější inhibici AKR1C1.

Tab. 2 - Selektivita inhibice AKR1C enzymů 2'-hydroxyflavanonem a 7-hydroxyflavonem

	2'-hydroxyflavanon IC_{50} (μ M)	7-hydroxyflavon IC_{50} (μ M)
AKR1C1	6,2	0,075
AKR1C2	47,1	38,9
AKR1C3	0,3	4,9

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že 2'-hydroxyflavanon je silným a selektivním inhibitorem AKR1C3, který by mohl být díky velmi nízké hodnotě IC_{50} klinicky využitelný v terapii hormon-dependentních malignit, kde je AKR1C3 ve zvýšené míře exprimován.

5.1.4 Shrnutí a diskuze výsledků inhibice AKR1C3 flavonoidy

Jak je znázorněno na obrázcích 6, 8 a v příloze 1, AKR1C3 redukuje slabý estrogen estron na aktivní estradiol a slabý androgen 4-androstendion na silný testosteron. Tyto aktivní pohlavní hormony mohou pak stimulovat proliferaci hormon-dependentních nádorových buněk prostaty, prsu a endometria. Navíc AKR1C3 může přispívat k proliferaci i hormon-independentních buněk přes tvorbu prostaglandinů ze skupiny PGF_2 (viz obr. 9). Z toho důvodu AKR1C3 může být vhodným cílem pro léčbu těchto typů nádorových onemocnění.

V této studii jsme se snažili nalézt inhibitory AKR1C3 ze skupiny přírodních látek, flavonoidů a příbuzných fenolických látek, které se běžně vyskytují v lidské stravě. Inkubovali jsme rekombinantní formu AKR1C3 se substrátem oracinem za přítomnosti NADPH-generujícího systému a jednotlivých potenciálních inhibitorů. Zjistili jsme, že celá řada látek vykazuje k AKR1C3 určitý inhibiční efekt, přičemž nejsilnějším inhibitorem je 2'-hydroxyflavanon ($\text{IC}_{50} = 0,3 \mu\text{M}$) a následuje naringenin ($\text{IC}_{50} = 2,4 \mu\text{M}$), 7-hydroxyflavon ($\text{IC}_{50} = 4,9 \mu\text{M}$) a silibinin ($\text{IC}_{50} = 6,2 \mu\text{M}$). Ostatní látky už mají hodnoty IC_{50} vyšší, 20 a více μM . Tyto výsledky jsme se snažili porovnat s již publikovanými výsledky (Krazeisen et al. 2001). Krazeisen et al. používali pro stanovení IC_{50} jiné podmínky, kde jako substrát AKR1C3 používali 4-androstendion a detekce byla založena na scintilaci. I když hodnota IC_{50} na podmínkách stanovení závisí, mělo by být možné výsledky alespoň kvalitativně porovnávat. Jako nejlepší inhibitory AKR1C3 se jejich v studii ukázaly být zearalenon ($\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{M}$), kumestrol ($\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{M}$) a kvercetin ($\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{M}$). V porovnání s našimi závěry si zde kvercetin vede lépe, zajímavé je také to, že zde 7-hydroxyflavon ($\text{IC}_{50} = 24 \mu\text{M}$) a naringenin ($\text{IC}_{50} = 33 \mu\text{M}$) nevykazovaly příliš dobré inhibiční vlastnosti. Jediný apigenin vykazuje v obou studiích podobnou účinnost inhibice. 2'-hydroxyflavanon bohužel nebyl testován. Proč jsou mezi výsledky takové rozdíly, není bohužel známo.

V nedávné době byly také publikovány práce, kde jsou inhibitory enzymů AKR1C látky na bázi nesteroidních antiflogistik (NSAID). Bylo zjištěno, že nejlepšími inhibitory AKR1C3 jsou látky odvozené od indometacinu - nejvyšší účinnost byla nalezena pro N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin (CBM) ($\text{IC}_{50} = 11,4 \mu\text{M}$), který vykazuje selektivitu pro AKR1C3 a navíc neinhibuje prostaglandin- H_2 -synthasu. Oproti tomu pro AKR1C1 se nejlepšími inhibitory ze skupiny NSAID zdají být deriváty kyseliny salicylové (Byrns et al. 2008; Byrns and Penning 2009). I my jsme v rámci studie otestovali selektivitu zatím alespoň dvou nejúčinnějších inhibitorů pro AKR1C3. 2'-hydroxyflavanon vykazuje selektivitu pro AKR1C3 vzhledem k AKR1C1 (20krát nižší inhibice) a AKR1C2 (velice slabá inhibice). Překvapivé výsledky byly nalezeny pro 7-hydroxyflavon, protože se ukázalo, že je 65krát silnějším inhibitorem AKR1C1 ($\text{IC}_{50} = 0,075 \mu\text{M}$) než AKR1C3 ($\text{IC}_{50} = 4,9 \mu\text{M}$). I tento výsledek může být potenciálně klinicky využitelný, protože AKR1C1 pravděpodobně hraje

důležitou roli v hormon-dependentním nádoru endometria (viz část 2.3.1.2). Navíc je tento výsledek ve shodě s výsledky publikovanými Brozic et al., kde se také ukázalo, že nejsilnějšími inhibitory AKR1C1 jsou právě 7-hydroxyflavon ($IC_{50} = 14 \mu M$) a naringenin ($IC_{50} = 14,2 \mu M$) (Brozic et al. 2006).

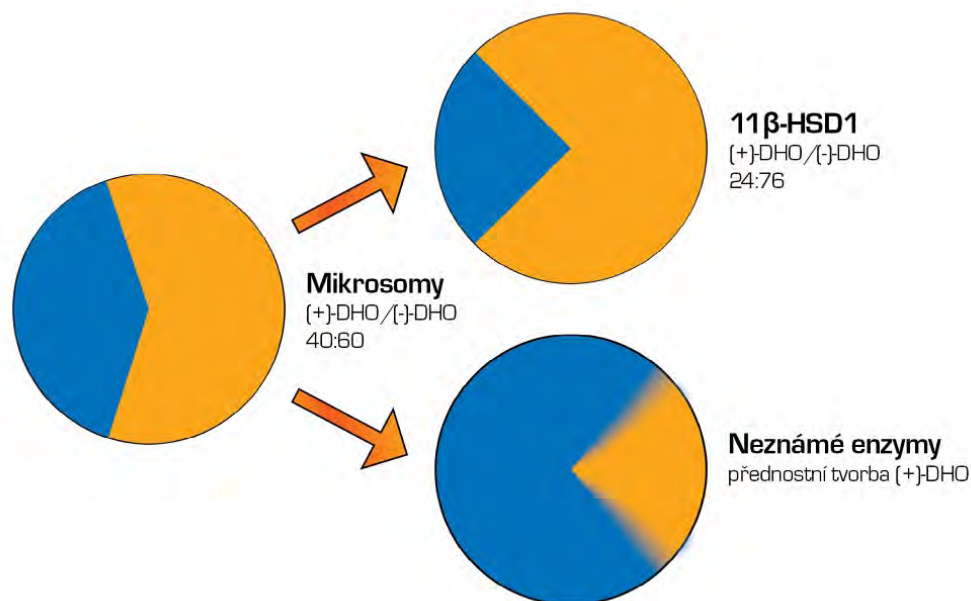
Naše výsledky z *in vitro* experimentů ukazují, že flavonoidy jsou silnými inhibitory AKR1C3 a AKR1C1. Ale jaká by byla situace *in vivo*? Je možné dosáhnout takových koncentrací flavonoidů ve tkáních? Bohužel jsou tyto informace prakticky neznámé, i plasmatické koncentrace při normální dietě a dietě s vyšším obsahem zeleniny a ovoce jsou známe pouze pro některé flavonoidy. Například koncentrace naringeninu je normálně poměrně nízká (4,8 nM), ale po 5týdenní dietě s obsahem zeleniny a citrusů došlo ke zvýšení jeho hladiny na 113 nM (Erlund et al. 2002). Po jednorázové dávce grapefruitového džusu vzrostla hladina naringeninu v průměru až na 6 μM . Zde byly pozorovány velké interindividuální rozdíly, přičemž maximální koncentrace dosáhla až 14,8 μM (Erlund et al. 2001). V naší studii jsme našli pro inhibici AKR1C3 naringeninem *in vitro* hodnotu $IC_{50} = 2,4 \mu M$, takže je pravděpodobné, že takových hodnot, které by ovlivňovaly AKR1C3 a tedy metabolismus hormonů *in vivo* by bylo pro naringenin a snad i pro ostatní flavonoidy možné dosáhnout.

Závěrem tedy lze říci, že jsme našli silný a selektivní inhibitor AKR1C3 2'-hydroxyflavanon, který by díky velice nízké hodnotě $IC_{50} = 300 \text{ nM}$ mohl být klinicky využitelný pro léčbu hormon-dependentních nádorů, pokud se potvrdí jeho výrazná selektivita.

5.2 Purifikace a charakterizace nové mikrosomální

karbonylreduktasy účastnící se metabolismu xenobiotik

Teoretický podklad daného projektu, který se zabýval purifikací nové lidské jaterní mikrosomální karbonylreduktasy, která se účastní metabolismu oracinu, byl popsán v části 2.3.4.2, která pojednává o metabolismu oracinu a také v části 3, kde byly vytyčeny cíle práce. Stručně zde zopakují, že nová mikrosomální karbonylreduktasa byla purifikovaná na základě rozdílu ve stereospecifitě redukce oracinu mezi lidskou jaterní mikrosomální frakcí a dosud jedinou popsanou lidskou mikrosomální karbonylreduktasou, která se podílí na biotransformaci xenobiotik, 11 β -HSD1. Tento rozdíl poukazuje na nutnou účast dalšího dosud neznámého mikrosomálního enzymu na biotransformaci oracinu, tentokrát s preferencí pro (+)-enantiomer DHO (Wsol et al. 2004). Tato situace je zachycena na obrázku 18.



Obr. 18 - Stereospecifita biotransformace oracinu lidskými jaterními mikrosomy a lidskou purifikovanou 11β-HSD1. Jejich rozdíl ukazuje na přítomnost dalšího zatím neznámého mikrosomálního enzymu s preferencí pro tvorbu (+)-DHO

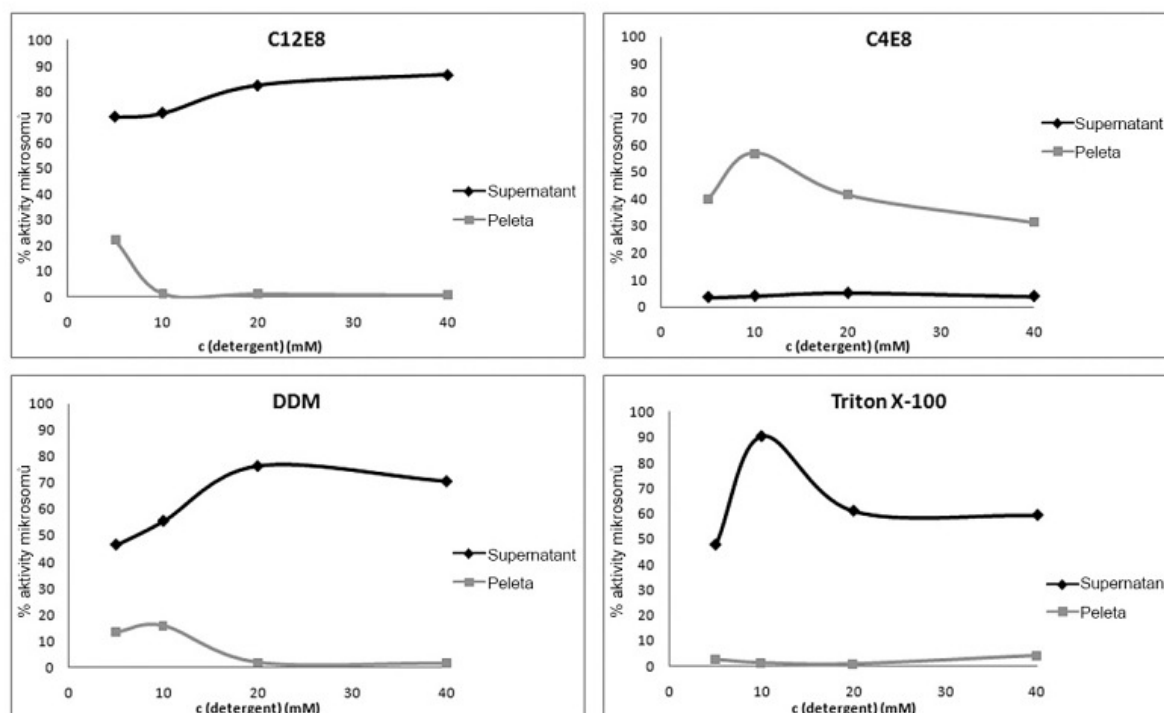
Oracin je v tomto projektu používán víceméně jen jako modelový substrát, protože je snadno redukovatelný a z předchozích let máme k dispozici jednoduchou a velice citlivou HPLC metodu pro stanovení jeho metabolitu. Předpokládáme ale, že získané výsledky budou mít obecnější platnost, tedy že se nebudou dotýkat pouze biotransformace oracinu.

5.2.1 Optimalizace solubilizace

Naprosto stěžejní krok pro práci s membránově vázanými proteiny je jejich uvolnění do roztoku se současným zachováním funkčnosti, tedy solubilizace. Membránové proteiny jsou ze své podstaty vždy alespoň do určité míry hydrofobní, takže práce s nimi v běžně používaných vodných roztocích není zcela jednoduchá. Přirozeně jsou zasazené v lipidové membráně, takže i ve vodných roztocích je jim nutné zajistit prostředí, které splňuje jejich hydrofobní nároky a pomůže zachovat jejich přirozenou funkci. Komponenty, které toto dokážou zajistit, jsou detergenty, které jsou pro práci s membránově vázanými proteiny naprosto nezbytné. Detergenty jsou amfipatické molekuly, které ve vodných roztocích vykazují jedinečné vlastnosti. Spontánně tvoří sférickou micelární strukturu, v jejímž centru jsou hydrofobní části detergentu a na povrchu hydrofilní části. Vytváří tak strukturu podobnou buněčné membráně, do které se membránové proteiny vloží a i ve vodném roztoku jsou tak v prostředí, které umožní zachování jejich vlastností. Detergenty samy o sobě by mohly být téma celé disertační práce, je jich obrovské množství a dělí se do několika skupin. Obecně platí, že neexistuje žádný univerzální detergent, vždy závisí na

typu membránového proteinu, takže nalezení vhodného detergentu pro danou aplikaci odpovídá metodě pokus-omyl (Maire et al. 2000; Seddon et al. 2004).

Protože jsme se snažili solubilizovat mikrosomy a v nich obsažený protein, o kterém jsme vlastně nic, kromě stereospecifity pro (+)-DHO, nevěděli, nebylo ani jednoduché vybrat vhodný solubilizační postup. Vyšli jsme z postupu používaného skupinou prof. Masera při solubilizaci 11 β -HSD1 (Maser et al. 2002), který se zdá být zatím nejpodobnějším enzymem, který byl z lidských jater úspěšně purifikován v aktivním stavu. Složení solubilizačního pufru (typ a koncentrace detergentu) bylo optimalizováno pro naše potřeby. Je nutné zavést takovou solubilizaci, která umožní uvolnit enzym z membrány, ale zároveň zachová jeho trojrozměrnou strukturu a tím i funkci. Byly vybrány čtyři různé neiontové detergenty z různých podskupin a z nich byly podle postupu v části 4.3.2 připraveny různé solubilizační pufrы a stanovena jejich účinnost. Koncentrace detergentů byla zvolena tak, aby poměr detergent:protein byl 1:1, 2:1, 3:1, 4:1. Redukční aktivita byla stanovena v supernatantu (solubilizované mikrosomy) i v peletě. Součet obou redukčních aktivit nedává bohužel 100 %, protože peletu nebylo možné dokonale resuspendovat.



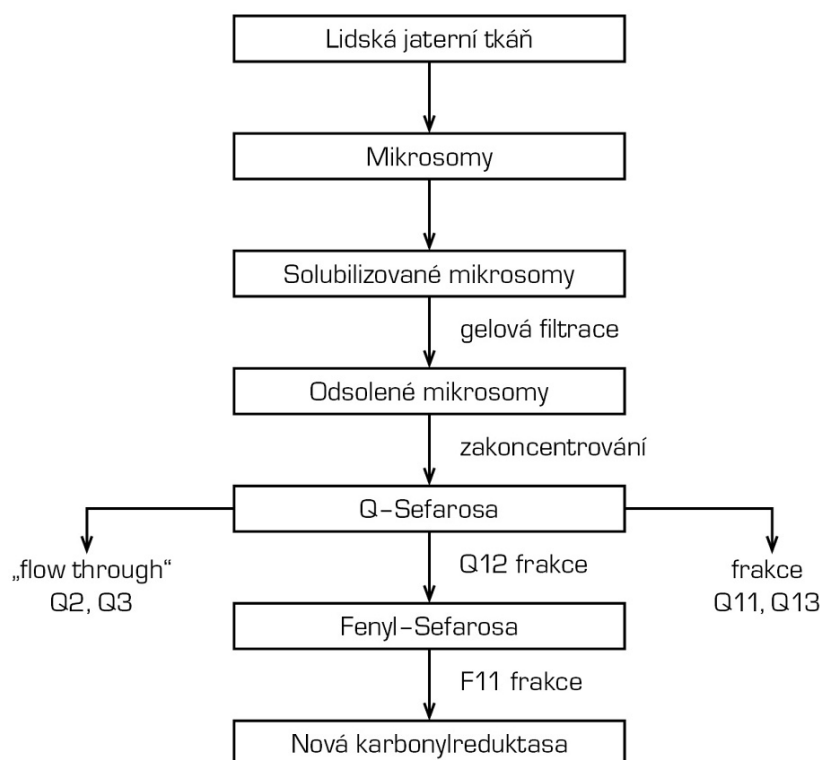
Obr. 19 - Stanovení nejvhodnějšího detergentu pro solubilizaci lidských jaterních mikrosomů pro potřeby purifikace nové lidské jaterní mikrosomální karbonyreduktasy. Účinnost jednotlivých detergentů je vyjádřena jako % původní redukční aktivity mikrosomů v supernatantu

Z obrázku 19 je patrné, že nejúčinnější detergenty jsou Triton X-100 a C12E8, které dosahují 90% výtěžku původní redukční aktivity mikrosomů. C12E8 dosahuje takových

výtěžků až při poměrně vysoké koncentraci, která by pak přinášela obtíže v dalším postupu, proto byl pro další práci byl vybrán Triton X-100 v koncentraci 10 mM odpovídající poměru protein:detergent 1:2. V solubilizačním postupu používaném při purifikaci 11 β -HSD1 byl k solubilizovaným mikrosomům přidáván ještě iontový detergent, cholát sodný, který jsme my vynechali, protože by docházelo zbytečně ke zvyšování iontové síly, což by interferovalo s prvním purifikačním krokem, kterým je iontově-výměnná chromatografie. Díky vysokému obsahu NaCl v solubilizačním pufru bylo nutné solubilizované mikrosomy odsolit pomocí gelové filtrace na sefadexu G-25. Po odsolení byly pak mikrosomy zakoncentrovány pomocí ultrafiltrace ve zkumavkách Amicon.

5.2.2 Purifikace nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy

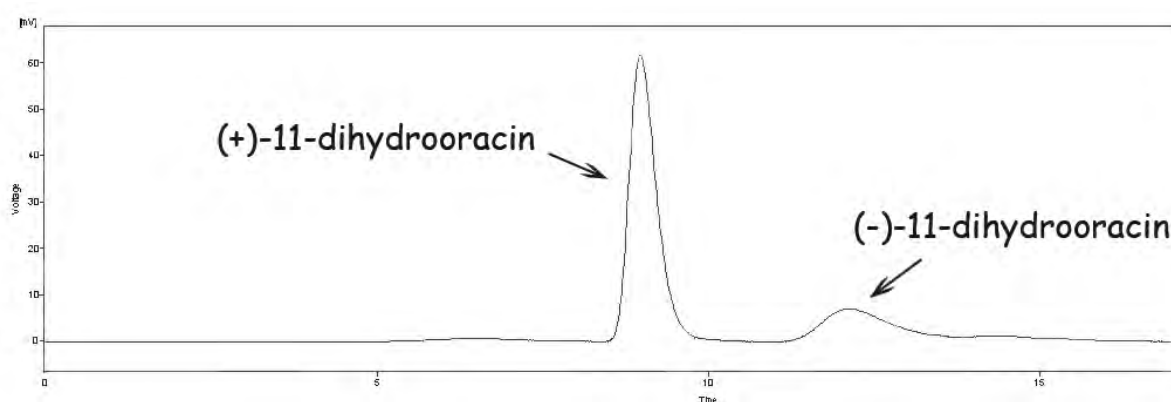
Purifikace neznámého proteinu, u něhož nejsou známy vlastnosti, které by se daly využít při návrhu purifikačního postupu, je poměrně obtížná. Proto bylo nutné vycházet z obecně doporučovaných kombinací chromatografických purifikačních kroků. Pro neznámý protein je jako nejvhodnější popsána kombinace iontově-výměnné chromatografie (IEX) a hydrofobně-interakční chromatografie (HIC) (Anonymous 2001), proto jsme tuto kombinaci použili také. Na obrázku 20 je schéma jednotlivých kroků purifikačního schématu, jak už bylo popsáno v experimentální části.



Obr. 20 - Schéma postupu pro purifikaci nové lidské jaterní mikrosomální karbonyl reduktasy

I když schéma na obrázku 20 vypadá poměrně jednoduše, není tento postup tak jednoduchý už kvůli obtížím práce s mikrosomálními proteiny, jak bylo naznačeno v části 5.2.1.

U všech frakcí během celého purifikačního postupu muselo být stanoveno několik parametrů - redukční aktivita, stereospecificita redukce oracinu a obsah proteinu. Stanovení redukční aktivity bylo popsáno v části 4.3.4 a 4.3.7 a chromatogram HPLC metody pro stanovení celkového množství DHO, který se pro výpočet redukční aktivity používá je na obrázku 14. Stanovení enzymové stereospecificity bylo také popsáno v experimentální části (části 4.3.4 a 4.3.8) a chromatogram chirální separace a stanovení obou enantiomerů DHO je na obrázku 21.

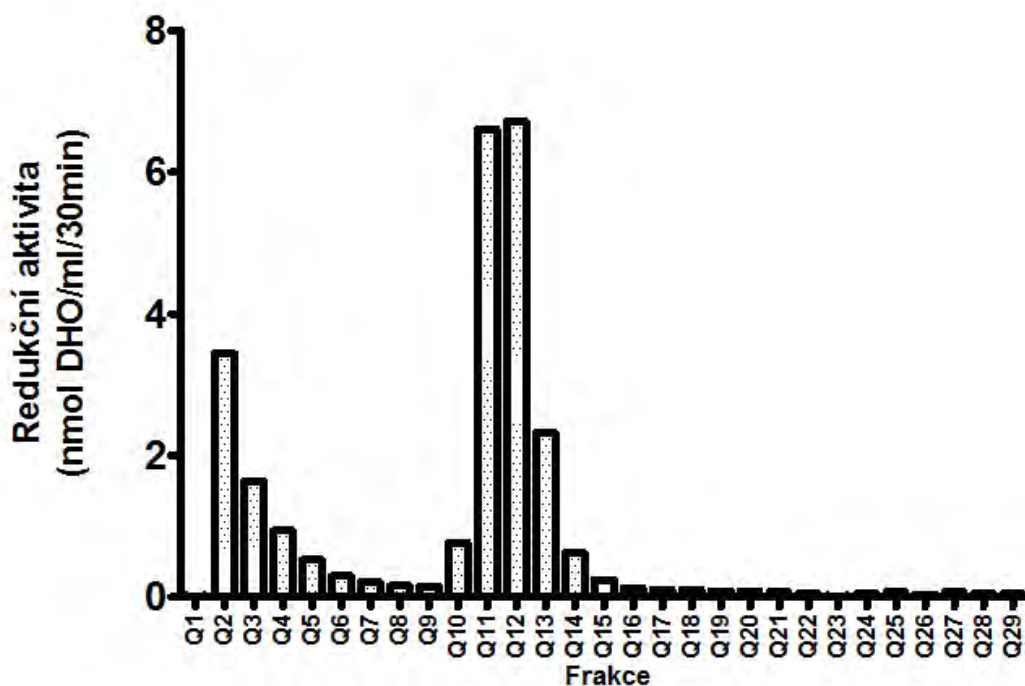


Obr. 21 - Chromatogram chirální HPLC metody pro stanovení obou enantiomerů 11-dihydrooracinu (DHO), která byla používána pro zjištění enzymové stereospecificity

5.2.2.1 První krok purifikace - separace na Q-sefarose

Solubilizované mikrosomy byly odsoleny a koncentrovány a až po té aplikovány na kolonu s Q-sefarosou. Separační schopnost Q-sefarosy je založena na principu iontové výměnné chromatografie, a pro první purifikační krok byla kolona vybrána na základě obecných doporučení pro purifikaci neznámých proteinů. Jako funkční skupiny jsou na sefarosové matici navázané kvarterní amoniové ionty (Q), jedná se tedy o anion-výměnnou chromatografii. Pufry, které byly používány pro tuto separaci, také obsahují Triton X-100 v koncentraci, která odpovídá poměru protein:detergent 1:2 vzhledem ke koncentraci proteinu odsolených koncentrovaných mikrosomů. Triton X-100 je přítomný kvůli tomu, aby už jednou uvolněné proteiny z membrány byly stále v prostředí, které je vhodné pro zachování jejich aktivity a nedocházelo zbytečně k jejich deaktivaci. Navázané proteiny byly z kolony vymývány pomocí zvyšujícího se gradientu NaCl, přičemž byl gradient volen na základě obecných doporučení z příručky k používané koloně. Obrázek 22 ukazuje rozložení redukčních aktivit ve frakcích získaných po prvním purifikačním kroku. Frakce,

kteřé jímáme na začátku (Q1-Q3) jsou označovány jako tzv. protékající frakce, tedy frakce obsahují proteiny, které vůbec neinterakují s funkční skupinou kolony (Q). Z hlediska purifikace jsou důležitější ty frakce, které se na koloně váží (Q10 a dále) a jsou pak z kolony vymývány postupným gradientem NaCl.



Obr. 22 - Rozložení redukčních aktivit ve frakcích získaných po prvním purifikačním kroku tedy separaci na Q-sefaroze

Celkový výtěžek redukční aktivity po tomto kroku byl 80 % původní redukční aktivity aplikované na kolonu. U frakcí, které měly významnější redukční aktivitu, byla stanovena i jejich stereospecifita pro redukcí oracinu (viz tab. 3).

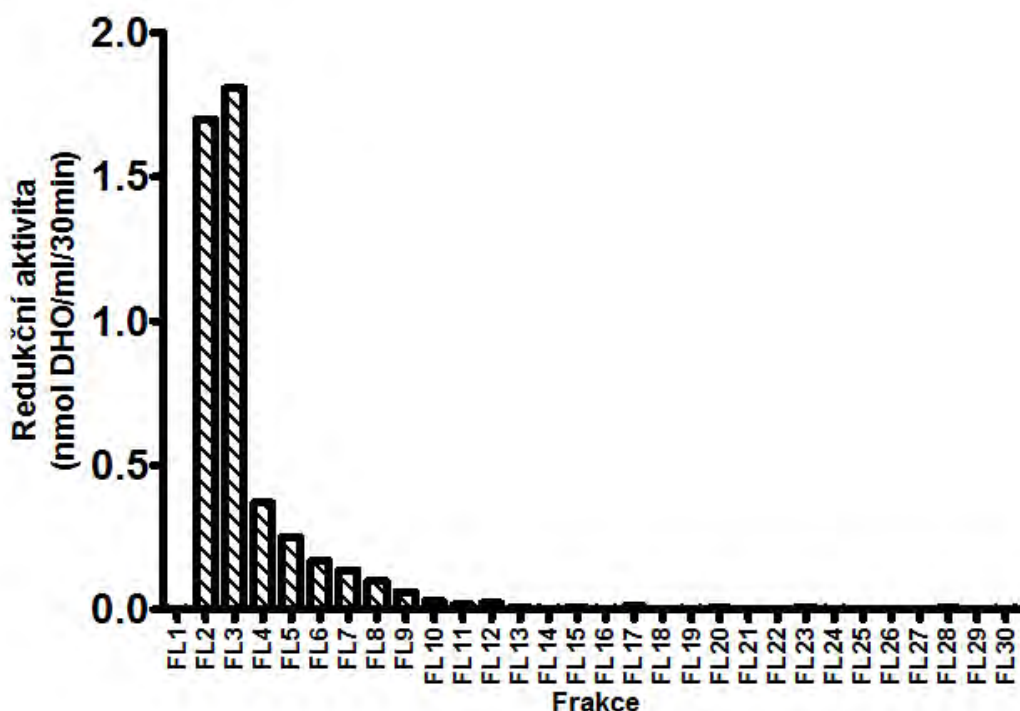
Tab. 3 - Enzymová stereospecifita frakcí, získaných separací odsolených koncentrovaných lidských mikrosomů na Q-sefaroze, v metabolismu oracinu

Frakce	(+)-DHO/(-)-DHO
Q2	56/44
Q3	70/30
Q4	77/23
Q10	77/23
Q11	78/22
Q12	82/18
Q13	73/27
Q14	74/26

Jak je patrné z tab. 3, nejlepší charakteristiku co se týká očekávané enzymové stereospecifity purifikované mikrosomální karbonylreduktasy měla frakce Q12, která tvořila 82 % (+)-DHO a zároveň je to také frakce s nejvyšší redukční aktivitou. Jak je vidět na obrázku 22 a jak bylo naznačeno i na obrázku 20, mimo Q12 frakce, která byla použita pro druhý purifikační krok, jsme získali i další frakce, které by se daly v budoucnu využít pro další purifikační schéma.

5.2.2.2 Optimalizace druhého purifikačního kroku

Pro druhý krok purifikace bylo nutné nalézt nejvhodnější hydrofobně-interakční chromatografickou (HIC) kolonu. Na trhu je široká nabídka lišící se velikostí matrice a navázanými hydrofobními funkčními skupinami. Testovali jsme tři různé kolony, abychom mohli vybrat tu, která se pro naše účely jeví jako nejvhodnější. Jako první byla testována HiTrap Phenyl-sepharose 6 FF low sub (pro jednoduchost byla pojmenovaná Fenyl low). Podmínky separace jsou popsány v části 4.3.3.4. Tato kolona má sefarovou matici o velikosti 90 μm , na které jsou navázány fenylové funkční skupiny. Rozložení redukčních aktivit ve frakcích získaných po separaci na této koloně je na obrázku 23.

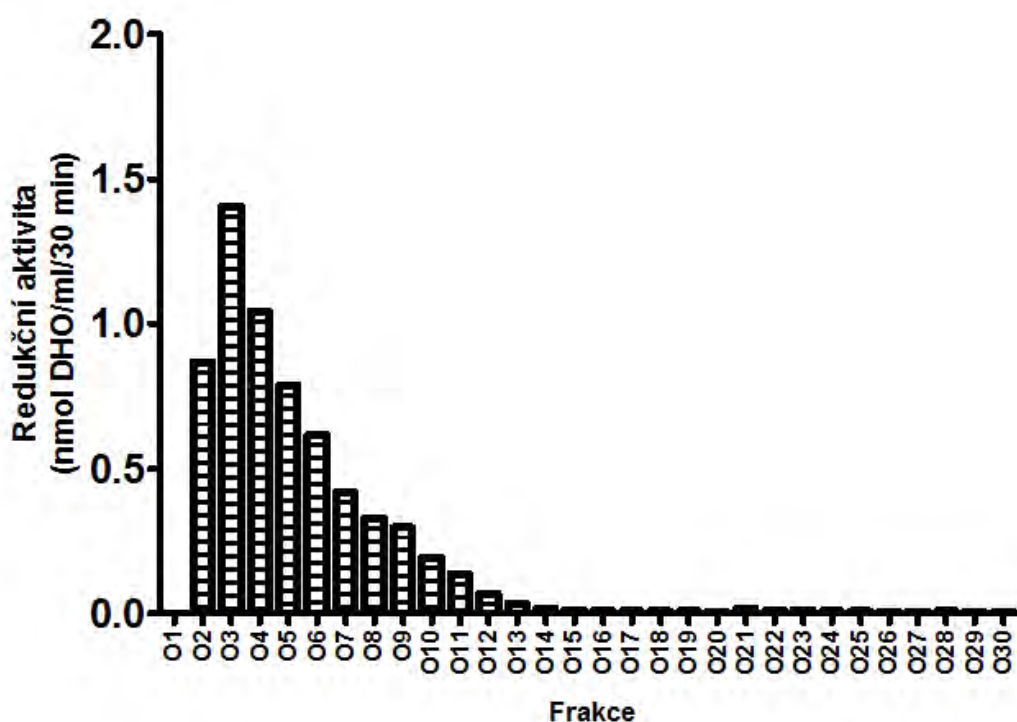


Obr. 23 - Rozložení redukčních aktivit ve frakcích získaných po separaci frakce Q12 na koloně HiTrap Phenyl-sepharose 6 FF low sub (Fenyl low - frakce značeny FL)

Je vidět, že většina redukční aktivity je soustředěna ve frakcích FL2 a FL3, což jsou tzv. protékající frakce, takže je jasné, že většina proteinů ve vzorku, získaném po prvním

purifikačním kroku na Q-sepharose s kolonou Fenyl low neinteraguje, takže vlastně nedochází k dělení proteinů.

Druhou zkoušenou kolonou byla HiTrap Octyl 4 FF (pro jednoduchost byla označena pouze Oktyl), podmínky separace jsou také uvedeny v části 4.3.3.4. Oktyl kolona je naplněna sefarovovou maticí o velikosti 90 μm s navázanými hydrofobními oktylovými skupinami. Všechny získané frakce byly opět testovány na redukční aktivitu a výsledek je na obrázku 24.



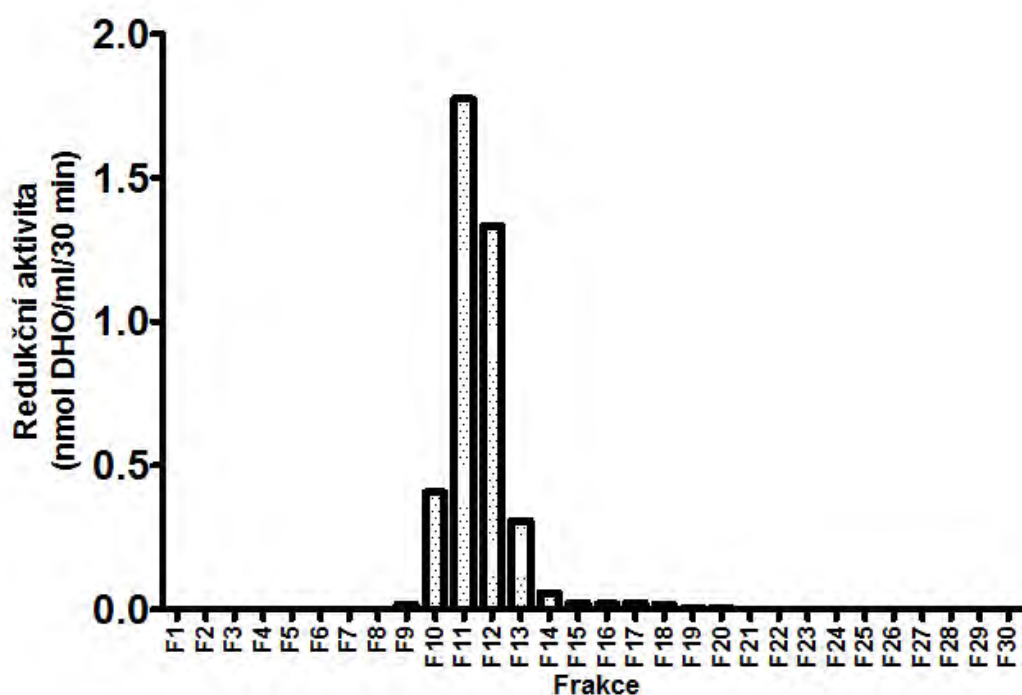
Obr. 24 - Rozložení redukčních aktivit ve frakcích získaných po separaci frakce Q12 na koloně HiTrap Octyl 4 FF (Oktyl - frakce značeny O)

Zde už došlo k určitému rozdělení proteinů, protože od frakce 6 jsou proteiny vázány na kolonu vymývány pomocí snižující se koncentrace síranu amonného. Ale i tak je většina redukční aktivity v počátečních frakcích, kde proteiny pouze volně projdou kolonou, takže ani Oktyl kolona se nezdá být vhodnou pro naše potřeby v druhém purifikačním kroku.

Pokud se většina proteinů vymývá na začátku a nedochází k interakci mezi proteiny a funkčními skupinami kolony je možné hydrofobní interakce při separaci zvýšit. Existuje pro to několik možností, je možné změnit sůl, která je pro vznik hydrofobní interakce nezbytná, popř. zvýšit pouze její koncentraci. Tyto možnosti jsme ale nemohli využít, protože $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je jedna z nejsilnějších solí poskytující hydrofobní interakce a při

zvýšení koncentrace nad používaný 1 M, hrozí vysoké riziko precipitace proteinu a tedy i zničení jeho aktivity. Dalšími možnostmi jsou zvýšení teploty či výraznější snížení pH, které opět mohou poškodit nativní konformaci proteinu a tedy i jeho aktivitu.

Protože už nebylo možné jednoduše zvýšit sílu hydrofobních interakcí u používaných kolon, bylo možné ještě vyzkoušet kolonu s vyšší hustotou navázaných funkčních skupin tedy v tomto případě HiTrap Phenyl-sepharose HP kolonu (pro jednoduchost označena Fenyl HP), která se od předchozí Fenyl low také liší ve velikosti matrice (34 μm). Stejně jako u předchozích dvou kolon, i zde byly stanoveny redukční aktivity u jednotlivých frakcí a jejich rozložení je znázorněno na obrázku 25.



Obr. 25 - Rozložení redukčních aktivit ve frakcích získaných separací rakce Q12 na koloně HiTrap Phenyl-sepharose HP (označena Fenyl HP - frakce značené jen F)

Kolona Fenyl HP se jevila jako nejvhodnější pro tento typ separace, protože bylo získáno pouze několik redukčně aktivních frakcí, přičemž proteiny obsažené v těchto frakcích interagují s hydrofobními fenylovými skupinami, protože se všechny eluují až v oblasti snižujícího se gradientu síranu amonného. Proto byl tento typ separace vybrán pro druhý purifikační krok. V tab. 4 jsou uvedeny enzymové stereospecifity jednotlivých frakcí získaných po separaci na Fenyl HP, které měli výraznější redukční aktivitu.

Tab. 4 - Enzymové stereospecity frakcí získaných separací frakce Q12 z prvního purifikačního kroku na Fenyl-sefarose HP, v metabolismu oracinu

Frakce	(+)-DHO/(-)-DHO
F10	86/14
F11	86/14
F12	85/15
F13	85/15

Frakce F11 byla již výrazně purifikovaná frakce a obsahovala lidskou mikrosomální karbonyl reduktasu. Měla také očekávanou stereospecifitu, tvořila 86 % (+)-DHO a navíc měla i z frakcí po Fenyl HP nejvyšší redukční aktivitu. Pro úplné vyčištění frakce by mohli následovat dvě různé cesty. Mohl by být buď zařazen další purifikační krok, který by přinesl další ztráty cílového proteinu. Díky už tak nízké koncentraci proteinu ve frakci F11 je lépe ale zvolit jinou možnost. Alternativou může být rozdělení proteinů frakce F11 na elektroforéze, izolace a identifikace elektroforetického proužku odpovídajícího nové mikrosomální karbonylreduktase. O tuto druhou možnost jsme se pokusili a výsledky jsou uvedeny v části 5.2.5.

5.2.2.3 Shrnutí purifikace

Purifikační postup je shrnut v následující tabulce 5. Pro jednotlivé kroky byla určena specifická aktivita, což je enzymatická aktivita vztažená na koncentraci proteinu v dané frakci. Tento parametr musí během úspěšné purifikace vzrůstat. I v případě purifikace nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy specifická aktivita vzrůstá, ale výsledné přečištění je „jen“ třiasedmdesatinásobné.

Tab. 5 - Shrnutí purifikačního postupu pro purifikaci nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy

Krok	celková bílkovina (mg)	celková redukční aktivita (nmol/30 min)	Specifická aktivita (nmol/(30 min mg))	přečištění (x-násobek)	stereospecifita ((+)-DHO/(-)-DHO)
Mikrosomy	14,7	151	10	-	40/60
Odsolené a koncentrované mikrosomy	5,5	47,3	9	1	-
Q-sefarosa	0,27	6,7	25	3	82/18
Fenyl-sefarosa HP	0,0015	0,95	633	73	86/14

V porovnání s různými publikovanými purifikacemi proteinů je toto číslo poměrně nízké, běžně se dosahuje přečištění řádu několika set, ale zde je to způsobeno tím, že oracin není specifický substrát pro daný enzym. Jak je patrné z části 2.3.4.2, na metabolismu

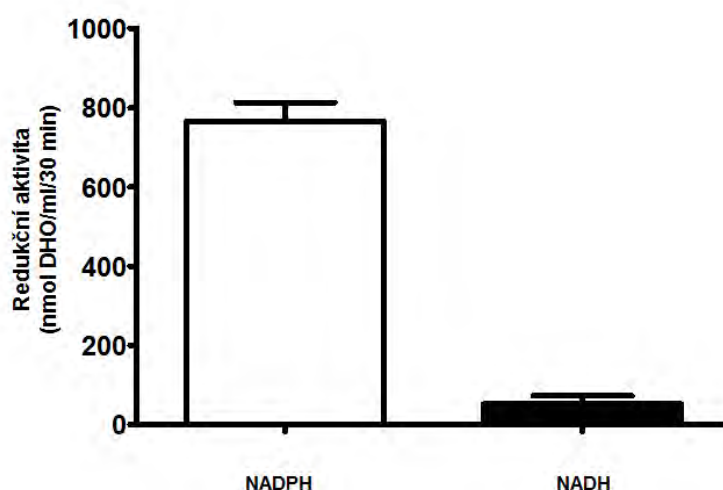
oracinu se podílí řada lidských enzymů jak z cytosolu, tak z mikrosomů. V mikrosomech je mimo námi purifikované mikrosomální karbonylreduktasy přítomna ještě minimálně 11 β -HSD1 a možná i další karbonylreduktasy, které se na jeho metabolismu podílí. Tím je specifická aktivita mikrosomů (resp. odsolených koncentrovaných mikrosomů) uměle zvýšena a výsledné přečištění je proto poměrně nízké. Kdyby byl purifikační postup zopakován se specifickým substrátem pro daný enzym, bylo by také pravděpodobně dosaženo násobně větších hodnot přečištění. Výsledkem purifikačního postupu bylo získání výrazně přečištěné frakce, která metabolisuje oracin se stereospecificitou (+)-DHO/(-)-DHO 86:14, tedy ve shodě s původní myšlenkou. Následující výsledky se zabývají charakterizací této frakce a získáním vzorku pro následnou identifikaci enzymu.

5.2.3 Charakterizace částečně purifikované frakce

I když získaná frakce obsahovala mimo nové a zatím neznámé mikrosomální karbonylreduktasy i některé nečistoty, bylo vhodné jí alespoň částečně charakterizovat, aby bylo jasné, jak významnou roli by mohla hrát v metabolismu oracinu a zda splňuje vlastnosti karbonylreduktas.

5.2.3.1 Stanovení preference ke kofaktoru

Karbonylreduktasy jsou obecně NAD(P)H-dependentní enzymy, mohou tedy využívat jak NADH tak NADPH kofaktor. Vzhledem k distribuci těchto kofaktorů v buňce (diskutováno v 2.2.1), ale preferenčně využívají při redukčních reakcích NADPH. Bylo zjištěno, že nová lidská mikrosomální karbonylreduktasa je NADPH-dependentním enzymem, jak je znázorněno na obrázku 26.

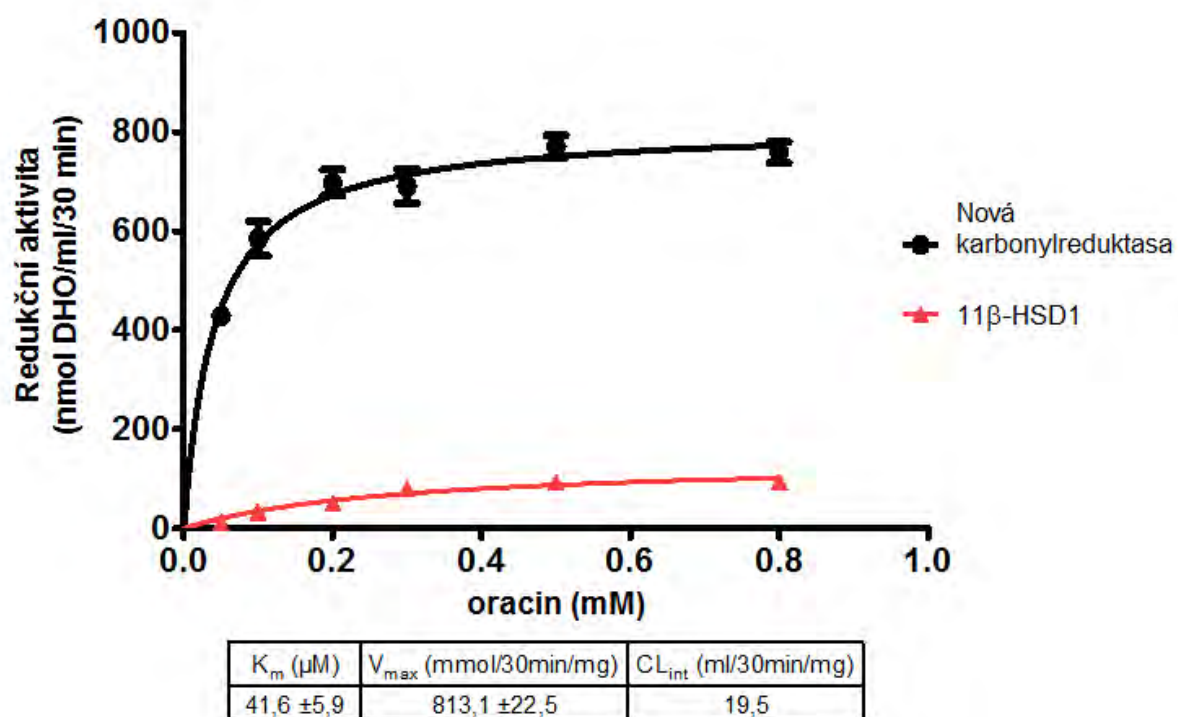


Obr. 26 - Porovnání redukční aktivity nové mikrosomální karbonylreduktasy v metabolismu oracinu za přítomnosti kofaktoru NADPH nebo NADH

5.2.3.2 Stanovení kinetických parametrů

Pro frakci obsahující novou mikrosomální karbonylreduktasu byly stanoveny také kinetické parametry, aby bylo možné porovnat její účinnost a případný význam v metabolismu oracinu vůči enzymům, jejichž účast na biotransformaci oracinu byla již popsána (viz část 2.3.4.2). Získaný graf Michaelis-Mentenové spolu s vypočítanými kinetickými parametry je na obrázku 27.

Do grafu Michaelis-Mentenové pro novou mikrosomální karbonylreduktasu a oracin byla přidána navíc kinetika i 11 β -HSD1, která se jako zatím jedinou známou mikrosomální karbonylreduktasou podílející se na metabolismu oracinu. Z tohoto porovnání je naprosto zřejmé, že nová mikrosomální karbonylreduktasa vykazuje k oracinu daleko vyšší afinitu i aktivitu a bude tedy hrát přinejmenším v metabolismu oracinu mnohem významnější roli než 11 β -HSD1.



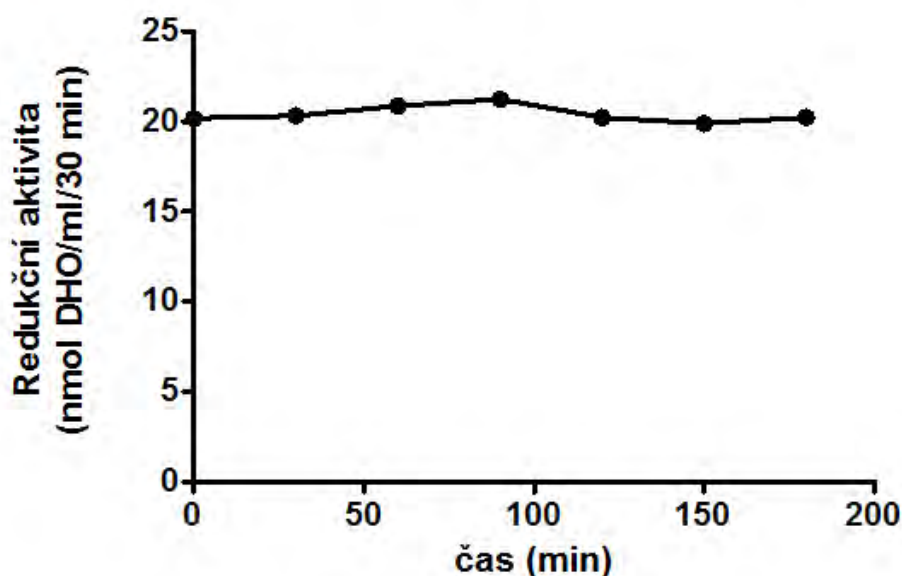
Obr. 27 - Michaelis-Mentenové graf závislosti redukční aktivity nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy na koncentraci substrátu oracinu a z něho určené kinetické parametry daného enzymu pro reakci s oracinem. Červeně je navíc pro porovnání přidána kinetika 11 β -HSD1 s oracinem

Pokud porovnáme kinetické parametry nové mikrosomální karbonylreduktasy vedle 11 β -HSD1 také s cytosolickými enzymy, které se také podílí na metabolismu oracinu, tak i zde je jasné, že parametry tohoto nového enzymu jsou lepší než parametry většiny cytosolických enzymů (viz Příloha 3). Jediný enzym, u kterého jsou známy kinetické

parametry pro oracin, který vykazuje vyšší aktivitu vůči oracinu je AKR1C1 (Wsol et al. 2007). Je tedy zřejmé, že jsme získali frakci s enzymem, který bude hrát důležitou roli v metabolismu oracinu a s největší pravděpodobností i metabolismu dalších léčiv, protože obecným rysem všech karbonyreduktas je jejich široká substrátová specifita.

5.2.4 Stanovení stability mikrosomů a purifikovaných frakcí

Při práci s enzymatickými frakcemi je důležité zajistit, aby nedocházelo zbytečně ke ztrátě jejich aktivity v důsledku jejich degradace. Všechny enzymatické frakce byly během popsané práce uchovávány při práci na ledu, aby nedocházelo zbytečně k aktivaci proteinas a degradaci cílových proteinů. Abychom věděli, jak rychle dochází k poklesu aktivity ve výchozím materiálu pro purifikaci tedy v lidských jaterních mikrosomech, otestovali jsme jejich redukční aktivitu k oracinu v čase a zjistili jsme uspokojivé výsledky. Ani po 3 hodinách na ledu nedošlo k významnému poklesu jejich redukční aktivity vyjádřené redukcí oracinu (obr. 28).

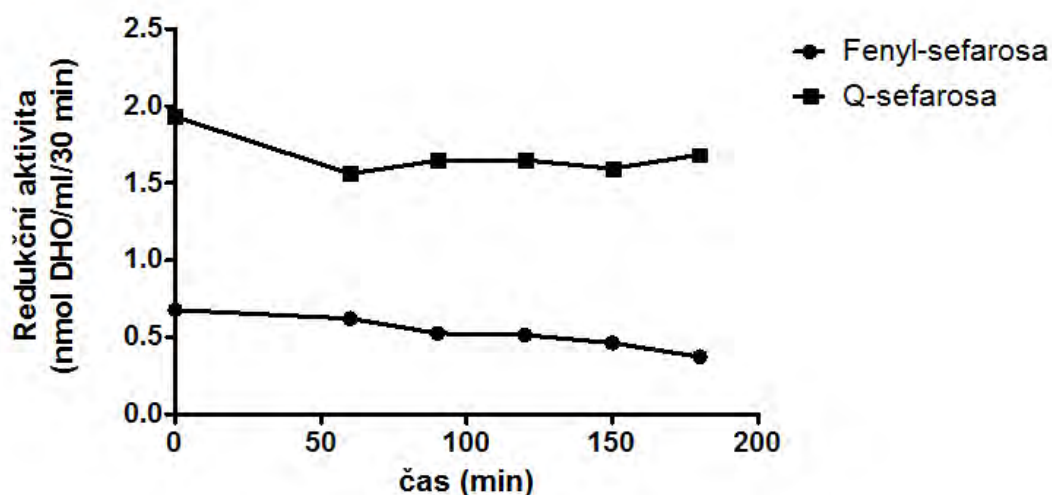


Obr. 28 - Stanovení časového průběhu stability redukční aktivity lidských jaterních mikrosomů k oracinu na ledu

Skutečnost, že byly mikrosomy vždy při práci rozmrazovány a udržovány na ledu a následný solubilizační proces byl také prováděn na ledu, je přínosná pro celý purifikační proces, protože nedochází ještě před začátkem purifikace zbytečně ke ztrátám výtěžků. Při přípravě byly mikrosomy odděleny a navíc i promyty od cytosolu, takže došlo s největší pravděpodobností i k odmytí většiny cytosolických proteas. Je ale možné, že po solubilizaci

se určité množství cytosolických proteas uvolní z vnitřní části mikrosomů. Proto by bylo vhodné otestovat ještě případně stabilitu solubilizovaných a odsolených mikrosomů.

Vedle toho jsme ještě stanovili stabilitu frakcí získaných po prvním a druhém purifikačním kroku (Q12, F11). V tomto případě jsme frakce vystavili extrémnějším podmínkám - laboratorní teplotě. V ideálním případě by totiž už na začátku purifikace měly být degradační proteasy odstraněny.



Obr. 29 - Stanovení průběhu časové stability redukční aktivity frakcí po prvním a druhém purifikačním kroku při laboratorní teplotě

Zde už je, na rozdíl od mikrosomů uchovávaných na ledu, patrný jistý pokles redukční aktivity. V případě frakce po separaci na Q-sefarose došlo k 13% poklesu v redukční aktivitě vůči oracinu, zatímco v případě frakce po separaci na Fenyl-sefarose dokonce k 38% poklesu aktivity (viz obr. 29). Hlavně v případě frakce po Fenyl-sefarose je tento pokles spíše než proteasami, které už by už neměly být přítomné, způsoben spíš tím, že membránově vázané enzymy ve vodném roztoku interagují se stěnou nádob, ve kterých jsou uchovány. A čím menší je koncentrace proteinu v roztoku, tím větší je tato tendence, která platí obecně za nízkých koncentrací i pro cytosolické proteiny (Scopes 1994). Proto je nutné vždy před použitím purifikované frakce dobře promíchat. Navíc pokud by byly tyto poklesy aktivity způsobené proteasami, tak na ledu, kde jsou tyto frakce běžně při práci uchovávány, by byly poklesy aktivity téměř zanedbatelné. Vedle stanovení této časové stability by bylo vhodné stanovit ještě stabilitu purifikovaných frakcí při jejich opakovaném rozmrazování a zmrazování a také dlouhodobou stabilitu redukční aktivity při jejich uchování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.5 Elektroforéza

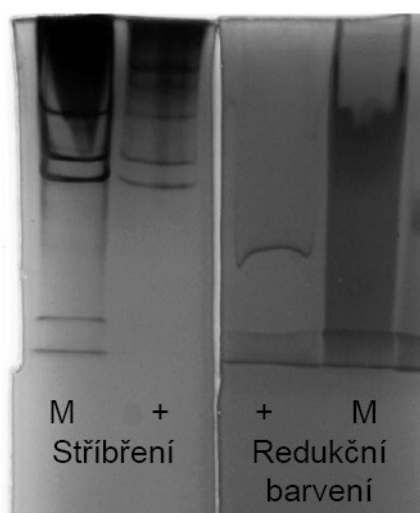
V předchozí práci jsme pouze na základě znalosti rozdílu ve stereospecificitách metabolismu oracinu výrazně purifikovali a charakterizovali novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu. Jak se ukázalo, v metabolismu oracinu má tento enzym s největší pravděpodobností významnou roli a může se podílet na metabolismu i dalších léčiv. Proto je důležité tento enzym identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Jak je diskutováno výše, je pro konečné přečištění frakce možné použít buď další purifikační krok nebo elektroforézu. Díky tomu, že každý purifikační krok přináší ztráty cílového proteinu, rozhodli jsme se pro elektroforézu.

5.2.5.1 Nativní elektroforéza

Protože jsme neznali vlastnosti cílového proteinu, jako je jeho molekulová hmotnost, rozhodli jsme se využít nativní elektroforézy s následným barvením na redukční aktivitu (postup popsán v části 4.3.12.3). Principem je redukce tetrazoliové soli NADPH na nerozpustný fialový formasan. Tento typ barvení se používá hlavně pro barvení enzymů na oxidační aktivitu, kdy vznikne průhledný gel s oxidačně aktivními proužky. V našem provedení bysme měli získat tmavě fialový gel s prosvětlenými redukčně aktivními proužky. Tento typ barvení by nám pomohl přiřadit redukčně aktivní proužek k purifikovanému proteinu, zatímco nečistoty by se tímto typem barvení nebarvily. Protože není známo a otestováno, zda je takové barvení na redukční aktivitu kompatibilní s MS, rozhodli jsme se tento problém obejít tím, že byly připraveny vždy dva shodné kousky gelu, které si zrcadlově odpovídaly. Jeden byl vždy obarven pomocí barvení na redukční aktivitu a druhý klasickým barvením kompatibilním s MS (Coomassie blue nebo tzv. „sladké stříbření“). Přiložením gelů k sobě by se zjistilo, zda redukčně aktivní proužek odpovídá určitému proužku na gelu, který byl obarvený klasickým MS kompatibilním barvením a takový proužek by byl podroben MS analýze.

Elektroforéza membránově vázaných proteinů je obecně obtížnější než proteinů cytosolických, protože membránově vázané proteiny někdy neputují do gelu a zůstávají v dávkovací jamce nebo na gelu dochází k jejich agregaci a precipitaci. Obecně doporučeným typem nativní elektroforézy pro membránově vázané proteiny je tzv. blue-native elektroforéza (BN-PAGE). Pro zvýšení solubility membránově vázaných proteinů je v gelu 6-aminohexanová kyselina (6-AHA) a záporný náboj proteinů a tudíž jejich pohyb k anodě je zajištěn smícháním vzorku proteinu s Coomassie blue (Reisinger and Eichacker 2006; Wittig et al. 2006). Vzorek s navázaným Coomassie blue by sice putoval k anodě, ale také by ztratil svojí aktivitu, takže spojení této metody s barvením na redukční aktivitu není možné.

Modifikací BN-PAGE elektroforézy je tzv. clear-native elektroforéza (CN-PAGE), která je díky přítomnosti 6-AHA v elektroforetickém gelu též vhodná pro membránové proteiny. Navíc se zde ke vzorku nepřidává Coomassie blue, ale Ponceau S, která se na proteiny neváže tak pevně jako Coomassie blue a nedochází tak k jejich deaktivaci. Nezajistí však záporný náboj proteinů, takže pohyb proteinů k anodě je zde zajištěn jiným způsobem. Do elektroforetického pufru v katodovém prostoru se přidává aniontový a neiontový detergent, které udělí proteinům záporný náboj. Detergenty jsou ale natolik jemné, že nedochází k jejich denaturaci jako u SDS elektroforézy (Wittig et al. 2007; Wittig and Schagger 2005). Tento typ elektroforézy jsme vyzkoušeli s mikrosomy a pozitivní kontrolou (rekombinantní AKR1C3) s tím, že do katodového pufru jsme přidali buď 0,05 % deoxycholátu sodného a 0,05 % Tritonu X-100 nebo kombinaci 0,05 % deoxycholátu sodného a 0,01 % dodecyl- β -maltosidu, které by měly zajistit vhodný pohyb proteinu a zároveň proteiny nedenaturovat.

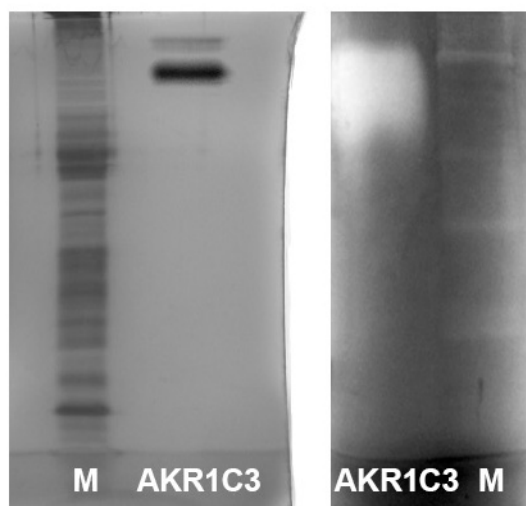


Obr. 30 - Test clear-native elektroforézy s mikrosomy a pozitivní kontrolou (AKR1C3) s následným barvením na redukční aktivitu a barvením stříbrem

Výsledkem barvení na redukční aktivitu by měl být tmavě fialový gel s prosvětlenými redukčně aktivními proužky, ale gel po tomto barvení zůstal celý světlý, nedošlo ke vzniku fialového formasanu. Pouze část gelu v oblasti mikrosomů ztmavla, ale rozhodně nebyla tmavě fialová (viz obr. 30). I při opakovaných testech této elektroforézy se nepodařilo nikdy získat tmavě fialovou barvu gelu, z čehož usuzujeme, že zřejmě některá složka elektroforézy interferuje s tímto typem barvení.

Další možností byla klasická nativní elektroforéza, tedy vlastně SDS elektroforéza, pouze s tím, že se nepřidává do gelu, elektrodového a vzorkového pufru SDS, jinak složení zůstává stejné. Tento typ elektroforézy je popsán v experimentální části 4.2.11.2. Tuto nativní elektroforézu bylo možné spojit s barvením na redukční aktivitu. V testovací elektroforéze s mikrosomy a pozitivní kontrolou jsme získali celý fialový gel, bez prosvětlených redukčně aktivních proužků. To bylo způsobeno pravděpodobně tím, že u této elektroforézy má gel pH kolem 9,0. Takové extrémní pH většině enzymů nevyhovuje a dochází tak ke ztrátě aktivity, a proto tyto gely pro barvení na enzymatickou aktivitu obecně nedoporučují, což jsme si potvrdili i my.

V publikovaných pracích jsme našli nativní elektroforézu, která byla přímo spojena s barvením na enzymatickou aktivitu oxidas (Seymour and Lazarus 1989). Tento typ nativní elektroforézy je v experimentální části nazýván jako nativní elektroforéza 2 (část 4.3.11.3). Zde má nativní elektroforetický gel i elektrodový pufr pH kolem pH 7,0. Problémem této elektroforézy je pouze to, na rozdíl od BN-PAGE či CN-PAGE, že zde není zajištěn chod proteinů k anodě, ale dochází k jejich pohybu podle isoelektrického bodu (pI). Provedli jsme testovací elektroforézu s mikrosomy a pozitivní kontrolou (AKR1C3) a získali jsme z našeho pohledu ideální výsledek, jak je vidět na obrázku 31.



Obr. 31 - Nativní elektroforéza. Levá část gelu byla obarvena pomocí barvení stříbrem, zatímco pravá část gelu barvením na redukční aktivitu. M - mikrosomy

Pravá část gelu byla obarvena na redukční aktivitu, byl získán tmavě fialový gel s výrazným prosvětlením AKR1C3 a se čtyřmi dobře patrnými redukčně aktivními proužky (navíc byly patrné ještě dva velmi tenké redukčně aktivní proužky, které jsou na fotografii

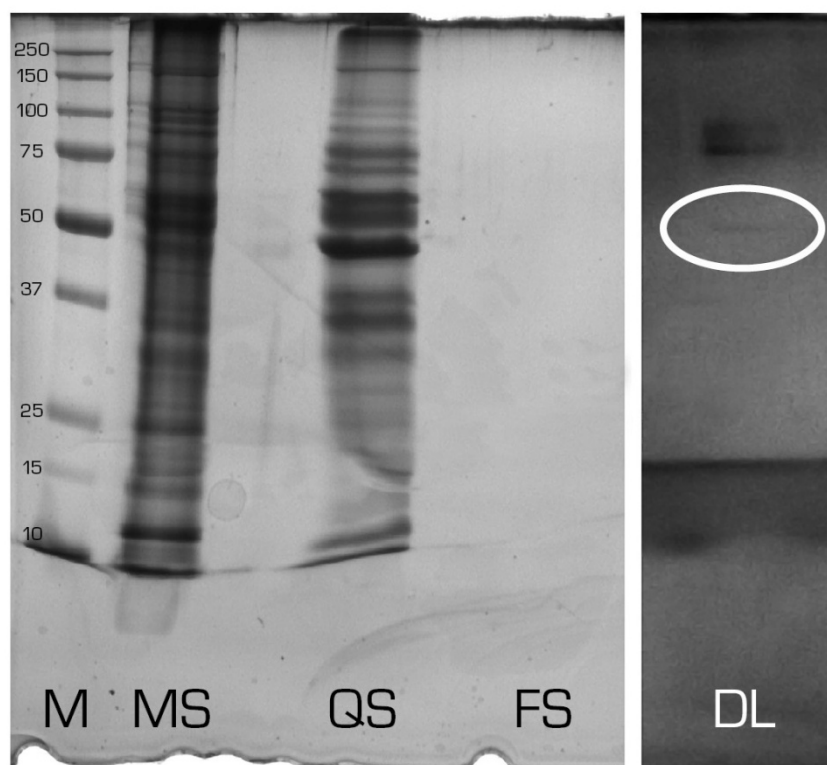
špatně viditelné) v mikrosomech. Takže lze říci, že tento typ nativní elektroforézy je dobře spojitelný právě s tímto typem barvení. Levá část gelu je obarvena stříbrem (část 4.3.12.2) a v případě reálného, purifikovaného, vzorku by byl proužek odpovídající redukčně aktivnímu proužku analyzován na MS. Bohužel v případě reálného výrazně purifikovaného vzorku jsme takový výsledek nedostali a zatím nebylo zjištěno z jakého důvodu. Mohlo dojít k tomu, že purifikovaný membránově vázaný protein neputoval do gelu, mohl také na gelu precipitovat a ztratit tak svou aktivitu, nebo také jeho redukční aktivita byla pod detekčním limitem metody. Dalším problémem může být to, že pI purifikovaného proteinu může být větší než 7 a pak by tento protein putoval v elektrickém poli směrem ke katodě a tedy mimo gel. Tento typ nativní elektroforézy jsme se pokusili ještě modifikovat použitím katodového elektrodového pufru, jako v případě CN-PAGE tedy s přidavkem detergentů pro zajištění pohybu proteinů k anodě, ale ani tento pokus se nezdařil. Důvody neúspěchu zatím nebyly odhaleny, ale je určitě nutné stanovit pI purifikované frakce, aby bylo jisté, zda purifikovaný protein putuje směrem do gelu a pak vyloučit další možnosti neúspěchu. Nicméně se zdá, že s určitými úpravami (např. co se týče pH elektroforetického gelu) by bylo možné tuto metodu pro přečištění výrazně purifikované frakce, izolaci cílového proteinu a jeho následnou identifikaci použít.

5.2.5.2 SDS elektroforéza

Souběžně s nativní elektroforézou jsme se snažili také o SDS elektroforézu i přesto, že by v případě, že by výrazně purifikovaná frakce po fenyl-sefarose obsahovala celou řadu elektroforetických proužků, mohlo být obtížné identifikovat proužek odpovídající cílové karbonylreduktase. SDS elektroforézu jsme provedli obvykle používaným způsobem, jak je popsáno v části 4.3.11.1. Díky nízké koncentraci proteinů ve výrazně purifikované frakci po druhém purifikačním kroku bylo jasné, že nebude možné pro barvení gelu použít barvení pomocí Coomassie, které je sice dobře kompatibilní s MS, ale má příliš vysoký detekční limit. Proto byla hledána metoda stříbření, která by byla dostatečně citlivá a kompatibilní s MS. Stříbření dle Ohsawy (viz část 6.12.1) mělo docela nízký detekční limit, ale tato metoda nebyla kompatibilní, jako prakticky všechny silver stain metody, s MS. Nedávno byla publikována nová metoda barvení stříbrem (Chevallet et al. 2008), která je plně kompatibilní s MS díky tomu, že stříbro se neredukuje formaldehydem, ale používají se různé monosacharidy. Díky tomu se také nazývá „sladké stříbření“ a jako nejcitlivější se jevila redukce ribosou. SDS elektroforézu obsahující jak výchozí mikrosomy, tak i vzorky po jednotlivých purifikačních krocích jsme obarvili pomocí této metody stříbření s redukcí ribosou.

Jak je patrné na obrázku 32, frakce po druhém purifikačním kroku, na fenyl-sefarose, neobsahovala žádný proužek, popř. jsme získali elektroforézu s proužky v oblasti

vysokých molekulových hmotností, které odpovídali keratinům. Proto byl stanoven detekční limit metody pomocí AKR1C3 a bylo zjištěno, že detekční limit je 2 ng proteinu/elektroforetický proužek. Z toho je zřejmé, že vzorek po druhém purifikačním kroku obsahoval velice nízkou koncentraci nové mikrosomální karbonylreduktasy a celou řadu různých nečistot např. keratiny v nízkých koncentracích, které také na gelu nejsou vidět.



Obr. 32 - SDS elektroforéza obarvená „sweet silver stain“, tedy stříbřením s redukcí ribosou. V pravé části gelu je detekční limit metody - 2ng/proužek. M - marker, MS - mikrosomy, QS – Q-sefarosa, FS - fenyl-sefarosa

Pro zvýšení množství dávkovaného proteinu na elektroforézu ve vzorku po druhém purifikačním kroku jsme se pokoušeli také vzorek precipitovat. Klasická precipitace s trichloroctovou kyselinou (TCA) díky přítomnosti detergentu Triton X-100 (v pufrch C a D Triton X-100 sice není obsažen, ale je v poměrně vysoké koncentraci ve frakci Q12, takže frakce po Fenyl HP obsahovaly Triton X-100 pocházející z právě Q12) nefunguje, nedochází vůbec k precipitaci. Proto jsme hledali publikované metody pro precipitaci vzorků s Tritonem X-100, a následně jsme obě nalezené metody vyzkoušeli. Při použití metody, kde se používala vedle 5% TCA ještě 0,3% SDS pro odstranění vlivu Tritonu X-100 (Retz and Steele 1977) k precipitaci sice došlo, ale výtěžky byly poměrně nízké. Další metodou, která umožňuje precipitaci v přítomnosti Tritonu X-100 je metoda, kde

precipitačním agens je 10% TCA a 4 M NaCl (Alam A. 2007), bohužel po této precipitaci zůstávalo ve vzorku příliš mnoho soli, což se též pro elektroforézu nehodí. Navíc všechny proteiny neprecipitují stejně, takže při precipitaci směsného vzorku může dojít k tomu, že cílový protein vůbec nebude precipitovat, což se dá obtížně zjistit. Proto je precipitace vhodná spíše pro vzorky obsahující jednu bílkovinu a pro tu se podmínky precipitace optimalizují k dosažení co největšího výtěžku.

Bohužel vhodnou elektroforetickou metodu pro rozdělení bílkovin ve frakci po druhém purifikačním kroku, která obsahuje cílovou novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu, jsme zatím nenalezli. Na první pohled jednoduchým řešením by bylo začít purifikaci z většího množství mikrosomů, ale ani to není tak jednoduché, protože při zvýšení množství mikrosomů je nutné všechny kroky purifikace, alespoň částečně optimalizovat. Před tímto řešením se pokusíme zjistit pl cílového proteinu a vyřešit i případné další problémy nativní elektroforézy ve spojení s redukčním barvením, která se jinak zdá elegantním řešením umožňující izolaci a identifikaci nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy.

5.2.6 Shrnutí výsledků purifikace a charakterizace nové mikrosomální karbonylreduktasy účastnící se metabolismu xenobiotik

Analýzou genomu člověka, ale i třeba bakterie *E.coli* bylo zjištěno, že asi 30 % všech proteinů, které je tvoří, jsou integrální membránové proteiny (Wallin and von-Heijne 1998). Membránové proteiny zastávají v organismech řadu důležitých fyziologických funkcí, ale informace o nich jsou ve srovnání s cytosolickými proteiny poměrně střídmé. Je to způsobeno řadou problémů, které práce s nimi přináší (jak už bylo diskutováno v částech 4.3.2 a 4.3.11.4), navíc jsou v buňkách obsaženy v poměrně malých množstvích a získání jejich rekombinantních forem v aktivním stavu je též často spojeno s řadou problémů. I přesto je studium membránových proteinů jednou z důležitých částí studia proteinů a může přinést řadu zajímavých a potenciálně klinicky využitelných výsledků.

V tomto projektu, jsme si dali za cíl purifikovat novou mikrosomální karbonylreduktasu, která se podílí na metabolismu oracinu, přičemž její stereospecifita by měla být opačná, než u 11 β -HSD1, tedy cílový enzym by měl být stereospecifický pro tvorbu (+)-DHO. Tento projekt byl založen na myšlence, že rozdíl v enzymové stereospecifitě redukce oracinu mezi lidskými mikrosomy a purifikovanou 11 β -HSD1 ukazuje na přítomnost dalšího mikrosomálního enzymu, podílejícího se na jeho metabolismu (Wsol et al. 2004). V purifikaci tohoto enzymu bylo nutné překonat řadu obtíží spojených s tím, že cílový enzym je membránově vázaný protein, o kterém jsme navíc nevěděli nic mimo enzymové stereospecifity v metabolismu oracinu. Pomocí dvoukrokové purifikace jsme získali výrazně

purifikovanou frakci, obsahující novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu, která skutečně redukuje oracin s preferenční tvorbou 86 % (+)-DHO. Izolace a identifikace na MS bude součástí dalšího projektu.

Velice významné je to, že byly stanoveny její kinetické parametry (viz část 5.2.3.2) pro redukci oracinu a ukázalo se, že tento enzym bude hrát v metabolismu oracinu velice významné místo. Ukázalo se, že tento nový enzym je pro redukci oracinu daleko účinnější a vykazuje k němu také vyšší afinitu než 11 β -HSD1 a navíc vykazuje také lepší parametry než většina cytosolických enzymů podílejících se na metabolismu oracinu (viz příloha 2). Z výsledků je patrné, že máme frakci s enzymem, který se bude v jaterních buňkách významnou měrou podílet na metabolismu oracinu. Navíc se dá s velkou pravděpodobností očekávat, že jeho aktivita nebude omezena pouze na oracin, ale bude se podílet na metabolismu dalších xenobiotik obsahující karbonylovou skupinu, protože široká substrátová specifita je charakteristickým rysem všech karbonylreduktas. V současné době testujeme, zda se tento enzym podílí na metabolismu příbuzných protinádorových léčiv ze skupiny antracyklinů - doxorubicinu a daunorubicinu. Z předběžných experimentů se zdá, že tato nová mikrosomální karbonylreduktasa se bude podílet na metabolismu daunorubicinu a tedy může potenciálně hrát roli v rezistenci nádorových buněk vůči tomuto léčivu, která je hlavní překážkou protinádorové terapie antracykliny. V delším časovém horizontu bude nutno tuto karbonylreduktasu identifikovat a připravit její rekombinantní formu pro další charakterizaci. Z toho je patrné že tento projekt otevírá široké pole působnosti a může v budoucnu významně přispět ke znalostem membránově vázaných enzymů a v ideálním případě i zlepšení protinádorové léčby.

Tento zatím neznámý enzym bude s největší pravděpodobností enzym z nadrodiny SDR, protože ta jako jediná obsahuje karbonylreduktasy vázané na membránu ER. Jedinou dosud známou mikrosomální karbonylreduktasou, která se podílí na metabolismu xenobiotik je 11 β -HSD1, u ostatních mikrosomálních forem byl popsán jen metabolismus eobiotik. Jak je diskutováno už v části 2.2.2.2, z lidského genomu je známo celkem 73 lidských forem SDR, z nichž pouze 14 je dobře charakterizováno, ostatní jen do určité míry nebo dokonce prakticky vůbec. Z uvedených 73 SDR proteinů je jich 17 vázaných na ER a u 31 zástupců nebyla zatím určena subcelulární lokalizace. Takže i přesto, že ne všichni zástupci SDR nadrodiny jsou reduktasy, je zde poměrně široké pole působnosti. Je možné, že naše zatím neznámá mikrosomální karbonylreduktasa je jednou z málo charakterizovaných zástupců SDR nadrodiny, ale může být také enzymem, který už je dobře charakterizovaný, co se týká jeho role v endogenním metabolismu, jen znalosti o jeho roli v biotransformaci chybí. Tímto problémem jsme se hlouběji zabývali a o potenciálních mikrosomálních karbonylreduktasách v metabolismu xenobiotik jsme připravili souhrnný

článek, který je připraven k publikování. Z těchto potenciálních enzymů by připadaly v úvahu redukční formy retinoldehydrogenas, díky tkáňové distribuci pak hlavně RDH12, RDH14 a retSDR1 (Belyaeva and Kedishvili 2002; Haeseleer et al. 2002). U RDH12 byla již popsána významná účast na metabolismu produktů lipidové peroxidace, jako je cis-6-nonenal a trans-2-nonenal (Belyaeva et al. 2005). Další z potenciálních enzymů jsou redukční formy 17 β -HSD, jako je 17 β -HSD7,12 a díky tkáňové distribuci výhradně v játrech možná také 17 β -HSD13 (Horiguchi et al. 2008; Luu-The et al. 2006; Torn et al. 2003). Nedávno se objevila prakticky první práce, kde je popsáno, že se redukční 17 β -HSD podílí na metabolismu xenobiotika, syntetického testosteronu (Prasad et al. 2009). Navíc jsou zde také enzymy jako např. Hep27, u kterého byl již podíl na metabolismu některých xenobiotik popsán, ale zatím není známa jeho subcelulární lokalizace (Shafqat et al. 2006). Z výše uvedeného je jasné, že na poli mikrosomálních karbonylreduktas je mnoho věcí, které zůstávají zatím neznámé, a náš projekt možná bude jedním těch, který přinese nové poznatky do této oblasti.

6 Závěr

Vzhledem k výzkumu na naší katedře a projektům řešených v této disertační práci, byla role reduktas v nádorovém onemocnění omezena prakticky pouze na skupinu enzymů redukující karbonylové sloučeniny. V teoretické části disertační práce byly představeny nadrodiny enzymů, ve kterých lze nalézt karbonylreduktasy a také hlavní mechanismy, kterými tyto enzymy mohou zasahovat do rozvoje a léčby nádorového onemocnění u člověka.

Cíl této disertační práce se dá rozčlenit na dvě části, které se obě podařilo splnit. V první části se podařilo nalézt silný inhibitor, ze skupiny přírodních látek flavonoidů, enzymu AKR1C3, který hraje pravděpodobně významnou roli v rozvoji hormon-dependetního nádorového onemocnění prostaty a prsu. Tímto inhibitorem AKR1C3 je 2'-hydroxyflavanon, který díky velice nízké hodnotě $IC_{50} = 300$ nM, představuje látku, která je potenciálně klinicky využitelná při léčbě příslušných nádorových onemocnění. Bylo také zjištěno, že tato látka inhibuje z AKR1C enzymů selektivně pouze AKR1C3. Kvůli potenciálnímu využití by bylo vhodné také zjistit, zda se 2'-hydroxyflavanon nepodílí také na inhibici dalších enzymů např. enzymů metabolismu prostaglandinů. Vedle silného inhibitoru AKR1C3 jsme při testování selektivity jeho nejsilnějších inhibitorů, našli také silný inhibitor enzymu AKR1C1, 7-hydroxyflavon s hodnotou $IC_{50} = 75$ nM. AKR1C1 hraje významnou roli v rozvoji hormon-dependetním nádoru endometria, takže i tento inhibitor je díky své nízké hodnotě IC_{50} potenciálně klinicky využitelný při léčbě takových nádorů.

V druhé části se podařilo výrazně purifikovat novou mikrosomální karbonylreduktasu, která se účastní metabolismu protinádorového léčiva oracinu a pravděpodobně i dalších karbonylových léčiv. Tento výsledek byl získán díky použití jemné a účinné solubilizace lidských jaterních mikrosomů a následného dvoukrokového purifikačního schématu. Získaná nová mikrosomální karbonylreduktasa vykazuje očekávané vlastnosti, tedy metabolisuje oracin se stereospecificitou (+)-DHO/(-)-DHO 86:14. Bude hrát pravděpodobně v jeho metabolismu velice významnou roli, protože její kinetické parametry pro tuto reakci jsou mnohem lepší než u většiny dosud známých enzymů účastnících se metabolismu oracinu. S největší pravděpodobností se tento enzym bude podílet také na metabolismu dalších protinádorových xenobiotik např. podobných protinádorových léčiv doxorubicinu a daunorubicinu a mohl by tak potenciálně hrát roli v rezistenci nádorových buněk. I přesto, že se zatím nepodařilo daný enzym identifikovat, přináší tato práce naprosto nové poznatky, protože zatím jedinou známou karbonylreduktasou podílející se na metabolismu xenobiotik je 11 β -HSD1. Z těchto důvodů je naprosto nezbytné dokončit izolaci a následnou identifikaci tohoto enzymu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Po identifikaci enzymu se otevřou široké možnosti výzkumu tohoto enzymu, kdy daný enzym může být připraven v rekombinantní formě a dále charakterizován směrem ke specifickým xenobiotickým substrátům či selektivním inhibitorům. Vedle toho může být také např. zkoumána jeho exprese a modulace v tkáňových liniích nádorových buněk, exprese v lidských tkáních a nádorových buňkách. Možností je celá řada a jen budoucnost ukáže, jaké vlastnosti a role v organismu bude mít tento enzym.

7 Souhrn

Redukčním enzymům byla dlouhou dobu věnována pouze malá pozornost, ale dnes už je jasné, že jsou významnou součástí endogenního metabolismu a také první fáze biotransformace xenobiotik. Důležitou skupinou redukčních enzymů jsou karbonylreduktasy, které se řadí do dvou nadrodin - dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-ketoreduktasy (AKR). Jejich role v nádorovém onemocnění je dnes intenzivně studována a lze říct, že jejich působení v nádorovém onemocnění lze principiálně rozdělit do dvou oblastí.

Bylo zjištěno, že významnou roli hrají karbonylreduktasy v hormon-dependentních nádorových onemocněních prsu, endometria a prostaty. Pro tyto nádory jsou růstovými faktory aktivní estrogény respektive androgeny, dochází tak ke zvýšenému dělení buňky a tedy i zvýšené možnosti vzniku mutací v důležitých genech, které mohou vyústit v nádorové bujení. Právě karbonylreduktasy se spolu s dalšími enzymy (jako např. aromatasou) podílí na vzniku aktivních pohlavních hormonů, proto může být jejich inhibice důležitým cílem léčby tohoto typu nádorů. Nicméně je nutné určit, které enzymy jsou klíčové pro tvorbu těchto růstových faktorů v jednotlivých typech hormon-dependentních nádorů. Vedle hormon-dependentních nádorů se karbonylreduktasy uplatňují také u nádorových onemocnění, kde hormony jako růstové faktory nepůsobí. Tato oblast je ještě méně prozkoumána než oblast hormon-dependentních nádorů a ucelenější informace se zde teprve začínají objevovat. Bylo prokázáno, že vedle metabolismu estrogenů a androgenů se enzym AKR1C3 podílí také na metabolismu prostaglandinů a dává vznik takovým typům, které zasahují do buněčné signalizace tak, že dochází ke zvýšení proliferace buňky. Vedle toho se karbonylreduktasy také účastní metabolismu kyseliny retinové, která je nezbytná jak pro správný embryonální vývoj, tak pro diferenciaci buněk u dospělých. Její hladina je velice pečlivě udržovaná, na jejím metabolismu se podílí celá řada enzymů včetně redukčních retinoldehydrogenas. Všechny změny v expresi enzymů podílející se na tomto metabolismu mohou vést ke snížení koncentrace kyseliny retinové, následné dediferenciaci buněk a nádorovému zvratu. Mimo retinoldehydrogenas z SDR nadrodiny se uvažuje také v tomto mechanismu o roli AKR1B10.

Druhým mechanismem, kterým karbonylreduktasy zasahují do nádorového onemocnění je jejich podíl na první fázi biotransformace karcinogenních látek a protinádorových léčiv. Různé enzymy redukující karbonylové skupiny se podílí na deaktivaci nejsilnějšího tabák-specifického karcinogenu NNK a také aktivované formy aflatoxinu B1 (aflatoxinB1-dihydrodiolu), čímž naopak brání vzniku nádorů indukovaných těmito karcinogeny. Vedle toho se karbonylreduktasy také podílí na biotransformaci

protinádorových léčiv, jako jsou klinicky užívaná cytostatika doxorubicin a daunorubicin a potenciální protinádorová léčiva oracin a benfluron. Redukce karbonylové skupiny zde způsobuje deaktivaci léčiv a může být také zodpovědná za rezistenci nádorových buněk na léčbu doxorubicinem a daunorubicinem.

Cíl této práce se dá rozdělit na dvě části, stejně tak jako mechanismus působení karbonylreduktas lze rozdělit do dvou částí. Cílem první části je nalezení silného a selektivního inhibitoru, ze skupiny flavonoidů, enzymu AKR1C3, který pravděpodobně hraje významnou roli v rozvoji hormon-dependentních nádorů prostaty a prsu. V druhé části je cílem purifikace a charakterizace nové mikrosomální karbonylreduktasy, která se podílí na metabolismu protinádorového léčiva oracinu a pravděpodobně i dalších léčiv. Cíle obou částí se nám podařilo splnit a výsledky tak přispěly ke znalostem obou mechanismů působení karbonylreduktas v nádorovém onemocnění.

Podařilo se nalézt silný inhibitor enzymu AKR1C3 2'-hydroxyflavanon, který má velmi nízkou hodnotu $IC_{50} = 300$ nM. Navíc je tato látka z AKR1C enzymů selektivní pouze k AKR1C3 a díky těmto skutečnostem může být potenciálně klinicky využitelná při léčbě hormon-dependentních nádorů prostaty a prsu. Navíc bylo zjištěno, že 7-hydroxyflavanon daleko silněji inhibuje AKR1C1 než AKR1C3. Hodnota $IC_{50} = 75$ nM pro AKR1C1 ukazuje na to, že tato látka může být potenciálně využita v léčbě hormon-dependentního nádoru endometria, kde hraje AKR1C1 důležitou roli. Vedle toho jsme výrazně purifikovali novou mikrosomální karbonylreduktasu, která se účastní metabolismu oracinu a pravděpodobně i dalších léčiv. Pro redukci oracinu tímto novým enzymem byly stanoveny kinetické parametry a jejich porovnáním s ostatními oracin redukujícími enzymy se ukázalo, že tato nová mikrosomální karbonylreduktasa bude hrát v metabolismu oracinu velice významnou roli. S největší pravděpodobností se bude také účastnit metabolismu dalších příbuzných karbonylových xenobiotik např. protinádorových léčiv doxorubicinu a daunorubicinu a potenciálně tak přispívat k rezistenci nádorových buněk na jejich léčbu. Tato práce přináší naprosto nové poznatky, protože zatím jedinou mikrosomální karbonylreduktasou, která se podílí na metabolismu xenobiotik je 11 β -HSD1. Z těchto všech důvodů je nezbytné v budoucnu tento enzym izolovat a identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

8 Summary

Only a small attention was paid for long time to reducing enzymes, but today it is clear that these are an important part of the endogenous metabolism and also the phase I biotransformation of xenobiotics. The significant group of reducing enzymes are carbonyl reductases that belong to two superfamilies – short chain dehydrogenases/reductases (SDR) and aldo-keto reductases (AKR). Their role in cancer is now intensively studied and their functions in cancer it is possible to divide into two main sections.

It is known that carbonyl reductases play a substantial role in hormone-dependent cancers as prostate, breast or endometrial cancer. Active estrogens or androgens are important growth factors for these cancers because they evoke increasing of cell proliferation so that elevated possibility of mutations of important genes and development of cancer. Carbonyl reductases along with other enzymes (e.g. aromatase) participate in formation of these active sex hormones in extragonadal tissues, so an inhibition of such enzymes may be a target of anticancer therapy of hormone-dependent cancers. It is necessary to determine which enzymes are essential for the formation of active sex hormones in particular types of cancers. Besides hormone-dependent cancers, carbonyl reductases play also role in cancers that have not sex hormones as growth factors. This area is only poorly understood in comparison with hormone-dependent cancers and just recently some information appears. It was proved that enzyme AKR1C3, besides metabolism of sex hormones, also takes part in metabolism of prostaglandins and generates such types of prostaglandins that affect cell signalization to increase of cell proliferation. Carbonyl reductases also contribute to the metabolism of retinoic acid which is essential either for correct embryonic development or differentiation of adult tissues. Its concentration is carefully maintained and many different enzymes, including reductive retinol dehydrogenases, participate in its metabolism. All alterations in expression or activity of these enzymes can lead to decrease of level of retinoic acid resulting in dedifferentiation of tissues and possibly in cancer progression. Besides retinol dehydrogenases from SDR superfamily also AKR1B10 probably play an important role in this mechanism.

The second mechanism, by which carbonyl reductases are involved in cancer, is their role in phase I biotransformation of carcinogens and anticancer drugs. Various carbonyl reductases participate in deactivation of the most potent tobacco-specific carcinogen NNK and also activated form of aflatoxin B1 (aflatoxin B1 dihydrodiol), thereby protect cell from a formation of NNK or aflatoxin B1-induced tumors. Carbonyl reducing enzymes play a role in biotransformation of clinically used cytostatic drugs doxorubicin and daunorubicin and potential anticancer drugs oracin and benfluron. The reduction of carbonyl groups of these

drugs leads to their inactivation and may be connected with resistance of cancer cells to doxorubicin or daunorubicin anticancer therapy.

The aim of this doctoral thesis „The role of reductases in cancer“ is possible to divide into two parts as well as mechanisms of action of carbonyl reductases in cancer. The aim of the first part is to find a potent inhibitor of the enzyme AKR1C3 that probably acts as an important contributor to development of hormone-dependent cancers of prostate or breast. The goal of the second part is purification and characterization of new microsomal carbonyl reductase(s) participating in metabolism of anticancer drug oracin and probably other carbonyl xenobiotics. Both aims have been successfully fulfilled and results contribute to the knowledge of both mechanism of action of carbonyl reductases in cancer.

It has been found a potent inhibitor of AKR1C3 – 2'-hydroxyflavone with very low $IC_{50} = 300$ nM. This inhibitor is selective to only AKR1C3 enzyme, from the group of AKR1C subfamily and therefore it is a good potential for clinical use in a therapy of hormone-dependent cancers of prostate or breast. Moreover, it has been discovered that 7-hydroxyflavone is more potent inhibitor of AKR1C1 than AKR1C3. The value of $IC_{50} = 75$ nM points to possible use in a treatment of hormone-dependent endometrial cancer where AKR1C1 plays an important role. Alongside it, a new microsomal carbonyl reductase participating in metabolism of anticancer drug oracin has been partly purified and characterized. Its kinetic parameters for reduction of oracin have been determined and compared with kinetic parameters of reductases that participate in metabolism of oracin. It can be concluded that the new microsomal carbonyl reductase will probably play very important role in metabolism of oracin when its kinetic parameters are compared with others already published. Most likely the new enzyme will also contribute to the metabolism of other similar carbonyl drugs as anthracycline cytostatic drugs doxorubicin and daunorubicin, and possibly play a role in resistance of cancer cell to anthracycline therapy. This project achieves entirely new results, because only one known microsomal carbonyl reductase yet that takes part in metabolism of xenobiotics is 11 β -HSD1. Due to these reasons it is imperative to isolate and identify the new microsomal carbonyl reductase by mass spectrometry in near future.

9 Literatura

- Aka, J.A., Mazumdar, M., & Lin, S.X. 2009. Reductive 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the sulfatase pathway: critical in the cell proliferation of breast cancer. *Mol.Cell Endocrinol.*, 301, (1-2) 183-190.
- Alam A. 2007, Agent for protein precipitation, a method of protein precipitation, a method of protein assya using protein precipitation agent, and a kit for protein assay , US 7,244,828 B2 (patent).
- Allan, G.M., Bubert, C., Vicker, N., Smith, A., Tutill, H.J., Purohit, A., Reed, M.J., & Potter, B.V. 2006. Novel, potent inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Mol.Cell Endocrinol.*, 248, (1-2) 204-207.
- Anonymous 2001. Protein purification Handbook 18-1132-29, AC ed. Amersham Biosciences.
- Arlt, V.M., Stiborova, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H., & Phillips, D.H. 2003. Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome p450 reductase. *Cancer Res.*, 63, (11) 2752-2761.
- Atalla, A., Breyer-Pfaff, U., & Maser, E. 2000. Purification and characterization of oxidoreductases-catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol. *Xenobiotica*, 30, (8) 755-769.
- Atanasov, A.G., Dzyakanchuk, A.A., Schweizer, R.A., Nashev, L.G., Maurer, E.M., & Odermatt, A. 2006. Coffee inhibits the reactivation of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a glucocorticoid connection in the anti-diabetic action of coffee? *FEBS Lett.*, 580, (17) 4081-4085.
- Atanasov, A.G., Nashev, L.G., Gelman, L., Legeza, B., Sack, R., Portmann, R., & Odermatt, A. 2008. Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim.Biophys.Acta*, 1783, (8) 1536-1543.
- Atanasov, A.G., Nashev, L.G., Schweizer, R.A., Frick, C., & Odermatt, A. 2004. Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett.*, 571, (1-3) 129-133.

- Ax, W., Soldan, M., Koch, L., & Maser, E. 2000. Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem.Pharmacol.*, 59, (3) 293-300.
- Balendiran, G.K., Martin, H.J., El-Hawari, Y., & Maser, E. 2009. Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. *Chem.Biol.Interact.*, 178, (1-3) 134-137.
- Barski, O.A., Papusha, V.Z., Ivanova, M.M., Rudman, D.M., & Finegold, M.J. 2005. Developmental expression and function of aldehyde reductase in proximal tubules of the kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 289, (1) F200-F207.
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., & Bhatnagar, A. 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev.*, 40, (4) 553-624.
- Bauman, D.R., Steckelbroeck, S., & Penning, T.M. 2004. The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action. *Drug News Perspect.*, 17, (9) 563-578.
- Belyaeva, O.V. & Kedishvili, N.Y. 2002. Human pancreas protein 2 (PAN2) has a retinal reductase activity and is ubiquitously expressed in human tissues. *FEBS Lett.*, 531, (3) 489-493.
- Belyaeva, O.V., Korkina, O.V., Stetsenko, A.V., Kim, T., Nelson, P.S., & Kedishvili, N.Y. 2005. Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids. *Biochemistry*, 44, (18) 7035-7047.
- Bianchet, M.A., Erdemli, S.B., & Amzel, L.M. 2008. Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases. *Vitam.Horm.*, 78, 63-84.
- Bray, J.E., Marsden, B.D., & Oppermann, U. 2009. The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary. *Chem.Biol.Interact.*, 178, (1-3) 99-109.
- Breyer-Pfaff, U., Martin, H.J., Ernst, M., & Maser, E. 2004. Enantioselectivity of carbonyl reduction of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone by tissue fractions from human and rat and by enzymes isolated from human liver. *Drug Metab Dispos.*, 32, (9) 915-922.
- Breyer-Pfaff, U. & Nill, K. 2000. High-affinity stereoselective reduction of the enantiomers of ketotifen and of ketonic nortriptyline metabolites by aldo-keto reductases from human liver. *Biochem.Pharmacol.*, 59, (3) 249-260.

- Brozic, P., Smuc, T., Gobec, S., & Rizner, T.L. 2006. Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. *Mol.Cell Endocrinol.*, 259, (1-2) 30-42.
- Byrns, M.C. & Penning, T.M. 2009. Type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase (AKR1C3): role in breast cancer and inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drug analogs. *Chem.Biol.Interact.*, 178, (1-3) 221-227.
- Byrns, M.C., Steckelbroeck, S., & Penning, T.M. 2008. An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3alpha-HSD, type 5 17beta-HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. *Biochem.Pharmacol.*, 75, (2) 484-493.
- Carlquist, M., Frejd, T., & Gorwa-Grauslund, M.F. 2008. Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chem.Biol.Interact.*, 174, (2) 98-108.
- Chevallet, M., Luche, S., Diemer, H., Strub, J.M., Van, D.A., & Rabilloud, T. 2008. Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics.*, 8, (23-24) 4853-4861.
- Ding, X., Rose, M.J., McCaffery, I., Rossi, J., Paweletz, K., Hale, C., Emery, M., & James, C.A. 2009. Determination of prednisolone in human adipose tissue incubation medium using LC-MS/MS to support the measurement of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 877, (13) 1394-1401.
- El-Kabbani, O., Scammells, P.J., Gosling, J., Dhagat, U., Endo, S., Matsunaga, T., Soda, M., & Hara, A. 2009. Structure-guided design, synthesis, and evaluation of salicylic acid-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1). *J.Med.Chem.*, 52, (10) 3259-3264.
- Endo, S., Matsunaga, T., Kitade, Y., Ohno, S., Tajima, K., El-Kabbani, O., & Hara, A. 2008. Human carbonyl reductase 4 is a mitochondrial NADPH-dependent quinone reductase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 377, (4) 1326-1330.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., & Aro, A. 2001. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J.Nutr.*, 131, (2) 235-241.
- Erlund, I., Silaste, M.L., Alfthan, G., Rantala, M., Kesaniemi, Y.A., & Aro, A. 2002. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects

- following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur.J.Clin.Nutr.*, 56, (9) 891-898.
- Fields, A.L., Soprano, D.R., & Soprano, K.J. 2007. Retinoids in biological control and cancer. *J.Cell Biochem.*, 102, (4) 886-898.
- Forrest, G.L. & Gonzalez, B. 2000. Carbonyl reductase. *Chem.Biol.Interact.*, 129, (1-2) 21-40.
- Fournier, M.A. & Poirier, D. 2009. Estrogen formation in endometrial and cervix cancer cell lines: involvement of aromatase, steroid sulfatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 5, 7 and 12). *Mol.Cell Endocrinol.*, 301, (1-2) 142-145.
- Fukumoto, S., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H., & Aburatani, H. 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin.Cancer Res.*, 11, (5) 1776-1785.
- Gabriel, O. & Gersten, D.M. 1992. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Anal.Biochem.*, 203, (1) 1-21.
- Gallego, O., Belyaeva, O.V., Porte, S., Ruiz, F.X., Stetsenko, A.V., Shabrova, E.V., Kostereva, N.V., Farres, J., Pares, X., & Kedishvili, N.Y. 2006. Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem.J.*, 399, (1) 101-109.
- Gallego, O., Ruiz, F.X., Ardevol, A., Dominguez, M., Alvarez, R., de Lera, A.R., Rovira, C., Farres, J., Fita, I., & Pares, X. 2007. Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104, (52) 20764-20769.
- Gardner, R., Kazi, S., & Ellis, E.M. 2004. Detoxication of the environmental pollutant acrolein by a rat liver aldo-keto reductase. *Toxicol.Lett.*, 148, (1-2) 65-72.
- Gavelova, M., Hladikova, J., Vildova, L., Novotna, R., Vondracek, J., Krcmar, P., Machala, M., & Skalova, L. 2008. Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Chem.Biol.Interact.*, 176, (1) 9-18.

- Georgiou, C.D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. 2008. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal.Bioanal.Chem.*, 391, (1) 391-403.
- Gersl, V., Mazurova, Y., Bajgar, J., Melka, M., Hrdina, R., & Palicka, V. 1996. Lack of cardiotoxicity of a new antineoplastic agent, a synthetic derivative of indenoisochinoline: comparison with daunorubicin in rabbits. *Arch.Toxicol.*, 70, (10) 645-651.
- Guengerich, F.P. & Johnson, W.W. 1999. Kinetics of hydrolysis and reaction of aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide and relevance to toxicity and detoxication. *Drug Metab Rev.*, 31, (1) 141-158.
- Haeseleer, F., Jang, G.F., Imanishi, Y., Driessen, C.A., Matsumura, M., Nelson, P.S., & Palczewski, K. 2002. Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J.Biol.Chem.*, 277, (47) 45537-45546.
- Henderson, B.E. & Feigelson, H.S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21, (3) 427-433.
- Hodek, P., Trefil, P., & Stiborova, M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem.Biol.Interact.*, 139, (1) 1-21.
- Hoffmann, F. & Maser, E. 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev.*, 39, (1) 87-144.
- Horiguchi, Y., Araki, M., & Motojima, K. 2008. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 370, (2) 235-238.
- Hult, M., Elleby, B., Shafqat, N., Svensson, S., Rane, A., Jornvall, H., Abrahmsen, L., & Oppermann, U. 2004. Human and rodent type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases are 7beta-hydroxycholesterol dehydrogenases involved in oxysterol metabolism. *Cell Mol.Life Sci.*, 61, (7-8) 992-999.
- Hult, M., Nobel, C.S., Abrahmsen, L., Nicoll-Griffith, D.A., Jornvall, H., & Oppermann, U.C. 2001. Novel enzymological profiles of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem.Biol.Interact.*, 130-132, (1-3) 805-814.
- Hyndman, D., Bauman, D.R., Heredia, V.V., & Penning, T.M. 2003. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem.Biol.Interact.*, 143-144, 621-631.

- Ito, K., Utsunomiya, H., Suzuki, T., Saitou, S., Akahira, J., Okamura, K., Yaegashi, N., & Sasano, H. 2006. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium and its disorders. *Mol.Cell Endocrinol.*, 248, (1-2) 136-140.
- Jaiswal, A.K. 2000. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic.Biol.Med.*, 29, (3-4) 254-262.
- Jansson, A. 2009. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 114, (1-2) 64-67.
- Jansson, A., Gunnarsson, C., & Stal, O. 2006. Proliferative responses to altered 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD) type 2 expression in human breast cancer cells are dependent on endogenous expression of 17HSD type 1 and the oestradiol receptors. *Endocr.Relat Cancer*, 13, (3) 875-884.
- Jette, C., Peterson, P.W., Sandoval, I.T., Manos, E.J., Hadley, E., Ireland, C.M., & Jones, D.A. 2004. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J.Biol.Chem.*, 279, (33) 34397-34405.
- Jez, J.M., Flynn, T.G., & Penning, T.M. 1997. A nomenclature system for the aldo-keto reductase superfamily. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 414, 579-600.
- Jez, J.M. & Penning, T.M. 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem.Biol.Interact.*, 130-132, (1-3) 499-525.
- Jin, Y. & Penning, T.M. 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 47, 263-292.
- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., & Ghosh, D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34, (18) 6003-6013.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H., & Persson, B. 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur.J.Biochem.*, 269, (18) 4409-4417.
- Kassner, N., Huse, K., Martin, H.J., Godtel-Armbrust, U., Metzger, A., Meineke, I., Brockmoller, J., Klein, K., Zanger, U.M., Maser, E., & Wojnowski, L. 2008. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos.*, 36, (10) 2113-2120.
- Kedishvili, N.Y. 2002. Multifunctional nature of human retinol dehydrogenases. *Current Organic Chemistry*, 6, 1247-1257.

- 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 (RalR1). *J.Biol.Chem.*, 277, (32) 28909-28915.
- Kelly, V.P., Sherratt, P.J., Crouch, D.H., & Hayes, J.D. 2002. Novel homodimeric and heterodimeric rat gamma-hydroxybutyrate synthases that associate with the Golgi apparatus define a distinct subclass of aldo-keto reductase 7 family proteins. *Biochem.J.*, 366, (Pt 3) 847-861.
- Kenneke, J.F., Mazur, C.S., Kellock, K.A., & Overmyer, J.P. 2009. Mechanistic approach to understanding the toxicity of the azole fungicide triadimefon to a nontarget aquatic insect and implications for exposure assessment. *Environ.Sci.Technol.*, 43, (14) 5507-5513.
- Knight, L.P., Primiano, T., Groopman, J.D., Kensler, T.W., & Sutter, T.R. 1999. cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis*, 20, (7) 1215-1223.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Moller, G., & Adamski, J. 2001. Phytoestrogens inhibit human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol.Cell Endocrinol.*, 171, (1-2) 151-162.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R., & Belanger, A. 1997. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*, 62, (1) 148-158.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Simard, J., & Labrie, C. 2000a. Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol.Metab*, 11, (10) 421-427.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Simard, J., Labrie, C., El-Alfy, M., Pelletier, G., & Belanger, A. 2000b. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J.Mol.Endocrinol.*, 25, (1) 1-16.
- Laplante, Y., Rancourt, C., & Poirier, D. 2009. Relative involvement of three 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Mol.Cell Endocrinol.*, 301, (1-2) 146-153.
- Liden, M. & Eriksson, U. 2006. Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J.Biol.Chem.*, 281, (19) 13001-13004.

- Lin, B., White, J.T., Ferguson, C., Wang, S., Vessella, R., Bumgarner, R., True, L.D., 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, (4) 1611-1618.
- 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, (1) 213-218.
- Lukacik, P., Kavanagh, K.L., & Oppermann, U. 2006. Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol.Cell Endocrinol.*, 248, (1-2) 61-71.
- Luu-The, V. 2001. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 76, (1-5) 143-151.
- Luu-The, V., Tremblay, P., & Labrie, F. 2006. Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol.Endocrinol.*, 20, (2) 437-443.
- Lyon, R.C., Johnston, S.M., Watson, D.G., McGarvie, G., & Ellis, E.M. 2007. Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *J.Biol.Chem.*, 282, (36) 25986-25992.
- Ma, J., Yan, R., Zu, X., Cheng, J.M., Rao, K., Liao, D.F., & Cao, D. 2008. Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 283, (6) 3418-3423.
- Maeda, A., Maeda, T., Imanishi, Y., Kuksa, V., Alekseev, A., Bronson, J.D., Zhang, H., Zhu, L., Sun, W., Saperstein, D.A., Rieke, F., Baehr, W., & Palczewski, K. 2005. Role of photoreceptor-specific retinol dehydrogenase in the retinoid cycle in vivo. *J.Biol.Chem.*, 280, (19) 18822-18832.
- Maire, I.M., Champeil, P., & Moller, J.V. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim.Biophys.Acta*, 1508, (1-2) 86-111.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am.J.Clin.Nutr.*, 79, (5) 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am.J.Clin.Nutr.*, 81, (1 Suppl) 230S-242S.

- Martin, H.J., Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S., Block, S., & Maser, E. 2006. Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos.*, 34, (3) 464-470.
- Maser, E. & Bannenberg, G. 1994. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. *Biochem.Pharmacol.*, 47, (10) 1805-1812.
- Maser, E. & Oppermann, U.C. 1997. Role of type-1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *Eur.J.Biochem.*, 249, (2) 365-369.
- Maser, E., Volker, B., & Friebertshauser, J. 2002. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry*, 41, (7) 2459-2465.
- Matsunaga, T., Shintani, S., & Hara, A. 2006. Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.*, 21, (1) 1-18.
- Melka, M. 1993, Oracin - preclinical summary report of the Research institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague, Czech republic.
- Mindnich, R., Moller, G., & Adamski, J. 2004. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol.Cell Endocrinol.*, 218, (1-2) 7-20.
- Miura, T., Nishinaka, T., & Terada, T. 2008. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Mol.Cell Biochem.*, 315, (1-2) 113-121.
- Moeller, G. & Adamski, J. 2006. Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol.Cell Endocrinol.*, 248, (1-2) 47-55.
- Moeller, G. & Adamski, J. 2009. Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol.Cell Endocrinol.*, 301, (1-2) 7-19.
- Murray, R.K., Granner D.K., Mayes P.A., & Rodwell V.W. 1993. Harper's Biochemistry, 23rd ed. Appleton & Lange.
- Nadauld, L.D., Phelps, R., Moore, B.C., Eisinger, A., Sandoval, I.T., Chidester, S., Peterson, P.W., Manos, E.J., Sklow, B., Burt, R.W., & Jones, D.A. 2006. Adenomatous polyposis coli control of C-terminal binding protein-1 stability regulates expression of intestinal retinol dehydrogenases. *J.Biol.Chem.*, 281, (49) 37828-37835.

- Nagasaki, S., Miki, Y., Akahira, J., Suzuki, T., & Sasano, H. 2009. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human breast cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1155, 25-32.
- Nguyen, P., Awwad, R.T., Smart, D.D., Spitz, D.R., & Gius, D. 2006. Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett.*, 236, (2) 164-174.
- Nordling, E., Jornvall, H., & Persson, B. 2002. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur.J.Biochem.*, 269, (17) 4267-4276.
- Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., & Maser, E. 2008. Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol.Lett.*, 181, (1) 1-6.
- Ohara, H., Miyabe, Y., Deyashiki, Y., Matsuura, K., & Hara, A. 1995. Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochem.Pharmacol.*, 50, (2) 221-227.
- Ohsawa, K. & Ebata, N. 1983. Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal.Biochem.*, 135, (2) 409-415.
- Oosawa, K., Ebata, N., & Hirata, M. 1986, Silver staining method, 4,582,808 (patent).
- Oppermann, U. 2007. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 47, 293-322.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., & Jornvall, H. 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem.Biol.Interact.*, 143-144, 247-253.
- Oppermann, U.C., Filling, C., & Jornvall, H. 2001. Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem.Biol.Interact.*, 130-132, (1-3) 699-705.
- Oppermann, U.C. & Maser, E. 2000. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144, (1-3) 71-81.
- Paganga, G. & Rice-Evans, C.A. 1997. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.*, 401, (1) 78-82.

- Pares, X., Farres, J., Kedishvili, N., & Duester, G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol.Life Sci.*, 65, (24) 3936-3949.
- Penning, T.M. 2004. Aldo-keto reductases and formation of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones. *Methods Enzymol.*, 378, 31-67.
- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Jez, J.M., Hung, C.F., Lin, H.K., Ma, H., Moore, M., Palackal, N., & Ratnam, K. 2000. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem.J.*, 351, (Pt 1) 67-77.
- Penning, T.M. & Byrns, M.C. 2009. Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1155, 33-42.
- Persson, B., Hedlund, J., & Jornvall, H. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell Mol.Life Sci.*, 65, (24) 3879-3894.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J.E., Bruford, E., Dellaporta, S.L., Favia, A.D., Duarte, R.G., Jornvall, H., Kavanagh, K.L., 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, (1-3) 94-98.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J.Nat.Prod.*, 63, (7) 1035-1042.
- Pollak, N., Dolle, C., & Ziegler, M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem.J.*, 402, (2) 205-218.
- Prasad, P.V., Arumugam, R., Willman, M., Ge, R.S., Sitruk-Ware, R., & Kumar, N. 2009. Distribution, metabolism and excretion of a synthetic androgen 7 α -methyl-19-nortestosterone, a potential male-contraceptive. *Steroids*, 74, (1) 121-131.
- Reisinger, V. & Eichacker, L.A. 2006. Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics.*, 6 Suppl 2, 6-15.
- Retz, K.C. & Steele, W.J. 1977. Acid precipitation of protein in the presence of triton X-100 and deoxycholate. *Anal.Biochem.*, 79, (1-2) 457-461.

- Rizner, T.L., Smuc, T., Ruprecht, R., Sinkovec, J., & Penning, T.M. 2006. AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol.Cell Endocrinol.*, 248, (1-2) 126-135.
- Rosemond, M.J. & Walsh, J.S. 2004. Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metab Rev.*, 36, (2) 335-361.
- Ruiz, F.X., Gallego, O., Ardevol, A., Moro, A., Dominguez, M., Alvarez, S., Alvarez, R., de Lera, A.R., Rovira, C., Fita, I., Pares, X., & Farres, J. 2009. Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels. *Chem.Biol.Interact.*, 178, (1-3) 171-177.
- Sasano, H., Suzuki, T., Miki, Y., & Moriya, T. 2008. Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 108, (3-5) 181-185.
- Sasano, H., Suzuki, T., Nakata, T., & Moriya, T. 2006. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer*, 13, (2) 129-136.
- Scalbert, A. & Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J.Nutr.*, 130, (8S Suppl) 2073S-2085S.
- Schuster, D., Nashev, L.G., Kirchmair, J., Laggner, C., Wolber, G., Langer, T., & Odermatt, A. 2008. Discovery of nonsteroidal 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors by pharmacophore-based screening of virtual compound libraries. *J.Med.Chem.*, 51, (14) 4188-4199.
- Scopes, R.K. 1994. Protein purification. Principles and practice., 3rd ed. New York, Springer-Verlag.
- Seddon, A.M., Curnow, P., & Booth, P.J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim.Biophys.Acta*, 1666, (1-2) 105-117.
- Seymour, J.L. & Lazarus, R.A. 1989. Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal.Biochem.*, 178, (2) 243-247.
- Shafqat, N., Shafqat, J., Eissner, G., Marschall, H.U., Tryggvason, K., Eriksson, U., Gabrielli, F., Lardy, H., Jornvall, H., & Oppermann, U. 2006. Hep27, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family, is an NADPH-dependent dicarbonyl reductase expressed in vascular endothelial tissue. *Cell Mol.Life Sci.*, 63, (10) 1205-1213.

- Simunek, T., Sterba, M., Popelova, O., Adamcova, M., Hrdina, R., & Gersl, V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol.Rep.*, 61, (1) 154-171.
- Skalova, L., Nobilis, M., Szotakova, B., Kondrova, E., Savlik, M., Wsol, V., Pichard-Garcia, L., & Maser, E. 2002. Carbonyl reduction of the potential cytostatic drugs benfluron and 3,9-dimethoxybenfluron in human in vitro. *Biochem.Pharmacol.*, 64, (2) 297-305.
- Skarydova, L., Skarka, A., Novotna, R., Zivna, L., Martin, H.J., Wsol, V., & Maser, E. 2009. Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology*, 264, (1-2) 52-60.
- Smuc, T. & Rizner, T.L. 2009a. Aberrant pre-receptor regulation of estrogen and progesterone action in endometrial cancer. *Mol.Cell Endocrinol.*, 301, (1-2) 74-82.
- Smuc, T. & Rizner, T.L. 2009b. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chem.Biol.Interact.*, 178, (1-3) 228-233.
- Song, D., Liu, G., Luu-The, V., Zhao, D., Wang, L., Zhang, H., Xueling, G., Li, S., Desy, L., Labrie, F., & Pelletier, G. 2006. Expression of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 101, (2-3) 136-144.
- Soprano, D.R., Qin, P., & Soprano, K.J. 2004. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu.Rev.Nutr.*, 24, 201-221.
- Soronen, P., Laiti, M., Torn, S., Harkonen, P., Patrikainen, L., Li, Y., Pulkka, A., Kurkela, R., Herrala, A., Kaija, H., Isomaa, V., & Vihko, P. 2004. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 92, (4) 281-286.
- Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., & Ansari, N.H. 1995. Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 217, (3) 741-746.
- Srivastava, S.K., Ramana, K.V., & Bhatnagar, A. 2005. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr.Rev.*, 26, (3) 380-392.

- Suzuki-Yamamoto, T., Nishizawa, M., Fukui, M., Okuda-Ashitaka, E., Nakajima, T., Ito, S., & Watanabe, K. 1999. cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett.*, 462, (3) 335-340.
- Takahashi, R.H., Bains, O.S., Pfeifer, T.A., Grigliatti, T.A., Reid, R.E., & Riggs, K.W. 2008. Aldo-keto reductase 1C2 fails to metabolize doxorubicin and daunorubicin in vitro. *Drug Metab Dispos.*, 36, (6) 991-994.
- Torn, S., Nokelainen, P., Kurkela, R., Pulkka, A., Menjivar, M., Ghosh, S., Coca-Prados, M., Peltoketo, H., Isomaa, V., & Vihko, P. 2003. Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 305, (1) 37-45.
- Upadhyaya, P., Carmella, S.G., Guengerich, F.P., & Hecht, S.S. 2000. Formation and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol enantiomers in vitro in mouse, rat and human tissues. *Carcinogenesis*, 21, (6) 1233-1238.
- Vasiliou, V., Pappa, A., & Petersen, D.R. 2000. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem.Biol.Interact.*, 129, (1-2) 1-19.
- Veech, R.L., Eggleston, L.V., & Krebs, H.A. 1969. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem.J.*, 115, (4) 609-619.
- Voet, D. & Voet, J.G. 2004. Biochemistry, 3rd ed. Wiley International Edition.
- Wallin, E. & von-Heijne, G. 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.*, 7, (4) 1029-1038.
- Wamil, M. & Seckl, J.R. 2007. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target. *Drug Discov.Today*, 12, (13-14) 504-520.
- Wermuth, B. 1981. Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J.Biol.Chem.*, 256, (3) 1206-1213.
- Wittig, I., Braun, H.P., & Schagger, H. 2006. Blue native PAGE. *Nat.Protoc.*, 1, (1) 418-428.
- Wittig, I., Karas, M., & Schagger, H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol.Cell Proteomics.*, 6, (7) 1215-1225.

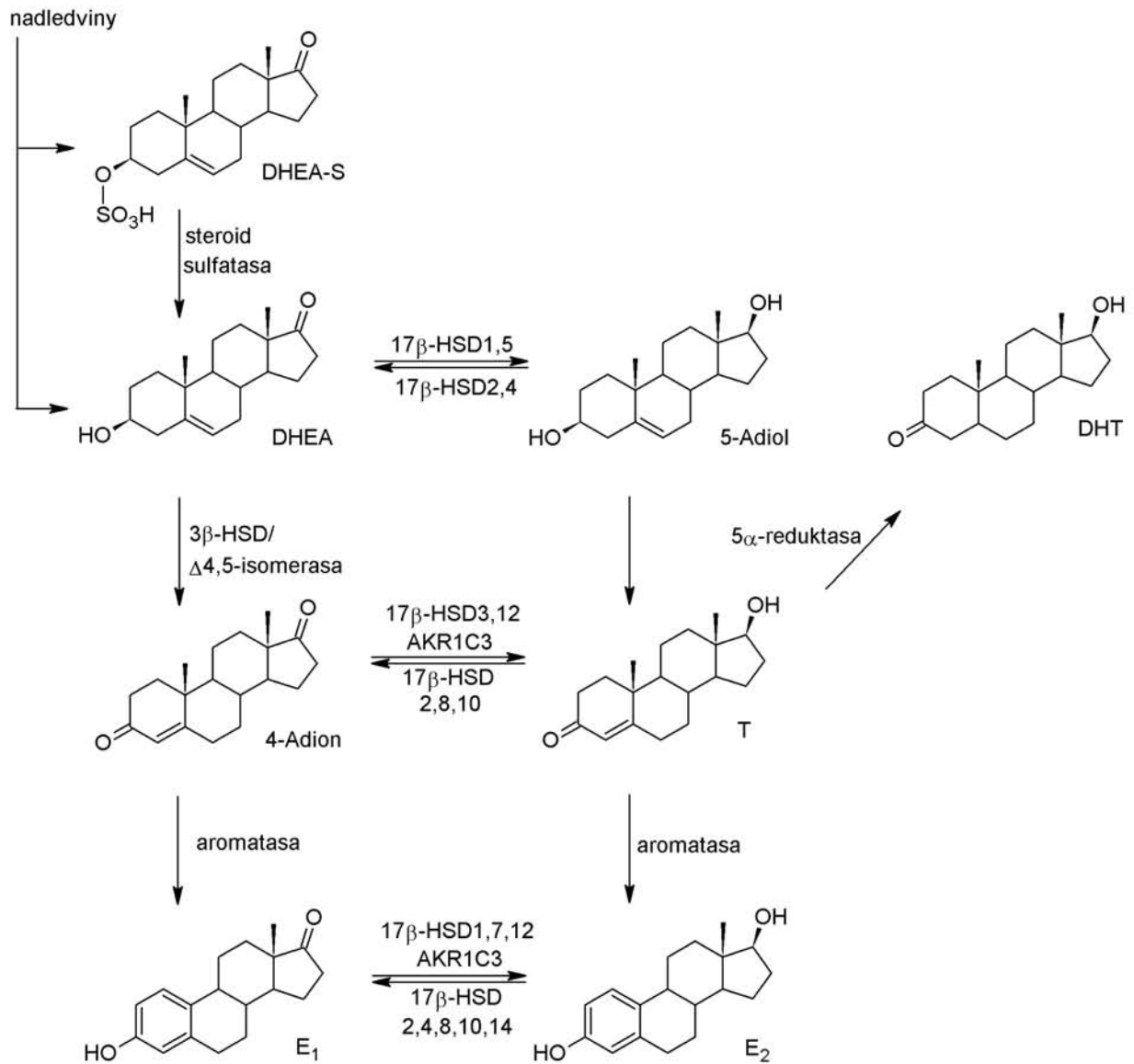
- Wittig, I. & Schagger, H. 2005. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics.*, 5, (17) 4338-4346.
- Wsol, V., Kvasnickova, E., Szotakova, B., & Hais, I.M. 1996. High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of metabolites of the potential cytostatic drug oracine. *J.Chromatogr.B Biomed.Appl.*, 681, (1) 169-175.
- Wsol, V., Skalova, L., Szotakova, B., Trejtnar, F., & Kvasnickova, E. 1999. Sex differences in stereospecificity of oracin reductases in rat in vitro and in vivo. *Chirality*, 11, (5-6) 505-509.
- Wsol, V., Szotakova, B., Martin, H.J., & Maser, E. 2007. Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology*, 238, (2-3) 111-118.
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., Cepkova, H., & Kvasnickova, E. 2000. The main metabolic pathway of oracin, a new potential cytostatic drug, in human liver microsomes and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin. *Enantiomer.*, 5, (3-4) 263-270.
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., & Maser, E. 2004. The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Toxicology*, 197, (3) 253-261.
- Wu, B.X., Moiseyev, G., Chen, Y., Rohrer, B., Crouch, R.K., & Ma, J.X. 2004. Identification of RDH10, an All-trans Retinol Dehydrogenase, in Retinal Muller Cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 45, (11) 3857-3862.
- Yan, R., Zu, X., Ma, J., Liu, Z., Adeyanju, M., & Cao, D. 2007. Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention. *Int.J.Cancer*, 121, (10) 2301-2306.
- Yang, S., Fang, Z., Gurates, B., Tamura, M., Miller, J., Ferrer, K., & Bulun, S.E. 2001. Stromal PRs mediate induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrial epithelium: a paracrine mechanism for inactivation of E2. *Mol.Endocrinol.*, 15, (12) 2093-2105.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S.S. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum.Nutr.*, 59, (3) 113-122.

Yoshitake, H., Takahashi, M., Ishikawa, H., Nojima, M., Iwanari, H., Watanabe, A., Aburatani, H., Yoshida, K., Ishi, K., Takamori, K., Ogawa, H., Hamakubo, T., Kodama, T., & Araki, Y. 2007. Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int.J.Gynecol.Cancer*, 17, (6) 1300-1306.

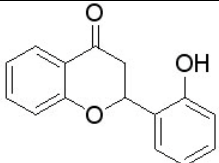
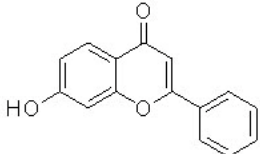
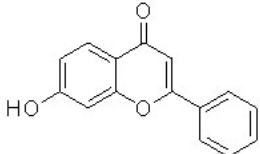
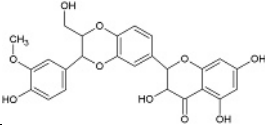
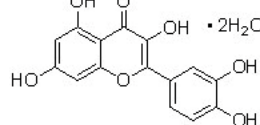
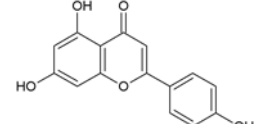
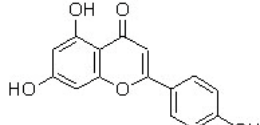
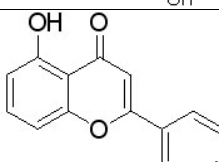
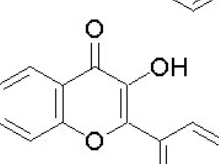
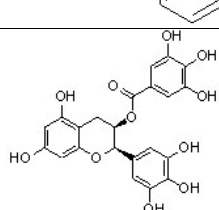
Zhu, Y.S. & Imperato-McGinley, J.L. 2009. 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1155, 43-56.

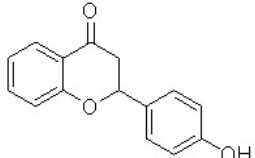
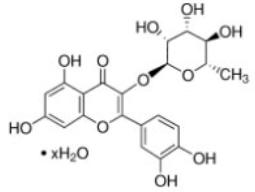
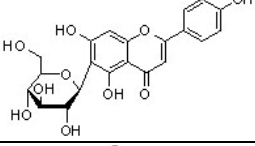
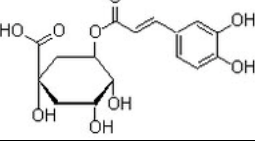
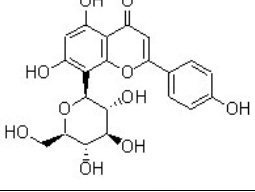
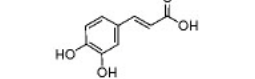
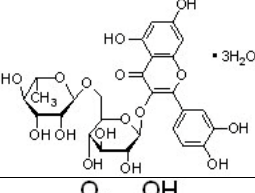
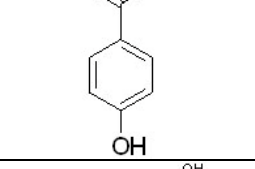
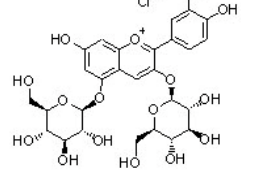
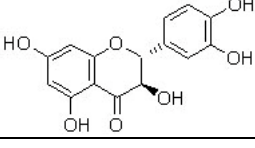
10 Přílohy

Příloha 1: Podíl jednotlivých forem karbonylreduktas na intrakrinní produkci aktivních androgenů a estrogenů v lidských tkáních z prekurzorů produkovaných nadledvinami



Příloha 2: Struktury a výskyt flavonoidů a příbuzných fenolických látek používaných při hledání inhibitoru enzymu AKR1C3 (Atanasov et al. 2006; Atanasov et al. 2008; Brozic et al. 2006; Pietta 2000)

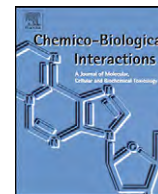
Látka	Hlavní zdroje	Struktura
2'-hydroxyflavanon	červené a žluté ovoce, zelenina	
Naringenin	citrusy	
7-hydroxyflavon	červené a žluté ovoce, zelenina	
Silibinin	ostropestřec mariánský (Silibum marianum)	
Kvercetin	cibule, kapusta, fazole, brokolice, salát, rajčata	
Apigenin	cereálie, aromatické byliny (petržel, rozmarýn, tymián)	
Luteolin	cereálie, aromatické byliny (petržel, rozmarýn, tymián)	
5-hydroxyflavon	červené a žluté ovoce, zelenina	
3-hydroxyflavon	červené a žluté ovoce, zelenina	
Epigallokatechin galat	jablka, chmel, čaj, pivo	

4'-hydroxyflavon	červené a žluté ovoce, zelenina	
Kvercitrin	čaj, jablka, cibule, salát	
Isovitexin	čajovník kapský, ječmen	
Chlorogenová kyselina	káva, jablka, hrušky, artičoky, lilek	
Vitexin	citrusy	
Kávová kyselina	káva, jablka, hrušky, artyčoky, lilek	
Rutin	cibule, višně, jablka, brokolice, kapusta, rajčata, čaj, červené víno	
4-hydroxybenzoová kyselina	mrkev, cereálie	
Kyanin chloride	zázvor, hroznové víno, jahody	
Taxifolin	citrusy	

Příloha 3: Porovnání kinetických parametrů dosud známých enzymů podílejících se na metabolismu oracinu

Enzym	Forma	DHO	V_{max} (nmol/30min/mg)	K_m (μ M)	CL_{int} (ml/30min/mg)	Reference
Nový mikrosomální enzym	výrazně purifikovaný	celkové DHO	813 \pm 23	42 \pm 6	19.5	(Skarydova et al. 2009)
11 β -HSD1	purifikovaný	(+)-DHO	25 \pm 1	190 \pm 10	0.1	(Wsol et al. 2004)
		(-)-DHO	75 \pm 3	150 \pm 20	0.5	
AKR1C1	purifikovaný	(+)-DHO	19200 \pm 2100	160 \pm 30	123	(Wsol et al. 2007)
		(-)-DHO	360 \pm 60	60 \pm 20	6	
AKR1C2	purifikovaný	(+)-DHO	900 \pm 90	90 \pm 20	9	(Wsol et al. 2007)
AKR1C3	rekombinantní	celkové DHO	169 \pm 6	110 \pm 11	1.5	(Novotna et al. 2008)
AKR1C4	purifikovaný	(+)-DHO	147 \pm 3	150 \pm 40	1.5	(Wsol et al. 2007)

Příloha 4: Publikovaný článek č. 1



AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids

Lucie Škarydová^a, Lucie Živná^a, Guangming Xiong^b, Edmund Maser^b, Vladimír Wsól^{a,*}

^a Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic

^b Institute of Toxicology and Pharmacology for Natural Scientists, Campus Kiel, University Medical School Schleswig-Holstein, Brunswiker Str. 10, D-24105 Kiel, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 19 October 2008

Keywords:

Aldo-keto reductases (AKRs)
Flavonoids
Oracin
Inhibition
Selective inhibitor

ABSTRACT

AKR1C3 (also known as 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 or 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 2) functions as a 3-keto, 17-keto and 20-ketosteroid reductase and as a 3 α -, 17 β - and 20 α -hydroxysteroid oxidase. Relatively high mRNA expression of AKR1C3 was found in human prostate and mammary gland where it is implicated in regulating ligand access to the androgen and estrogen receptor, respectively. AKR1C3 is an interesting target for the development of agents for treating hormone-dependent forms of cancer like prostate cancer, breast cancer, and endometrial cancer. However, only a few clinically promising and selective inhibitors have been reported so far. Very potent inhibitors of AKR1C3 are the non-steroidal anti-inflammatory drugs, e.g. indomethacin or flufenamic acid. Also dietary phytoestrogens such as coumestrol, quercetin, and biochanin were reported to inhibit the enzyme in low micromolar concentrations. In this study, some dietary flavonoids and other phenolic compounds were tested for their ability to specifically inhibit AKR1C3. Carbonyl reduction of the anticancer drug oracin, which is a very good substrate for AKR1C3 and which could be well monitored by a sensitive HPLC system with fluorescence detection, was employed to determine the inhibitory potency of the compounds. Our results reveal that AKR1C3 could be potentially un-competitively inhibited by 2'-hydroxyflavanone, whose IC₅₀ value of 300 nM is clinically promising. Moreover, since the inhibition is selective towards AKR1C3, 2'-hydroxyflavanone could be useful for treating or preventing hormone-dependent malignancies like prostate and breast cancer.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carbonyl reducing enzymes can be divided into two distinct protein superfamilies, the short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) and the aldo-keto reductases (AKR) [1,2]. The AKR superfamily represents NAD(P)(H)-dependent oxidoreductases metabolizing a range of substrates including aliphatic aldehydes, monosaccharides, steroids, prostaglandins, polycyclic aromatic hydrocarbons and isoflavonoids [3]. Mammalian AKRs are found predominantly in the AKR1 and AKR7 families [4].

The AKR1C subfamily members (hydroxysteroid dehydrogenases, HSDs) function in endogenous steroid or eicosanoid regulation and in xenobiotic metabolism [1,5]. They act predominantly as ketosteroid reductases by converting potent steroid hormones into their cognate inactive metabolites and vice versa and have thus a role in the pre-receptor regulation of steroid hormone action [5,6]. Whereas the human isoforms share at least 84% amino acid sequence identities, AKR1C1 and AKR1C2 differ by only seven amino acids [7].

AKR1C1 acts preferentially as a 20 α -HSD by inactivation of progesterone. It may therefore have a role in the development of breast and endometrial cancers [8]. AKR1C2 functions as peripheral 3 α -HSD by inactivation of 5 α -dihydrotestosterone [6].

A number of enzymatic properties have been assigned to AKR1C3 which has been referred to as both 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 [5]. AKR1C3 works as a 3-ketosteroid reductase (converting the potent androgen 5 α -dihydrotestosterone into the weak androgen 3 α -androstenediol), and as a 17-ketoreductase (converting the weak androgen Δ^4 -androstene-3,17-dione into the potent androgen testosterone and the weak estrogen estrone to the potent estrogen 17 β -estradiol) [7]. AKR1C3 has also been referred to as prostaglandin F₂ synthase [9].

Since AKR1C3 is predominantly expressed in the breast and prostate, and produces proliferative steroid hormones and prostaglandins, it may contribute to the growth of prostate and breast cancers. AKR1C3 is thus an interesting target for the development of agents for treating hormone-dependent forms of cancer. However, only a few inhibitors have been reported so far. Very potent inhibitors are indomethacin, *N*-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, flufenamic acid and some related non-steroidal anti-inflammatory drugs [10]. The enzyme can be

* Corresponding author. Tel.: +420 739488218.

E-mail address: vladimir.wsol@faf.cuni.cz (V. Wsól).

inhibited also by dietary phytoestrogens (such as coumestrol, quercetin and biochanin) and the mycoestrogen zearalenone, as well as by some other compounds like benzodiazepines, benzofuranes and phenolphthalein derivatives [11].

Phytoestrogens are plant-derived, non-steroidal compounds which can act as agonists or antagonists of estrogen receptors and they can modulate the activities of the key enzymes in estrogen biosynthesis. They are structurally divided into four main groups: flavonoids, coumestans, stilbens and lignans, where the flavonoids are classified into at least 10 chemical groups [8,12].

Flavonoids are found in almost all plant families in leaves, stems, roots, flowers and seeds. Flavanones, flavones, isoflavonoids, flavans, anthocyanins and flavonols are especially common in the diet. Flavonols are the most abundant flavonoids in foods (quercetin, kaempferol and myricetin are the three most common flavonols). Flavanones are mainly found in citrus fruits and flavones in celery. Catechins are present in large amounts in green and black teas and in red wine. Anthocyanins are found in strawberries and other berries. Isoflavones are almost found in soy foods [12].

The biological roles of flavonoids in plants are not fully understood. Some of them are thought to act as natural fungicides, UV-protectants and flower pigments [13]. As regular constituents of the diet, they have some clinically relevant functions: maintenance of capillary wall integrity, capillary resistance, antihypertensive, anti-arrhythmic, anti-inflammatory, anti-allergic and hypocholesterolaemic activity, platelet and mast cell stabilization, anti-hepatotoxic, anti-fertility and anti-tumor properties [14]. Very little is known about the intake of flavonoids from food, as is their bioavailability and metabolism in humans. Their plasma concentration is depending on the diet. Individual flavonoid concentrations in subjects consuming diets similar to the habitual diet of the general population range from nM to low μ M. The bioavailability of flavonoids in tissues may be much more important than their plasma concentration, but these data are still very scarce, even in animals [15,16].

In the present study, we tested several dietary flavonoids and phenolic compounds for their inhibitory effect towards AKR1C3. For evaluating their inhibitory potencies, we measured the carbonyl reduction of the anticancer drug oracin as a specific substrate [17], in combination with a very sensitive HPLC method and fluorescence detection [18]. 2'-Hydroxyflavanone was found to be a strong inhibitor of AKR1C3. The low IC_{50} value together with its selective inhibition of AKR1C3, in comparison to AKR1C1 and AKR1C2, predetermine 2'-hydroxyflavanone as a potential drug for clinical use.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Flavonoids and phenolic compounds (vitexin, isovitexin, 2'-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, quercetin, caffeic acid, naringenin, chlorogenic acid, rutin, 4-hydroxybenzoic acid, quercitrin, epigallocatechin gallate, cyanin chloride, luteolin, taxifolin, silibinin and apigenin) were obtained from Fluka (Prague, Czech Republic) and Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Oracin and DHO (11-dihydrooracin) were provided by the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry (Prague, Czech Republic). NADP⁺ and glucose-6-phosphate were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic), glucose-6-phosphate dehydrogenase was from Roche (Mannheim, Germany). All other chemicals were of highest purity commercially available.

2.2. Cloning, overexpression and purification of recombinant AKR1C3

The generation of recombinant AKR1C3 was performed according to standard techniques (Sambrook, Maniatis). In brief, the cDNA for human AKR1C3 was amplified from a commercially available full length by PCR. The primers used were designated to anneal at the 5'- and 3'-ends of the coding region and had the following sequences: 5'-primer = 5'-GGA ATT CCA TAT GGA TTC CAA ACA CCA G-3' (containing a NdeI restriction site) and 3'-primer = 5'-CGC GGA TCCTTA ATA TTCATC TGA ATA TG-3' (containing a BamHI restriction site). The PCR fragment obtained was cloned into pCR2.1-TOPO and the sequence confirmed by MWG. The fragment was then cloned into the bacterial expression vector pET15b by use of the NdeI and BamHI restriction sites. Overexpression of AKR1C3 was performed in *E. coli* strain BL21(DE3) by induction with 1 mM IPTG. For enzyme purification, cells were mechanically disrupted in a French press and the cell debris were sedimented by ultracentrifugation. The supernatant was directly applied to a Ni-agarose affinity chromatography column of an ÄKTA Purifier system (Pharmacia Biotech). The column was washed with 20 ml of starting buffer and the His-tagged AKR1C3 was then eluted by using 500 mM imidazole supplementation to the buffer. The successful overexpression and purification was monitored by SDS-PAGE. Enzyme activity was checked with 5 α -androstenedione as the substrate. Active fractions containing the purified protein were pooled, supplemented with glycerol (final concentration 20%) and the protein concentrated to 1.76 mg/ml in a 20 mM phosphate buffer, pH 7.4.

2.3. Purification of AKR1C1 and AKR1C2

Enzyme purification was carried out as described by Breyer-Pfaff and Nill [19]. Human liver samples were either from livers excluded from transplantation for medical reasons or excess normal tissue obtained on partial hepatectomy for tumor metastases. Briefly, human liver cytosol corresponding to 5–7 g of liver was gel filtrated on a Sephadex G-100 column and active eluates were further separated by ion exchange chromatography on Q Sepharose into three fractions (Q1–Q3). Activity was assessed by reduction of Z-10-oxonortriptyline, 4-benzoylpyridine or oxidation of 5-1-indanol in the presence of NADPH or NADP⁺, respectively. AKR1C1 was purified from fraction Q1 after ion exchange chromatography on CM Sepharose and chromatofocusing on PBE 94. AKR1C2 was purified from fraction Q2 after ion exchange chromatography on CM Sepharose following affinity chromatography on BioGel HTP and chromatofocusing on PBE 94.

2.4. Enzyme activity measurements

Oracin in the final concentration of 0.5 mM was incubated with recombinant AKR1C3 (1.76 μ g in one assay) in the presence of a NADPH generating system (final concentrations: 0.8 mM NADP⁺, 6 mM glucose-6-phosphate, 35 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM phosphate buffer, pH 7.4) in 0.1 mM phosphate buffer, pH 7.4. The reaction was carried out in the presence of different flavonoids in final concentrations ranging from 10 nM to 40 μ M (0.5 mM stock solutions of flavonoids in methanol were diluted in a mixture of water:methanol 1:1 to final concentrations indicated below). Reaction mixtures in a volume of 200 μ l were incubated for 30 min at 37 °C and then stopped by adding 80 μ l of 25% ammonia and cooling to 0 °C. Samples were extracted with 600 μ l of ethyl acetate by shaking for 10 s and centrifugation for 2 min at 13,000 rpm, and the organic phases were evaporated under vacuum. Residues were dissolved in 250 μ l of mobile phase, 100 μ l were applied to an HPLC column and analyzed. The same

method was used for the activity determination of the enzymes AKR1C1 and AKR1C2.

First set of inhibition experiments was a screen of various flavonoids in a fixed concentration of 20 μ M. The degree of inhibition was compared with non-inhibited control reactions (incubation of AKR1C3 in the absence of flavonoids). The flavonoids possessing the highest inhibitory effect were chosen for further testing.

For the second set of inhibition experiments (determination of IC_{50} values), the seven most potent flavonoids were chosen. The final concentrations of these flavonoids in the reaction mixture were proposed to cover the entire inhibitory range of the compounds. Four to five different concentrations of each inhibitor were selected: 2'-hydroxyflavanone: 10, 50, 100, 500 nM, and 1 μ M; 7-hydroxyflavone: 0.5, 1, 3, 7.5, and 15 μ M; naringenin: 500 nM, 1, 3, 7.5, and 15 μ M; quercetin: 5, 10, 20, and 30 μ M; apigenin: 5, 10, 20, and 30 μ M; luteolin: 10, 20, 30, and 40 μ M.

The third set of inhibition experiments was performed with the two most potent flavonoids, 2'-hydroxyflavanone and 7-hydroxyflavone, to examine the selectivity of inhibition towards AKR1C3. Both flavonoids were incubated with AKR1C1 or AKR1C2 (as described above for AKR1C3) in final concentrations given

below. The extent of inhibition was compared with that of the non-inhibited reaction. Three different concentrations of each inhibitor were chosen to determine the IC_{50} values: 2'-hydroxyflavanone: AKR1C1: 0.5, 5, and 20 μ M; 2'-hydroxyflavanone: AKR1C2: 5, 20, and 40 μ M; 7-hydroxyflavone: AKR1C1: 0.1, 1, and 3 μ M; 7-hydroxyflavone: AKR1C2: 3, 10, and 40 μ M.

2.5. HPLC conditions

High-performance liquid chromatography was carried out using an Agilent 1100 Series chromatographic system consisting of a gradient pump, autosampler, degasser, thermostated column department and fluorescence detector (Agilent Technologies, USA). For HPLC assessment of DHO, a method of Wsol et al. [18] was used. The mobile phase consisted of 10 mM hexane sulphonate buffer with 0.1 M triethyl amine:acetonitrile (75:25, v/v), pH 3.27. Flow rate was 1.5 ml/min and as chromatographic column, BDS Hypersil C₁₈, 250 mm \times 4 mm, 5 μ m (Thermo Electron Corporation, UK) was employed. DHO was measured by fluorescence detection using an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 418 nm. Limit of quantification for DHO was 10 pmol/ml.

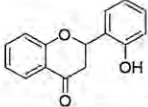
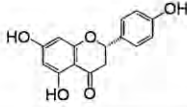
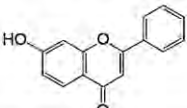
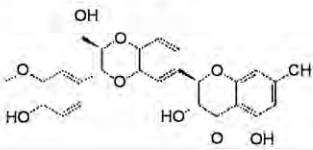
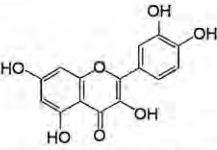
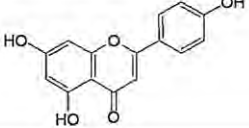
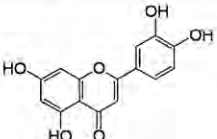
Compound	Main sources	Structure
2'-Hydroxyflavanone	Red and yellow fruits and vegetables [20]	
Naringenin	Citrus fruits [21]	
7-Hydroxyflavone	Red and yellow fruits, vegetables [8]	
Silibinin	Milk thistle (<i>Silybum marianum</i>)	
Quercetin	Onion, kale, french beans, broccoli, lettuce, tomato [14]	
Apigenin	Cereal grains, aromatic herbs (parsley, rosemary, thyme) [21]	
Luteolin	Cereal grains, aromatic herbs (parsley, rosemary, thyme) [21]	

Fig. 1. Occurrence and structures of the most potent tested inhibitors to AKR1C3 (See Refs. [20,21]).

2.6. Inhibition constant calculation

Inhibition potencies of flavonoids were characterized by determining their IC_{50} values using the GraphPad Prism Version 5.00 computer software. The IC_{50} values were calculated from the response of specific activities from the log concentration of the inhibitor. The values are given as mean \pm S.D. from $n = 3$ to 4 experiments. This program was also used for drawing Fig. 5.

2.7. Inhibition mechanisms

2'-Hydroxyflavanone was used to determine the mechanism of enzyme inhibition. Assays were carried out in volumes of 200 μ l by using the same conditions as with the enzyme activity measurements. Final concentrations of 2'-hydroxyflavanone were 100, 300, and 1000 nM. Experiments were performed in triplicates.

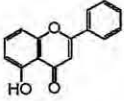
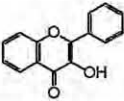
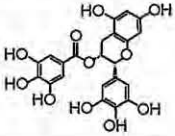
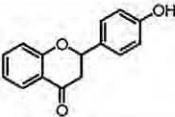
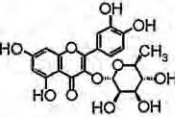
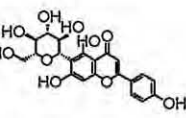
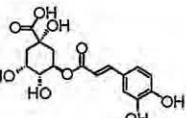
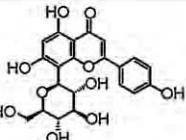
Compound	Main sources	Structure
5-Hydroxyflavone	Red and yellow fruits, vegetables [8]	
3-Hydroxyflavone	Red and yellow fruits, vegetables [8]	
Epigallocatechin gallate	Apples, hops, tea, beer	
4'-Hydroxyflavanone	Red and yellow fruits and vegetables [8]	
Quercitrin	Berries, tea, apple, onion, lettuce	
Isovitexin	Aspalathus linearis (rooibos), barley	
Chlorogenic acid	Coffee, apples, pears, berries, artichoke, aubergines	
Vitexin	Citrus fruits	

Fig. 2. Occurrence and structures of compounds with inhibitory effect less than 50% to AKR1C3.

3. Results

In the present study, several flavonoids and phenolic compounds were tested for their ability to effectively and selectively inhibit human AKR1C3. We chose compounds commonly occurring in the diet: vitexin, isovitexin, 2'-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, quercetin, caffeic acid, naringenin, chlorogenic acid, rutin, 4-hydroxybenzoic acid, quercitrin, epigallocatechin gallate, cyanin chloride, luteolin, taxifolin, silibinin and apigenin. Their occurrence and structures are summarized in Figs. 1–3.

First, we examined the inhibitory effect of the compounds in final concentrations of 20 μM . Results are shown in Fig. 4. The most potent inhibitor of AKR1C3 was 2'-hydroxyflavanone (98.9% inhibition). Very strong inhibitors were also 7-hydroxyflavone (82.5% inhibition) and naringenin (71.9% inhibition). Quite potent inhibitors were quercetin, silibinin, apigenin and luteolin with inhibitory effects of about 50%. Caffeic acid, rutin, 4-hydroxybenzoic acid, cyanin chloride and taxifolin did not display significant inhibition at 20 μM concentration.

The compounds with inhibitory effects of about 50% and higher were then tested in different concentrations (listed above) to infer their inhibition constants. Results are shown in Table 1. The most potent inhibitor was 2'-hydroxyflavanone with an IC_{50} value of 0.3 μM . The dependence of the response on $\log c$ of the inhibitor is shown in Fig. 5.

AKR1C3 is inhibited by 2'-hydroxyflavanone in an uncompetitive manner which is shown in Fig. 6.

Table 1

IC_{50} values of selective flavonoids inhibiting AKR1C3.

Compound	IC_{50} (μM)
2'-Hydroxyflavanone	0.3
Naringenin	2.4
7-Hydroxyflavone	4.9
Silibinin	6.2
Quercetin	18.8
Apigenin	21.8
Luteolin	37.4

Table 2

Stereoselective inhibition of AKR1C enzymes by 2'-hydroxyflavanone and 7-hydroxyflavone.

	2'-Hydroxyflavanone IC_{50} (μM)	7-Hydroxyflavone IC_{50} (μM)
AKR1C1	6.2	0.1
AKR1C2	47.1	38.9
AKR1C3	0.3	4.9

Very potent inhibitors were naringenin (2.4 μM IC_{50}), 7-hydroxyflavone (4.9 μM IC_{50}) and silibinin (6.2 μM IC_{50}). The rest of the flavonoids displayed IC_{50} values of about 20 μM and higher.

The two most potent inhibitors, 2'-hydroxyflavanone and 7-hydroxyflavone, were further examined regarding their selectivity of inhibition towards AKR1C3. Therefore, they were incubated in different concentrations (listed above) with AKR1C1 and AKR1C2, in addition to AKR1C3. Comparison of the IC_{50} values is summarized in Table 2. The inhibitory extent of 2'-hydroxyflavanone towards

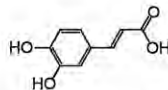
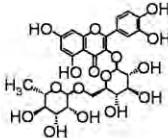
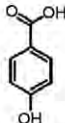
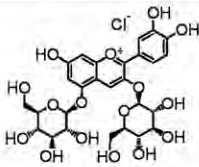
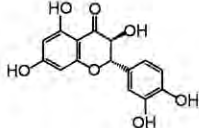
Compound	Main sources	Structure
Caffeic acid	Coffee, apples, pears, berries, artichoke, aubergines	
Rutin	Onions, cherries, apples, broccoli, kale, tomatoes, berries, tea, red wine	
4-Hydroxybenzoic acid	carrot, berries, cereal grains	
Cyanin chloride	berries, ginger, grapevine	
Taxifolin	Citrus fruits	

Fig. 3. Main sources and structures of compounds with no inhibitory effect to AKR1C3.

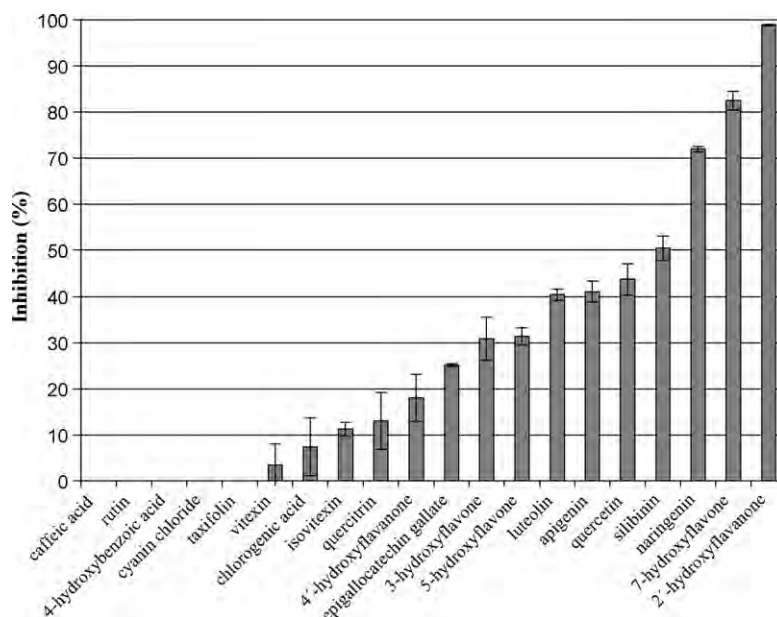


Fig. 4. Inhibitory effect of flavonoids and phenolic compounds in final concentrations of 20 μM towards AKR1C3.

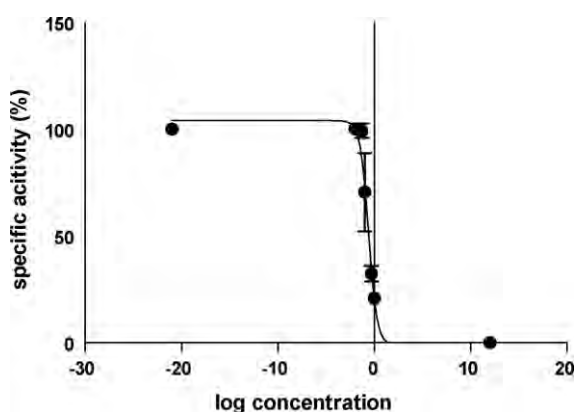


Fig. 5. The inhibitory effect of 2'-hydroxyflavanone towards AKR1C3.

AKR1C1 (6.2 μM IC_{50}) was 20 times lower than the inhibitory effect towards AKR1C3 (0.3 μM IC_{50}). By contrast, the inhibitory potency of 7-hydroxyflavone towards AKR1C1 (0.075 μM IC_{50}) was 65 times higher than that towards AKR1C3 (4.9 μM IC_{50}). The low inhibition

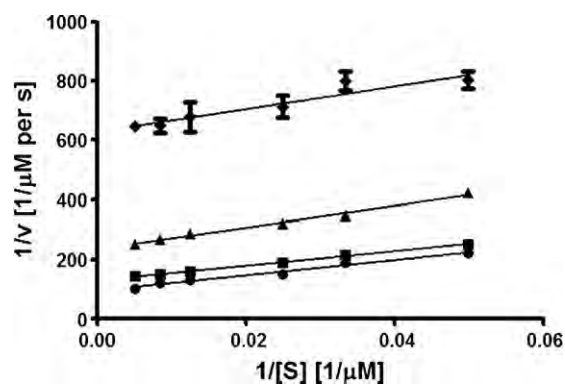


Fig. 6. Lineweaver-Burk double-reciprocal plot of the initial velocity versus the reciprocal concentration of oracin at different fixed concentrations of 2'-hydroxyflavanone. The 2'-hydroxyflavanone concentrations were 0 nM (●), 100 nM (■), 300 nM (▲), and 1000 nM (◆).

of AKR1C2 by both flavonoids does not reveal any clinical importance. Combined, because of its high potency and selectivity of AKR1C3 inhibition, 2'-hydroxyflavanone might be useful for clinical therapy of malignancies where AKR1C3 is overexpressed.

4. Discussion

The human AKR1C isozymes are involved in the pre-receptor regulation of steroid hormone action by regulating the concentration of active and inactive androgens, estrogens and progestins in target tissues [22–24]. AKR1C isozymes catalyze the reduction of ketosteroids at the C3, C17 or C20 positions [7]. Selective inhibitors of AKR1C isoforms provide tissue-specific effects of steroid hormones [6].

AKR1C3 reduces the weak androgen androstenedione to the potent androgen testosterone and the weak estrogen estrone to the potent estrogen 17β -estradiol and may stimulate proliferation of prostate and breast cancer cells [25]. AKR1C3 is thus an interesting target for the development of drugs treating or preventing of hormone-dependent forms of cancer [10,11]. Recently, several groups of scientists paid close attention for developing efficient and selective inhibitors of AKR1C isozymes on the base of NSAID structures, e.g. indomethacin or flufenamic acid [6,10].

In the present study, inhibitory effects of some flavonoids and phenolic compounds towards AKR1C3 were examined. These compounds were incubated with AKR1C3 in the presence of a NADPH generating system and oracin as a “specific” substrate. The carbonyl-reduced metabolite resulting from AKR1C3 activity, dihydrooracin (DHO), was measured by HPLC and very sensitive fluorescence detection. Most of the flavonoids and phenolic compounds displayed significant inhibition of AKR1C3, albeit with differing activities. The most potent inhibitor was 2'-hydroxyflavanone with an IC_{50} value of 0.3 μM , followed by naringenin (2.4 μM IC_{50}), 7-hydroxyflavone (4.9 μM IC_{50}) and silibinin (6.2 μM IC_{50}). Quite potent inhibitors were also quercetin (18.8 μM IC_{50}) and apigenin (21.8 μM IC_{50}).

Since we used a very sensitive fluorescence detection system and the specific substrate oracin, we compared our results with IC_{50} values already published by others [13]. The substrate used in the latter study was androstenedione and a scintillation-based detec-

tion system for both 3 α - and 17 β -reduction. The highest inhibition was reported for zearalenone (4 μ M IC₅₀), coumestrol (5 μ M IC₅₀) and quercetin (9 μ M IC₅₀). Surprisingly, 7-hydroxyflavone (24 μ M IC₅₀) and naringenin (33 μ M IC₅₀) did not display as good inhibition compared to our results. The reason for this discrepancy is unknown at present. The IC₅₀ value of apigenin did not differ.

Importantly, specific inhibition of AKR1C3 would help to unravel its role in steroid hormone and prostaglandin-dependent cancer development. Recently, an indomethacin analogue *N*-(4-chlorobenzoyl)-melatonin has been identified as a specific inhibitor of AKR1C3 with an IC₅₀ value of 11.4 μ M [10].

In the present study, the most potent flavonoids identified in a first experimental inhibitor screen were tested for the ability to selectively inhibit AKR1C3. Interestingly, the inhibitory effect of 2'-hydroxyflavanone towards AKR1C1 (6.2 μ M IC₅₀) was 20 times lower than that towards AKR1C3 (0.3 μ M IC₅₀). Inhibition of AKR1C2 by 2'-hydroxyflavanone was very low. These results predetermine 2'-hydroxyflavanone for a potential clinical use as a selective inhibitor of AKR1C3. On the other hand, the inhibitory potency of the second compound, 7-hydroxyflavone, towards AKR1C1 (0.075 μ M IC₅₀) was 65 times higher than towards AKR1C3 (4.9 μ M IC₅₀). This finding could also have clinical importance, because 7-hydroxyflavone is apparently very efficient and selective for AKR1C1 inhibition.

Our results show that some flavonoids are potent inhibitors of AKR1C3 and AKR1C1 *in vitro*, but there are only limited data available of whether these flavonoids can affect these enzymes *in vivo*. Plasma concentrations of the majority of flavonoids are not known, neither from normal diet nor from high-vegetable diet. Plasma concentrations of naringenin have been reported from healthy volunteers. Whereas the baseline concentration of naringenin was very low (4.8 nM), it increased to 113 nM after a 5 weeks high-vegetable diet (with moderate amounts of citrus) [26]. After single ingestion of grapefruit juice (8 ml/kg) the mean plasma concentration of naringenin even rose to 6 μ M. However, big inter-individual differences in terms of bioavailability were observed in this study, e.g. the highest concentration of naringenin observed after grapefruit juice drinking was 14 μ M [27]. According to the present investigation, the IC₅₀ value of naringenin for AKR1C3 was 2.4 μ M *in vitro*, hence, we would expect that concentrations of naringenin, and probably those of other flavonoids as well, may reach sufficient levels to affect AKR1C3 and hormone metabolism *in vivo*.

In conclusion, our results show that AKR1C3 could be a potential target for inhibition by dietary flavonoids and phenolic compounds. Especially 2'-hydroxyflavanone seems to be of potential clinical importance due to its IC₅₀ value of 300 nM. Moreover, 2'-hydroxyflavanone displays high selectivity towards AKR1C3 as compared to AKR1C1 and AKR1C2.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. U. Breyer-Pfaff for providing isolated human liver cytosolic enzymes AKR1C1 and AKR1C2. This project was supported by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 108/2006/C and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (MA 1704/5-1).

References

[1] U. Oppermann, Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47 (2007) 293–322.

[2] J.M. Jez, M.J. Bennett, B.P. Schlegel, M. Lewis, T.M. Penning, Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily, *Biochem. J.* 326 (1997) 625–636.

[3] J.M. Jez, T.G. Flynn, T.M. Penning, A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily, *Biochem. Pharmacol.* 54 (1997) 639–647.

[4] F. Hoffmann, E. Maser, Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily, *Drug Metab. Rev.* 39 (2007) 87–144.

[5] T.M. Penning, S. Steckelbroeck, D.R. Bauman, M.W. Miller, Y. Jin, D.M. Peehl, K.M. Fung, H.K. Lin, Aldo-keto reductase (AKR)1C3: role in prostate disease and the development of specific inhibitors, *Mol. Cell Endocrinol.* 248 (2006) 182–191.

[6] D.R. Bauman, S.I. Rudnick, L.M. Szweczek, Y. Jin, S. Gopishetty, T.M. Penning, Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: potential anti-neoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 60–68.

[7] T.M. Penning, M.E. Burczynski, J.M. Jez, C.F. Hung, H.K. Lin, H. Ma, M. Moore, N. Palackal, K. Ratnam, Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones, *Biochem. J.* 351 (2000) 67–77.

[8] P. Brožič, T. Šmuc, S. Gobec, T.L. Rižner, Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1, *Mol. Cell Endocrinol.* 259 (2006) 30–42.

[9] J. Komoto, T. Yamada, K. Watanabe, F. Takusagawa, Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3), *Biochemistry* 43 (2004) 2188–2198.

[10] M.C. Byrns, S. Steckelbroeck, T.M. Penning, An indomethacin analogue, *N*-(4-chlorobenzoyl)-melatonin is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3 α -HSD, type 5 17 β -HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 484–493.

[11] S. Gobec, P. Brožič, T.L. Rižner, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 5170–5175.

[12] L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, F.A. Tomás-Barberán, N. Datta, R. Singanusong, S.S. Chen, Flavonoids in food and their health benefits, *Plant Foods Hum. Nutr.* 59 (2004) 113–122.

[13] A. Krazeisen, R. Breitling, G. Möller, J. Adamski, Phytoestrogens inhibit human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5, *Mol. Cell Endocrinol.* 171 (2001) 151–162.

[14] J.V. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 1061–1080.

[15] G. Paganga, C.A. Rice-Evans, The identification of flavonoids as glycosides in human plasma, *FEBS Lett.* 401 (1997) 78–82.

[16] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747.

[17] R. Novotna, V. Wsol, G. Xiong, E. Maser, Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3, *Toxicol. Lett.* 181 (2008) 1–6.

[18] V. Wsol, E. Kvasnickova, B. Szotakova, I.M. Hais, High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of metabolites of the potential cytostatic drug oracine, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 681 (1996) 169–175.

[19] U. Breyer-Pfaff, K. Nill, High-affinity stereoselective reduction of the enantiomers of ketotifen and of ketonic nortriptyline metabolites by aldo-keto reductases from human liver, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 249–260.

[20] A.G. Atanasov, A.A. Dzyakanchuk, R.A.S. Schweizer, L.G. Nashev, E.M. Maurer, A. Odermatt, Coffee inhibits the reactivation of glucocorticoids by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a glucocorticoid connection in the anti-diabetic action of coffee? *FEBS Lett.* 580 (2006) 4081–4085.

[21] P.G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1035–1042.

[22] T.M. Penning, Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 281–305.

[23] T.M. Penning, Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action, *Hum. Reprod. Update* 9 (2003) 193–205.

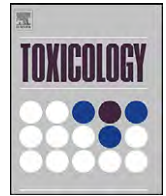
[24] D.R. Bauman, S. Steckelbroeck, T.M. Penning, The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action, *Drug News Perspect.* 17 (2004) 563–578.

[25] T.M. Penning, M.E. Burczynski, J.M. Jez, H.-K. Lin, H. Ma, M. Moore, K. Ratnam, N. Palackal, Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3), *Mol. Cell Endocrinol.* 171 (2001) 137–149.

[26] I. Erlund, M.L. Silaste, G. Alfthan, M. Rantala, Y.A. Kesäniemi, A. Aro, Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetable, *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (2002) 891–898.

[27] I. Erlund, E. Meririnne, G. Alfthan, A. Aro, Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice, *J. Nutr.* 131 (2001) 235–241.

Příloha 5: Publikovaný článek č. 2



Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin

Lucie Škarydová^a, Adam Skarka^a, Romana Novotná^a, Lucie Živná^a, Hans-Jörg Martin^b, Vladimír Wsól^{a,*}, Edmund Maser^{b,**}

^a Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic

^b Institute of Toxicology and Pharmacology for Natural Scientists, Campus Kiel, University Medical School Schleswig-Holstein, Brunswiker Str. 10, D-24105 Kiel, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2009

Received in revised form 17 July 2009

Accepted 17 July 2009

Available online 25 July 2009

Keywords:

Purification

Microsomes

Carbonyl reduction

Oracin

Enzyme kinetics

ABSTRACT

Carbonyl reducing enzymes play important roles in the biotransformation and detoxification of endo- and xenobiotics. They are grouped into two protein superfamilies, the short-chain dehydrogenases (SDR) and aldo–keto reductases (AKR), and usually are present in the cytoplasm of a cell. So far, only one membraneous carbonyl reductase has been described, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), which is located in the endoplasmic reticulum and which significantly contributes to the metabolism of a variety of carbonyl containing drugs and toxicants. Oracin is a new and prospective anticancer drug bearing a prochiral carbonyl moiety. The main metabolic pathway of oracin is carbonyl reduction to 11-dihydrooracin (DHO) which, however, eliminates the therapeutic potential of the drug, because the two DHO enantiomers formed have significantly less anti-tumor activities. Therefore, the oracin inactivating enzymes should urgently be identified to search for specific inhibitors and to enhance the chemotherapeutic efficacy. Interestingly, the calculation of enzyme specific activities and stereospecificities of (+)-DHO and (–)-DHO formation strongly suggested the existence of a second, hitherto unknown microsomal oracin carbonyl reductase in human liver. Therefore, the aim of the present study was to provide proof for the existence of this new enzyme and to develop a purification method for further characterization. First, we succeeded in establishing a gentle solubilization technique which provided a favourable detergent surrounding during the further purification procedure by stabilizing the native form of this fragile protein. Second, we could partially purify this new microsomal carbonyl reductase by a two step separation on Q-sepharose followed by Phenyl-sepharose. The enzyme turned out to be NADPH specific, displaying kinetic values for oracin carbonyl reduction of $K_m = 42 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 813 \text{ nmol}/(30 \text{ min} \times \text{mg protein})$. Compared to the microsomal fraction, the enzyme specific activity towards oracin could be enhanced 73-fold, while the stereospecificity of (+)-DHO formation shifted from 40% to 86%. Considering these data for 11 β -HSD1, as described in previous reports, it is clear that the microsomal carbonyl reductase investigated in the present study is new and has a great potential to significantly impair the chemotherapy with the new anticancer drug oracin.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carbonyl groups are found in many endogenic compounds and xenobiotics and often are the determining factor of their biological activity. Metabolic conversion of the carbonyl moiety

is therefore essential and is carried out mostly by two-electron reduction to the corresponding hydroxyl group. Carbonyl reducing enzymes are grouped into two distinct protein superfamilies, the short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) and the aldo–keto reductases (AKR) based on similar amino acid sequences and three-dimensional structures. The AKR superfamily comprises more than one hundred monomeric, soluble and cytosolic enzymes which can be found in all life forms (Jez et al., 1997; Jez and Penning, 2001), and only 13 human forms have been described so far. The SDRs represent one of the largest protein superfamilies, a heterogeneous group of more than 46,000 members, also present in all life forms (Oppermann et al., 2001; Hoffmann and Maser, 2007; Persson et al., 2009). SDRs are mainly oligomeric proteins, some of which distribute as membrane-bound forms in the endoplasmic reticulum,

Abbreviations: SDR, short-chain dehydrogenases/reductases; AKR, aldo–keto reductases; 11 β -HSD1, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; DHO, 11-dihydrooracin; CBR, carbonyl reductases; RDH, retinol dehydrogenases; BCA, bicinchoninic acid protein assay; TCA, trichloroacetic acid; CL_{int} , intrinsic clearance.

* Corresponding author. Tel.: +420 739488218.

** Corresponding author. Tel.: +49 431 597 3540.

E-mail addresses: vladimir.wsol@faf.cuni.cz (V. Wsól), maser@toxi.uni-kiel.de (E. Maser).

mitochondria or peroxisomes besides a great variety of cytosolic forms. Around 70 members have been identified within the human genome (Oppermann et al., 2001; Kallberg et al., 2002), where only 2/3 of the human SDRs have been characterized to at least some extent (regarding expression, substrate specificity, genomic features). Nevertheless, a significant portion of human SDRs still remains to be clarified and annotated (Wu et al., 2007).

The role of several carbonyl reducing enzymes in the metabolism of eobiotics is quite well known and widely studied. Their physiological substrates are steroid hormones, bile acids, retinoids and prostaglandins (Jez et al., 1997; Jez and Penning, 2001). Much less is known about the role of carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics. Carbonyl reduction is a significant step in phase I biotransformation, since the hydroxyl group generated is more hydrophilic and the metabolite can be conjugated and excreted more easily. It has been shown that many pharmacologically and toxicologically significant substrates undergo this biotransformation step which can have diverse consequences – inactivation (e.g. warfarin, aflatoxin B1, doxorubicin) or activation (e.g. dolasetron) of a drug (Maser, 1995; Breyer-Pfaff and Nill, 2004; Matsunaga et al., 2006). A list of drugs that are at least partially metabolised through carbonyl reduction was published (Rosemond and Walsh, 2004).

Overall, 12 human carbonyl reducing enzymes exhibiting activity toward different xenobiotics have been reported so far, seven of which are from the AKR superfamily and five from the SDR superfamily. From these, only AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR1B10, CBR1 and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) play a significant role in the metabolism of carbonyl-containing drugs (Martin et al., 2006; Matsunaga et al., 2006). It is probable that several more enzymes displaying pluripotency for eobiotics and xenobiotics exist, but they are still awaiting their discovery.

So far, only 11 β -HSD1 of all known xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes is found in the microsomal membrane. This enzyme was purified in active form from mouse and human liver using a gentle solubilization technique (Maser and Bannenberg, 1994; Maser et al., 2002). Besides 11 β -HSD1, there are several other microsomal members of the SDR superfamily. They belong to either the group of retinol dehydrogenases (RDHs) or 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs). The RDHs include 10 human members – all of them are associated with the endoplasmic reticulum and have activity towards retinoids (Liden and Eriksson, 2006). These enzymes have been extensively studied particularly for their function in the retina, but some are also expressed in extraocular tissues like liver, kidney and lung. Five human members (RDH11, RDH12, RDH14, retSDR1 and prRDH) have prevalent reductive activity towards retinal. Very interesting is the fact that mouse RDH11 and human RDH12 participate in the metabolism of toxicologically active aldehydes such as cis-6-nonenal and trans-2-nonenal, which are produced by lipid peroxidation of unsaturated fatty acids in tissues undergoing oxidative stress (Kasus-Jacobi et al., 2003; Belyaeva et al., 2005).

The only two microsomal 17 β -HSDs are the type 3 and type 7 isoforms which are both involved in the metabolism of steroid hormones (Lukacik et al., 2006). 17 β -HSD3 has been found almost exclusively in testis, whereas 17 β -HSD7 is predominantly expressed in human liver. Besides metabolizing steroids the latter also participates in postsqualene biosynthesis of cholesterol, but has no activity towards xenobiotics so far (Marijanovic et al., 2003).

In the near future, some of these microsomal enzymes with known physiological function may turn out as carbonyl reducing enzymes for xenobiotics. Moreover, some hitherto non-characterized members from the 70 human SDRs may also associate with the endoplasmic reticulum and may turn out to have activity towards carbonyl-bearing xenobiotics.

Oracin is one of the prospective anticancer drugs bearing a carbonyl moiety. The main mode of action is DNA intercalation, but also several other mechanisms have been demonstrated (inhibition of topoisomerase II, stimulation of aerobic consumption of glucose and, to a lesser extent, formation of lactate in tumor cells and induction of apoptosis) (Melka, 1993; Miko et al., 2002). Oracin has a significant toxicity against a wide spectrum of tumors and leukaemia cells both *in vitro* and *in vivo* (Melka, 1993). The main advantages of this novel cytostatic drug are the possibility of oral administration, the combination of different anti-tumor mechanisms, the absence of cardiotoxicity (Gersl et al., 1996), very low hepatotoxicity and beneficial pharmacokinetics. Due to its important biological activities and positive properties, the biotransformation of oracin has been intensively studied in common laboratory animals (Wsol et al., 1996, 1998; Szotakova et al., 1996) as well as in human liver (Wsol et al., 2000). The main metabolic pathway is carbonyl reduction of oracin to 11-dihydrooracin (DHO), although the basic structure of oracin contains two carbonyl groups. The second one, at position 5, represents a cyclic lactam which is hard to reduce. The carbonyl group in oracin is prochiral and its reduction leads to the formation of two enantiomers of DHO (Fig. 1). Importantly, this metabolic step eliminates the therapeutic potential of the drug, because the DHO enantiomers have significantly less anti-tumor activities. Therefore, the participating enzymes are urgently sought for which then specific inhibitors could be identified to enhance the chemotherapeutic outcome.

The stereospecific formation of DHO occurs in both the microsomal and cytosolic fractions. Stereospecificity depends on species and is also affected by gender (Wsol et al., 1998). In human liver cytosol oracin is metabolised by enzymes of the AKR1C subfamily. Purified AKR1C2 and AKR1C4 produce exclusively the (+)-DHO enantiomer, whereas AKR1C1 is responsible for the production of both enantiomers with preferable formation of (+)-DHO. AKR1C1 is also more efficient in biotransformation of oracin in comparison to AKR1C2 and AKR1C4 (Wsol et al., 2007). AKR1C3 was not purified from human liver, but a recombinant form of this enzyme was also shown to participate in the metabolism of oracin (Novotna et al., 2008).

Until today, only one human liver microsomal enzyme has been reported to participate in the biotransformation of oracin – 11 β -HSD1 which is a member of the SDR superfamily. This enzyme purified from human liver reduces oracin to (–)-DHO and (+)-DHO in a ratio of 76:24. However, whole human liver microsomes metabolise oracin with different stereospecificity, where the formation of (–)-DHO (60%) predominates over (+)-DHO (40%). The difference in (+)-DHO formation between purified 11 β -HSD1 and whole microsomes can only be explained by the existence of at least one additional enzyme, which obviously displays high stereospecificity for (+)-DHO production (Fig. 2).

The aim of the present study was providing proof for the existence of an additional oracin carbonyl reducing enzyme in human liver microsomes that participates in the inactivation of the drug. To reach this goal, at least the partial purification of this novel enzyme in active form was envisaged. For our studies, we took advantage of the hypothesis from Wsol et al. (2004) that the difference in stereospecificity between purified 11 β -HSD1 and whole human liver microsomes is caused by at least one other microsomal enzyme. This enzyme should exhibit an opposite stereospecificity compared to 11 β -HSD1 and should preferably form (+)-DHO. We used a chiral HPLC method for the determination of both DHO enantiomers as a sensitive marker. The partially purified enzyme was characterized in terms of its kinetic parameters in oracin carbonyl reduction and its cofactor preference. As a result, we provide evidence for the existence of a hitherto unknown carbonyl reducing enzyme which contributes to oracin inactivation to a rather high extent.

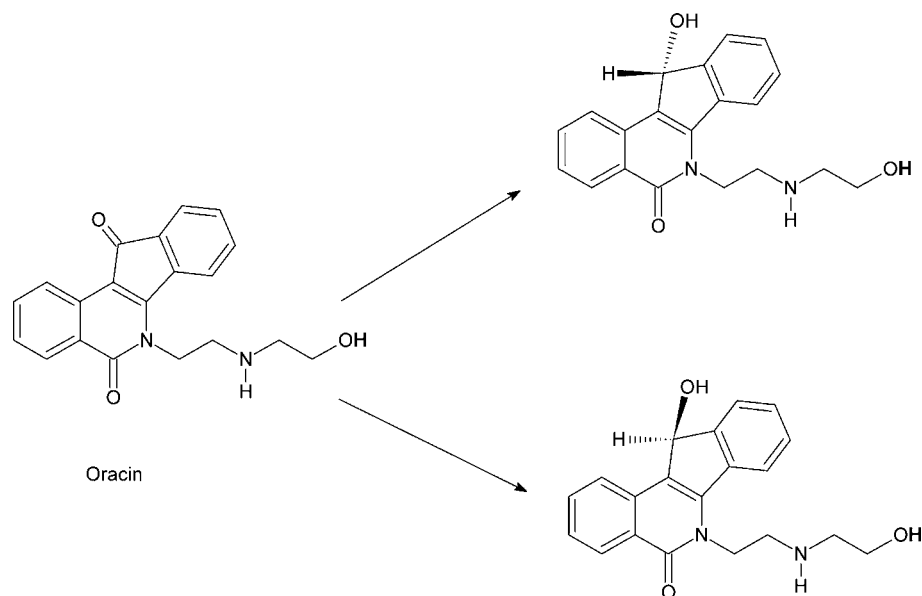


Fig. 1. Metabolic conversion of the pro-chiral molecule oracin to (+)-DHO and (–)-DHO enantiomers.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and chromatography columns

Oracin, *rac*-DHO, (+)-DHO and (–)-DHO were obtained from the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry (Prague, Czech Republic). Enzyme purification was carried out with Sephadex G-25, Q-sepharose and Phenyl-sepharose low sub-columns obtained from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Enzymatic tests were performed with NADP⁺, glucose-6-phosphate from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic) and glucose-6-phosphate dehydrogenase from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic) and sodium perchlorate monohydrate and sodium hexanesulphonate monohydrate were from Fluka (Prague, Czech Republic). Detergents were supplied from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Other chemicals were of the highest purity commercially available.

2.2. Preparation of human liver microsomes

Human liver samples were obtained following routine surgical procedures in accordance with Czech legislation. These tissues samples were stored at –80 °C and served as source for microsomes. 3 g of human liver samples were homogenized in three volume of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, using a glass-Teflon Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenate was centrifuged at 5,000 × g for 20 min to sediment ligament, cell debris and nuclei. The supernatant at this stage was cen-

trifuged at 20,000 × g for 60 min to sediment mitochondria. The supernatant after the second centrifugation was used again for a third centrifugation at 105,000 × g for 65 min to separate the cytosol and microsomes. Microsomal pellets were three times resuspended in one volume of the homogenization buffer and again three times centrifuged at the same conditions to remove traces of cytosol. All centrifugation steps were carried out at 4 °C. After a final washing of microsomes, microsomal pellets were resuspended in one volume of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, with 20% (v/v) glycerol and stored at –80 °C. All steps between centrifugations were made in a cooling room at 4 °C to avoid enzyme inactivation. The absence of contaminating cytosolic enzymes in microsomes was proven by determination of lactase dehydrogenase activity which has no activity in pure microsomes.

2.3. Optimization of the solubilization process

Optimization of the solubilization process was carried out with respect to the choice and concentration of a detergent in the solubilization buffer. Different solubilization buffers were prepared that all consisted of 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 M NaCl and 40% (v/v) glycerol, pH 7.4, but contained different detergents in various concentrations. Four different types of non-ionic detergents were chosen—octaethyleneglycol monododecylether (C12E8), ethyleneglycol monododecylether (C4E8), dodecyl-β-D-maltoside (DDM) and Triton X-100 in concentrations of 5, 10, 20, 40 mM, corresponding to detergent:protein ratios of 1:1, 2:1, 3:1 or 5:1 (w/w). Respective buffers were mixed with the same volume of microsomal suspension. This mixture was gently stirred on ice for 45 min and subsequently centrifuged in Sorvall TST 60.4 rotor (Du Pont, USA) at 38,000 rpm for 60 min at 4 °C. The carbonyl reducing activity toward oracin, protein content and specific activity were determined in each supernatant and the corresponding dissolved pellet.

2.4. Partial purification of the unknown microsomal enzyme

2.4.1. Solubilization of microsomes

For solubilization of membrane-bound proteins the microsomal suspension was diluted with an equal volume of the solubilization buffer consisting of 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 40% (v/v) glycerol and 0.66% (w/v) of the non-ionic detergent Triton X-100, pH 7.4. The solution was gently stirred for 45 min on ice and subsequently centrifuged in Sorvall TST 60.4 rotor (Du Pont, USA) at 38,000 rpm for 60 min at 4 °C.

2.4.2. Desalting of microsomes

HiTrap desalting 5 ml columns (GE Healthcare, Sweden) were equilibrated with buffer A (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 10% (v/v) glycerol and 1.98% (w/v) Triton X-100). Solubilized microsomes were applied to the column to remove salts from the protein sample. Separation was also performed with buffer A, flow rate at 1.5 ml/min and the elution was monitored by measuring the absorbance at 280 nm and conductivity. Samples containing protein were concentrated by Amicon Ultra-15 10K tubes (Millipore, USA) that were centrifuged at 5,000 × g at 4 °C.

2.4.3. Separation on Q-sepharose

The concentrated desalted microsomes corresponding to 5.5 mg of protein were loaded onto an anion-exchange chromatography column, HiTrap Q-Sepharose FF 1 ml (GE Healthcare, Sweden), previously equilibrated with buffer A (20 mM

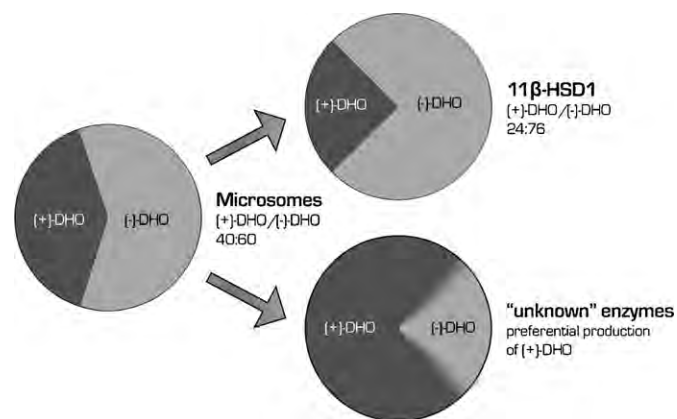


Fig. 2. Stereospecificity of oracin carbonyl reduction in human liver microsomal fraction and purified human 11β-HSD1. From differences in stereospecificities it is anticipated that at least one other human microsomal enzyme contributes to the metabolism of oracin with preferential formation of (+)-DHO (dark section). The anticipated ratio for the new enzyme was calculated based on the known ratios of the complete microsomal fraction to that known from purified 11β-HSD1.

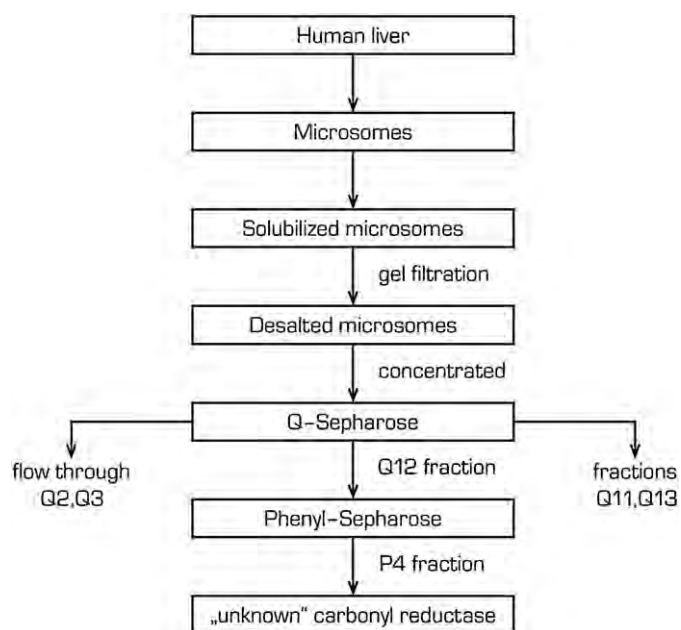


Fig. 3. Flow chart of the partial purification of the "unknown" carbonyl reductase. Besides fraction Q12 that was used for further purification, other fractions from Q-sepharose purification with less reducing activity towards oracin were obtained.

Tris-HCl, pH 8.0, 10% (v/v) glycerol and 1.98% (w/v) Triton X-100). The second buffer for elution of the proteins was buffer B (buffer A + 1 M NaCl). The flow rate was 0.5 ml/min and the volume per fraction was 1 ml. The elution started with buffer A (segment 0–6 ml) and subsequently with a progressive gradient of NaCl to reach the final concentration of 1 M NaCl (segment 7–22 ml) which was equal to buffer B (segment 23–26 ml). Each fraction was collected and its oracin reducing activity was determined.

2.4.4. Separation on Phenyl-sepharose

The fraction obtained after Q-sepharose chromatography with the highest enzyme activity regarding (+)-DHO formation (Q12 in Fig. 3) (total protein amount: 0.27 mg) was applied to a HiTrap Phenyl-sepharose 6 FF (low sub) 1 ml column (GE Healthcare, Sweden). For protein separation, the following buffers were used: Buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% (v/v) glycerol, 1 M ammonium sulphate, 0.11% (w/v) Triton X-100) and buffer D (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 0.11% (w/v) Triton X-100). The flow rate was 1 ml/min and the volume per fraction was 1 ml. Before the sample was loaded, the column was equilibrated with buffer C. The elution started with buffer C (0–5 ml), continued with a linear decreasing gradient of ammonium sulphate to final concentration of 0 M (segment 6–20 ml) which was equal to buffer D (segment 21–30 ml). Each fraction was collected and tested for oracin reducing activity. A detailed scheme of the purification procedure is shown in Fig. 3. All purification steps were carried out at 4 °C and the samples were continuously kept on ice. The profile of protein elution was controlled by measurement of absorbance at 280 nm and conductivity.

2.5. Enzyme assay

Carbonyl reducing activities in fractions during the purification process were tested by incubation with oracin. Standard incubation mixtures of microsomes and fractions after each purification step were prepared in Eppendorf microtubes at 37 °C in a total volume of 100 µl as follows: 5 µl of the liver microsomal suspension (corresponding to 5 mg of wet tissue) or 50 µl fractions from the purification process were incubated with oracin as the substrate (at final concentrations of 0.5 mM) and 20 µl of NADPH-generating system (final concentrations: 0.8 mM NADP⁺, 6 mM glucose-6-phosphate, 35 units glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3 mM MgCl₂) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Reactions were started by adding 10 µl of 5 mM oracin. After 30 min incubation at 37 °C the reactions were terminated by adding 40 µl 26% ammonia solution and cooling to 0 °C. 11-Dihydrooracin (DHO) was extracted with 300 µl ethyl acetate, each microtube was vigorously shaken for 10 s on a lab dancer test tube shaker and centrifuged for 2 min in a microcentrifuge. Organic phases were transferred to new Eppendorf microtubes and extracts were evaporated to dryness under vacuum. Dry samples were dissolved in 250 µl mobile phase prior to their HPLC injection. Control experiments without biological material were performed to determine non-enzymatic substrate conversion. Specific activities are expressed as nmol of DHO formed per mg of protein within 30 min.

2.6. Metabolite determination by HPLC

After enzymatic conversion of oracin to DHO, the total amount of this metabolite and also its enantiomers were detected on a HPLC Agilent 1100 Series chromatographic system consisting of a gradient pump, autosampler, degasser, thermostated column compartment and fluorescence detector (Santa Clara, USA). A method of Wsol et al. (1996) was used for the determination of the total amount of DHO (column: BDS Hypersil C₁₈, 250 mm × 4 mm, 5 µm; mobile phase: a mixture of a buffer consisting of 10 mM hexanesulphonate and 0.04 mM triethyl amine, pH 3.27 with an acetonitrile:water ratio of 75:25 (v/v); flow rate 1.5 ml/min; fluorescence detection: excitation/emission wavelengths of 340/418 nm, respectively). Several chiral stationary phases (CSP) were tested to separate DHO enantiomers and finally the CSP on base of substitutive cellulose was the best choice. DHO enantiomers were detected as described in Wsol et al. (1999) (column: OD-R Chiralcel 240 mm × 4.6 mm; mobile phase: 0.3 M ammonium perchlorate, pH 3.0 and an acetonitrile:water ratio of 69:31 (v/v); flow rate 0.5 ml/min; fluorescence detection: excitation/emission wavelengths of 340/418 nm, respectively). Fig. 4 shows an example of chiral DHO separation of fraction P4 after Phenyl-sepharose.

2.7. Cosubstrate determination of the partially purified enzyme

The partially purified oracin carbonyl reductase was characterized in terms of its cosubstrate preference. 20 µl of the enzyme solution was incubated with either NADPH or NADH. In case of NADPH, the NADPH-generating system (described above) was used. For assessing the enzyme activity with NADH, the latter was added to final amounts of 6 mM in the reaction mixture.

2.8. Determination of enzyme kinetics

The fraction after Phenyl-sepharose containing the new microsomal enzyme was also used to determine the kinetic parameters of oracin carbonyl reduction. Assays were carried out in a total volume of 100 µl corresponding to the procedure during enzyme purification. In brief, 20 µl of the partially purified enzyme was incubated with oracin in final concentrations ranging from 0.05 to 0.8 mM and an NADPH generating system in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The kinetic constants were determined using the GraphPad Prism 5.0 computer software. The values are given as mean ± S.D. from triplicates.

2.9. Protein determination

Protein concentrations in liver microsomes and all fractions during the purification process were determined by the BCA method (bicinchoninic acid assay). Fractions obtained after separation on Phenyl-sepharose were precipitated by trichloroacetic acid (TCA) and sodium chloride (NaCl) solution prior to the BCA assay. Altogether, 500 µl of 10% TCA containing 4 M NaCl was added to 50 µl of each sample, vigorously shaken and, after 15 min precipitation at room temperature, centrifuged at 14,500 rpm for 15 min. Supernatants were discarded without damaging the pellets, which were then dissolved in water for protein determination by BCA.

2.10. SDS electrophoresis

Concentrated and desalted microsomes along with selected fractions after each purification step (Q12, P4 in Fig. 3) were analyzed by SDS-PAGE on 1.5 mm Tris-glycine gel (12% (w/v) separating gel and 4% (w/v) focusing gel). Samples were mixed with three times concentrated sample buffer (150 mM Tris-HCl, 6% (w/v) SDS, 18% (w/v) glycerol, 3% (w/v) 2-mercaptoethanol, 0.012% (w/v) bromphenol-blue) in given ratio 2:1. 5 µl of concentrated and desalted microsomes were mixed with 2.5 µl of sample buffer and 40 µl of fraction samples were mixed with 20 µl of sample buffer. Prepared samples were completely loaded on the gel. Electrophoresis was performed using a Mini-Protean system (Bio-Rad, USA) at 100 V in focusing gel and at 200 V in separating gel. The gel was stained with a new silver stain (Chevallet et al., 2008). Silver was reduced with D-ribose.

3. Results

3.1. Optimization of solubilization

In the search for the new microsomal enzyme participating in the metabolism of the anticancer drug oracin, a purification scheme was developed that led to a 73-fold increase in specific activity compared to solubilized, concentrated and desalted human liver microsomes as the primary sample. A previously identified microsomal enzyme, 11β-HSD1, which was shown to catalyze oracin carbonyl reduction, was purified from mouse and human liver by using the non-ionic detergent Emulgen 913 (Maser et al., 2002). In these studies a gentle solubilization procedure was developed

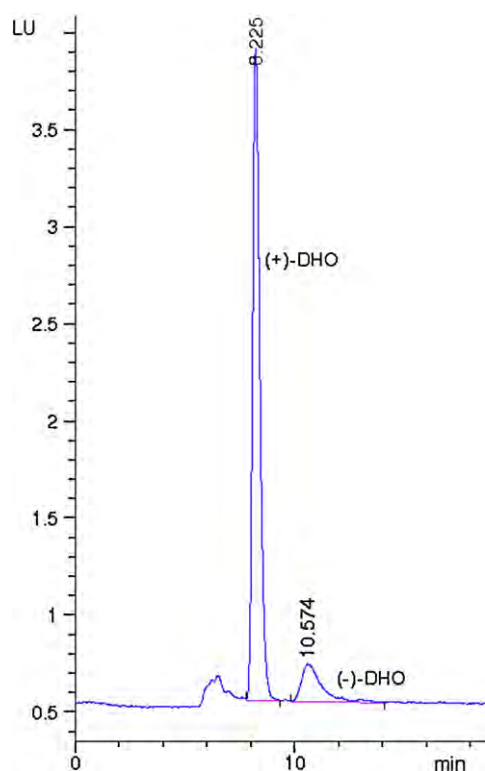


Fig. 4. Chiral separation of DHO enantiomers of sample P4 after Phenyl-sepharose on HPLC. A very selective fluorescent method allows the detection of only reduced oracin metabolites.

to stabilize the architecture and functionality of the enzyme. In the present study, this solubilization procedure was used and optimized with respect of the type and concentration of the detergent. Four different non-ionic, mild detergents were taken whose success of solubilization was determined by assessing the reducing activity toward oracin in the resulting supernatants. Results are expressed as % of DHO formation compared to the primary activity in microsomes (Fig. 5). It turned out that the best detergent for solubilization of the searched enzyme was Triton X-100 in a concentration of 10 mM which corresponded to a detergent:protein ratio of 2:1 (w/w).

This approach yielded almost 90% of the primary reducing activity obtained in microsomes. It should be noted that the total sum of activity in the corresponding supernatant and pellet is usually below 100%, a fact which is probably caused by incomplete dissolution of the pellet. In comparison to the purification of 11 β -HSD1, the addition of sodium cholate was left out, because due to the first purification step (ion-exchange) the increase of ionic strength was unwanted. Salts in a sample interfere with protein separation on ion-exchange chromatography. Therefore, an additional gel filtration on Sephadex G-25 was employed for desalting the solubilized microsomes. Desalted microsomes were concentrated by ultrafiltration in Amicon tubes.

3.2. Purification of the new membrane-bound carbonyl reducing enzyme

Desalted and concentrated microsomes were loaded onto a Q-sepharose column. The buffers applied for protein separation contained Triton X-100 in a concentration corresponding to the detergent:protein ratio that was employed for solubilization. Fractions obtained were tested for oracin carbonyl reduction, and for enzymatically active fractions their stereospecificity and specific

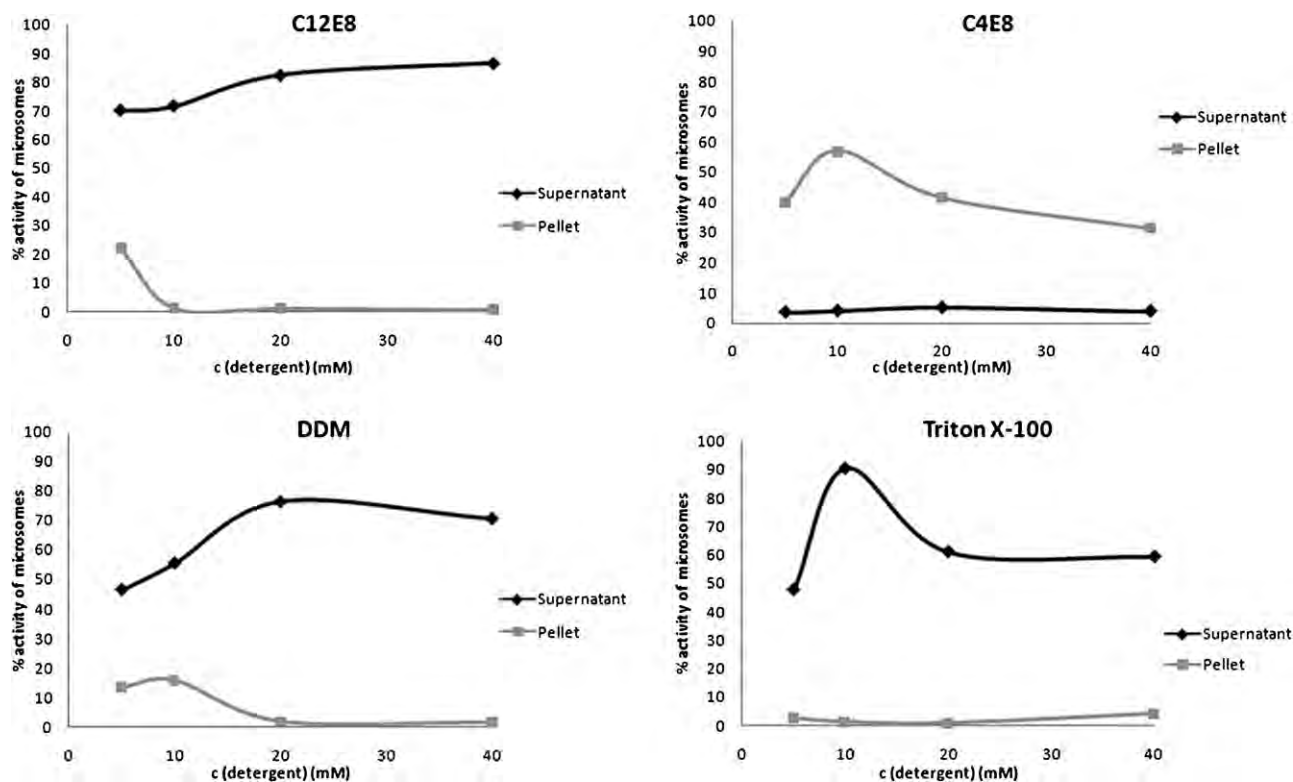


Fig. 5. Determination of the most suitable detergent for solubilization of human liver microsomes. Microsomal suspensions were diluted with solubilization buffers containing different detergents—octaethyleneglycol monododecylether (C12E8), ethyleneglycol monododecylether (C4E8), dodecyl- β -D-maltoside (DDM) and Triton X-100 in concentrations of 5, 10, 20, 40 mM (which correspond to a detergent:protein ratio of 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 (w/w)). The success of solubilization is expressed as % of remaining enzyme activity compared to that in microsomes towards oracin. Reducing activity was tested in both the resulting supernatants and corresponding pellets.

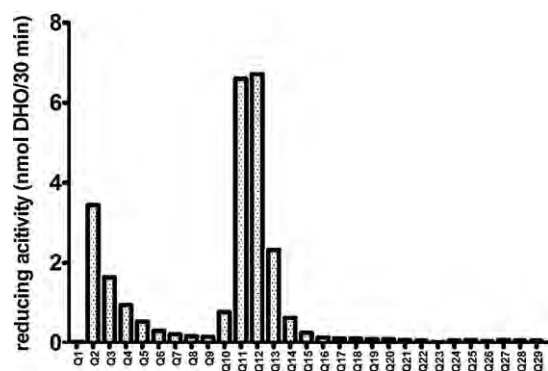


Fig. 6. Distribution of reducing activity towards oracin in particular fractions after the first purification step on Q-sepharose column. Fractions Q11 and Q12 have similar reducing activity towards oracin, but the Q12 fraction displays higher stereospecificity to (+)-DHO. Fraction Q12 was used for the second purification step. Some other fractions (Q2, Q3, Q11, Q13) also show moderately high reducing activity, but with different stereospecificity.

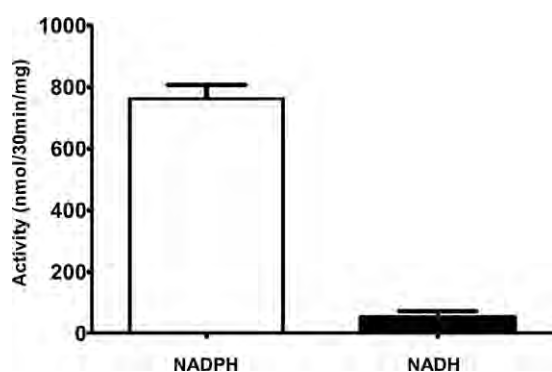


Fig. 7. Cosubstrate preference of enzyme activity towards oracin after Phenyl-sepharose. The activity of the partially purified enzyme was tested in the presence of either NADPH or NADH. Values are given as means \pm S.D. from $n = 3$ experiments.

activity were determined. The total yield of activity after this chromatographic step, expressed as the sum of reducing activity toward oracin in all active fractions, was 80% of the primary reducing activity applied onto the Q-sepharose column (Fig. 6).

The fraction with the highest oracin reducing activity that also exhibited preferential formation of the (+)-DHO enantiomer (82%) was loaded onto a Phenyl-sepharose column. Also at this chromatographic step the 2:1 detergent:protein ratio (w/w) (Triton X-100) was kept in all buffers. Corresponding to the previous separation, the oracin carbonyl reducing parameters, specific activity and stereospecificity, were determined after Phenyl-sepharose. The total yield of reducing activity was 77% compared to that loaded onto the column. One particular fraction not only produced very high amounts of (+)-DHO (86%), but also showed an extensively increased specific activity. Compared to microsomes, the specific activity of the partially purified new enzyme could be enhanced to about 73-fold. A synopsis of the purification steps is given in Table 1.

3.3. Cosubstrate preference determination

The fraction obtained from Phenyl-sepharose metabolized oracin with preferential formation of (+)-DHO (86%), which is in accordance with our original hypothesis. For further characterization of the new microsomal enzyme we determined the cosubstrate preference. It could be shown that the enzyme is strongly NADPH-dependent, since it shows significantly higher oracin reducing activity in the presence of NADPH (765 ± 50 nmol/(30 min \times mg)) than with NADH (52 ± 20 nmol/(30 min \times mg)) (Fig. 7).

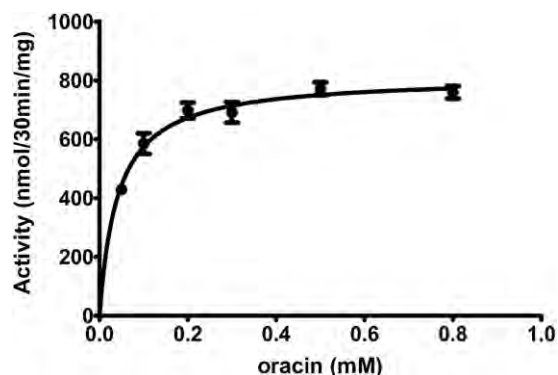


Fig. 8. Kinetic profile of DHO formation catalyzed by the partially purified enzyme after Phenyl-sepharose. Values are given as means \pm S.D. from $n = 3$ experiments.

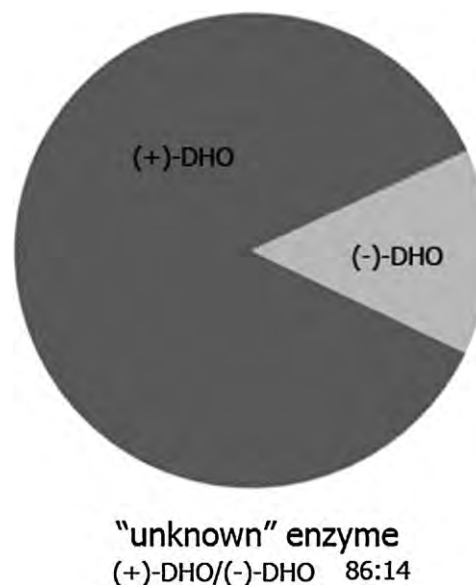


Fig. 9. Stereospecificity of the new enzyme for oracin carbonyl reduction. The partially purified enzyme obtained after Phenyl-sepharose metabolises oracin to DHO in a (+)-DHO/(-)-DHO ratio of 86:14, a fact which corresponds perfectly to our initial hypothesis.

3.4. Kinetic characterization of the new carbonyl reducing enzyme

The enzyme kinetics of oracin carbonyl reduction in the partially purified fraction was studied in a substrate concentration range between 0.05–0.8 mM. The Michaelis–Menten constant (K_m) and the maximum velocity (V_{max}) for the total amount of DHO produced were calculated according to the Michaelis–Menten equation (Fig. 8).

The new membrane-bound NADPH-dependent carbonyl reducing enzyme is characterized by a K_m of 41.6 ± 5.9 μ M, a V_{max} of 813.1 ± 22.5 nmol/(30 min \times mg) and an intrinsic clearance value, expressed as enzymatic efficiency (CL_{int}), of 19.5 ml/(30 min \times mg). Interestingly, the preferential production of (+)-DHO (86%) corresponds well to the hypothesis of our project (Fig. 9).

4. Discussion

Analyses of genomic sequences suggest that 30% of the proteins produced by *Homo sapiens*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and others would be integral membrane proteins (Wallin and Von-Heijne, 1998). However, there is dearth of information

Table 1
Summary of the partial purification of the unknown microsomal enzyme with activity toward oracin from human liver.

Step	Total protein (mg)	Total reducing activity (nmol/30 min)	Specific activity (nmol/(30 min × mg protein))	Purification (x-fold)	Stereospecificity ((+)-DHO ^a /(-)-DHO) ^a
Microsomes	14.7 ^b	151	10	-	40/60
Desalted and concentrated microsomes	5.5 ^b	47.3	9	1	-
Q-sepharose	0.27 ^b	6.7	25	3	82/18
Phenyl-sepharose	0.0015 ^c	0.95	633	73	86/14

^a DHO-11-dihydrooracin.

^b Determined by BCA protein assay.

^c Samples were first precipitated with 10% TCA and 4 M NaCl and then determined by the BCA method.

Table 2
Kinetic parameters for DHO production catalyzed by all known oracin carbonyl reducing enzymes known so far.

Enzyme	Form	DHO ^a	V _{max} (nmol/30 min/mg)	K _m (μM)	CL _{int} ^b (ml/30 min/mg)	Ref.
New microsomal enzyme 11β-HSD1	Partially purified	Total DHO	813 ± 23	42 ± 6	19.5	This study
	Purified	(+)-DHO	25 ± 1	190 ± 10	0.1	Wsol et al. (2004)
		(-)-DHO	75 ± 3	150 ± 20	0.5	
AKR1C1	Purified	(+)-DHO	19,200 ± 2,100	160 ± 30	123	Wsol et al. (2007)
		(-)-DHO	360 ± 60	60 ± 20	6	
AKR1C2	Purified	(+)-DHO	900 ± 90	90 ± 20	9	Wsol et al. (2007)
AKR1C3	Recombinant	Total DHO	169 ± 6	110 ± 11	1.5	Novotna et al. (2008)
AKR1C4	Purified	(+)-DHO	147 ± 3	150 ± 40	1.5	Wsol et al. (2007)

^a DHO-11-dihydrooracin.

^b CL_{int} – intrinsic clearance; expressed as enzymatic efficiency.

about their properties, three-dimensional structure and behaviour within the membrane. A major problem in elucidating their function is that membrane proteins usually occur in low abundance within the cell such that it is difficult to obtain sufficient amounts. Moreover, since membrane proteins are generally not soluble in aqueous solutions it is important for their characterization to transfer them into an environment that mimics the hydrophobic nature of their transmembrane segments (Seddon et al., 2004). In many cases, this is achievable with detergents which, above the critical micellar concentration form micelles analogous to the bilayers of biological membranes. Detergent micelles usually contain one molecule of protein per micelle and are obtained after solubilization of the membranes (Bhairi, 1997). The choice of a suitable detergent that releases the membrane-protein from biological membranes together with preservation of its native form and biological activity is very important and is often the result of an endless process of trial and error. This is because particular membrane-bound proteins have different solubilization requirements. On the other hand, membrane proteins are of major interest, because many of them play vital roles in myriads of different cellular functions (Seddon et al., 2004).

In the present study, we aimed at extending the knowledge about human membrane-bound carbonyl reducing enzymes by purification and characterization of a new oracin reductase from human liver endoplasmic reticulum. The study was based on a hypothesis of Wsol et al. (2004) that the difference in stereospecificity of DHO enantiomer formation between the only hitherto purified membrane-bound human enzyme, 11β-HSD1, and the whole human liver microsomal fraction is caused by at least one additional membrane-bound enzyme with reductive activity towards oracin and preferential formation of (+)-DHO. As a first step to prove this hypothesis it was necessary to solubilize the novel enzyme in active form. Maser et al. successfully purified 11β-HSD1 from mouse and human liver microsomes by a gentle solubilization method (Maser and Bannenberg, 1994; Maser et al., 2002), which we took as a starting point. First, it was necessary to optimize the solubilization protocol for our purpose, i.e. to find the most favourable detergent for the expected variant enzyme species. Since there is no versatile detergent for all cases and there are no general rules for the choice of a specific detergent to a given

membrane protein so far, it was necessary to choose the most suitable detergent by trial and error. We started with four different types of non-ionic, mild detergents and tested their effect on the unknown oracin carbonyl reducing enzyme. The best detergent for solubilization of the new enzyme was Triton X-100 in a detergent:protein ratio of 2:1 (w/w), which preserved 90% of the primary reductive activity toward oracin compared to that in microsomes. A similar solubilization efficiency was reached with the detergent C12E8, but in concentrations of 30–40 mM which corresponds to detergent:protein ratios of 3:1 resp. 5:1 (w/w). These relatively high detergent concentrations usually interfere with chromatographic protein separation and should be avoided here, since the selected detergent:protein ratio for solubilization would automatically be used in the subsequent purification step. In addition, a detergent:protein ratio of 2:1 is generally recommended (Scopes, 1994).

For successful chromatographic separation of proteins in an active state the combination of ion-exchange chromatography (IEX), hydrophobic-interaction chromatography (HIC) and gel filtration (GF) in sequence is recommended (Anonymous, 2001). We followed this recommendation and have chosen the most appropriate chromatographic matrices and buffers which consisted of separation on Q-sepharose (strong anion-exchange matrix) as the first purification step followed by separation on Phenyl-sepharose. Buffers with Triton X-100 provided a favourable detergent surrounding to obtain a maximum yield of the target enzyme which was tested towards oracin carbonyl reduction throughout the purification.

Finally, we obtained the partially purified enzyme that exhibited a high stereospecificity (86%) for production of (+)-DHO. This enantiomeric ratio of 86% production of (+)-DHO has never been observed so far, such that the responsible enzyme has to be regarded as a novel microsomal carbonyl reductase. The purified fraction displayed a 73-fold increase in specific activity compared to human liver microsomes. It should be noted that the increase in specific activity during the purification would even be higher, considering that oracin is not the substrate for a single enzyme in microsomes, and that at least 11β-HSD1 contributes to this activity. Also, it cannot be ruled out that in microsomes more than two enzymes are active with oracin carbonyl reduction. However,

although the specific activity of the novel membrane-bound carbonyl reductase is rather high, it was impossible to detect the enzyme in the P4 fraction on a SDS gel stained by silver stain. This can possibly be explained by the fact that the catalytic efficiency of the new enzyme is considerably higher than that of the other oracin reductases (Table 2). Moreover, it is to be suspected that the active fraction from Phenyl-sepharose also contains a certain amount of keratins and some other impurities as well. Therefore the determined protein concentration must not necessarily reflect enzyme concentration.

As already mentioned, so far only one microsomal enzyme, 11 β -HSD1, was known to participate in the metabolism of oracin (Wsol et al., 2004). It should be noted, however, that several cytosolic enzymes also take part with different efficiency in the biotransformation of oracin: these are AKR1C1–AKR1C4 (Wsol et al., 2007; Novotna et al., 2008) and AKR1B10 (Martin et al., 2006).

On the other hand, when the enzyme kinetic parameters of all known oracin carbonyl reductases published so far are compared, a great contribution in the metabolism of oracin can be expected for the new membrane-bound enzyme described here. Compared to microsomal 11 β -HSD1, the new carbonyl reductase displays a five times lower K_m and a more than one order of magnitude higher V_{max} . This corresponds to a two orders of magnitude higher intrinsic clearance value for oracin than that calculated for 11 β -HSD1. Moreover, when comparing the kinetic data with cytosolic reductases, it is clear that the described microsomal enzyme contributes to the deactivation of the anticancer drug oracin to a rather high extent.

In conclusion, the present study reports on the purification and characterization of a new human microsomal carbonyl reductase with activity toward the anticancer drug oracin. The partially purified enzyme catalyzes the reduction of oracin in a stereospecific manner (86% production of (+)-DHO) and also with higher efficiency and affinity compared to microsomal 11 β -HSD1 and compared to cytosolic carbonyl reductases. It is to be concluded, therefore, that the present novel carbonyl reductase will significantly contribute to the biotransformation of oracin in humans. Moreover, it is possible that the enzyme also plays an important role in the deactivation of similar anticancer drugs bearing a carbonyl moiety (doxorubicin, daunorubicin). For the above reasons it is imperative to finally identify the novel enzyme's nature and to infer its role in drug resistance during cancer chemotherapy.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgement

This project was supported by the Czech Science Foundation, Grant No. 303/07/0994 and the "Deutsche Forschungsgemeinschaft" (MA 1704/5-1).

References

- Anonymous, 2001. Protein Purification Handbook 18-1132-29, Amersham Biosciences.
- Belyaeva, O.V., Korkina, O.V., Stetsenko, A.V., Kim, T., Nelson, P.S., Kedishvili, N.Y., 2005. Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids. *Biochemistry* 44 (18), 7035–7047.
- Bhairi, S.M., 1997. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems. Calbiochem-Novabiochem Corporation.
- Breyer-Pfaff, U., Nill, K., 2004. Carbonyl reduction of naltrexone and dolasetron by oxidoreductases isolated from human liver cytosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (12), 1601–1606.
- Chevallet, M., Luche, S., Diemer, H., Strub, J.M., Van, D.A., Rabilloud, T., 2008. Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics* 8 (23–24), 4853–4861.
- Gersl, V., Mazurova, Y., Bajgar, J., Melka, M., Hrdina, R., Palicka, V., 1996. Lack of cardiotoxicity of a new antineoplastic agent, a synthetic derivative of indenoisochinoline: comparison with daunorubicin in rabbits. *Arch. Toxicol.* 70 (10), 645–651.
- Hoffmann, F., Maser, E., 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* 39 (1), 87–144.
- Jez, J.M., Flynn, T.G., Penning, T.M., 1997. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 54 (6), 639–647.
- Jez, J.M., Penning, T.M., 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (1–3), 499–525.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H., Persson, B., 2002. Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Sci.* 11 (3), 636–641.
- Kasus-Jacobi, A., Ou, J., Bashmakov, Y.K., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2003. Characterization of mouse short-chain aldehyde reductase (SCALD), an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 278 (34), 32380–32389.
- Liden, M., Eriksson, U., 2006. Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 281 (19), 13001–13004.
- Lukacik, P., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., 2006. Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell Endocrinol.* 248 (1–2), 61–71.
- Marijanovic, Z., Laubner, D., Moller, G., Gege, C., Husen, B., Adamski, J., Breitling, R., 2003. Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* 17 (9), 1715–1725.
- Martin, H.J., Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S., Block, S., Maser, E., 2006. Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos.* 34 (3), 464–470.
- Maser, E., 1995. Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* 49 (4), 421–440.
- Maser, E., Bannenberg, G., 1994. The purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver microsomes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48 (2–3), 257–263.
- Maser, E., Volker, B., Friebertshauer, J., 2002. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* 41 (7), 2459–2465.
- Matsunaga, T., Shintani, S., Hara, A., 2006. Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21 (1), 1–18.
- Melka, M., 1993. Oracin—preclinical summary report of the research institute for pharmacy and biochemistry. Prague. Czech Republic. Ref Type: Generic.
- Miko, M., Poturnajova, M., Soucek, R., 2002. Cytotoxicity and mode of action of the potential cytostatic drug oracin. *Neoplasma* 49 (3), 167–171.
- Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., Maser, E., 2008. Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol. Lett.* 181 (1), 1–6.
- Oppermann, U.C., Filling, C., Jornvall, H., 2001. Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (1–3), 699–705.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J.E., Bruford, E., Dellaporta, S.L., Favia, A.D., Duarte, R.G., Jornvall, H., Kavanagh, K.L., 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 (1–3), 94–98.
- Rosemond, M.J., Walsh, J.S., 2004. Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metab. Rev.* 36 (2), 335–361.
- Scopes, R.K., 1994. Protein purification. Principle and practice. Springer-Verlag, New York.
- Seddon, A.M., Curnow, P., Booth, P.J., 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* 1666 (1–2), 105–117.
- Szotakova, B., Wsol, V., Trejtnar, F., Skalova, L., Kvasnickova, E., 1996. Studies on the metabolism of the potential cytostatic drug oracin. Species differences. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48 (Suppl. II (1)), 377–380.
- Wallin, E., Von-Heijne, G., 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7 (4), 1029–1038.
- Wsol, V., Kvasnickova, E., Szotakova, B., Hais, I.M., 1996. High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of metabolites of the potential cytostatic drug oracin. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 681 (1), 169–175.
- Wsol, V., Skalova, L., Szotakova, B., Trejtnar, F., Kvasnickova, E., 1999. Sex differences in stereospecificity of oracin reductases in rat in vitro and in vivo. *Chirality* 11 (5–6), 505–509.
- Wsol, V., Szotakova, B., Kvasnickova, E., Fell, A.F., 1998. High-performance liquid chromatography study of stereospecific microsomal enzymes catalysing the reduction of a potential cytostatic drug, oracin. Interspecies comparison. *J. Chromatogr. A* 797 (1–2), 197–201.
- Wsol, V., Szotakova, B., Martin, H.J., Maser, E., 2007. Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology* 238 (2–3), 111–118.

- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., Cepkova, H., Kvasnickova, E., 2000. The main metabolic pathway of oracin, a new potential cytostatic drug, in human liver microsomes and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin. *Enantiomer* 5 (3–4), 263–270.
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., Maser, E., 2004. The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Toxicology* 197 (3), 253–261.
- Wu, X., Lukacik, P., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., 2007. SDR-type human hydroxysteroid dehydrogenases involved in steroid hormone activation. *Mol. Cell Endocrinol.* 265–266, 71–76.

Příloha 6: Profesní životopis

Profesní životopis

Jméno: Mgr. Lucie Škarydová
Narozena: 20. 06. 1982, Pardubice
Národnost: Česká
Státní příslušnost: ČR
Bydliště: Čečkovice 19, 58301 Chotěboř

Vzdělání a profesní aktivity:

2001-2004 bakalářské studium, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, obor Speciální chemicko-biologické obory
2004-2006 magisterské studium, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, obor Analýza biologických materiálů,
2006 zpracování diplomové práce „HPLC/ED stanovení koenzymu Q10 u pacientů s rozdílnými koronarografickými nálezy“ na katedře Biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice
od 2006 postgraduální studium Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, studijní program Biochemie – Patobiochemie a xenobiochemie

Ocenění:

Studentská cena rektora Univerzity Pardubice I. stupně

Pedagogická činnost:

2007-2009 Laboratorní cvičení z Obecné biochemie

Studijní pobyt:

2008 Tříměsíční stáž na Institutu toxikologie a farmakologie na univerzitě v Kielu, Německo

Řešené grantové projekty:

2008-2010 **GAUK 45508/C/2008** Škarydová L. Izolace a charakterizace nové lidské jaterní mikrosomální karbonyl reduktasy účastníci se metabolismu xenobiotik. Hlavní řešitel.
2007-2009 **GAČR 303/07/0994** Wsól V. Výzkum nových lidských mikrosomálních karbonylových reduktas způsobujících rezistenci v nádorové terapii. Spoluřešitel.
2006-2008 **GAUK 108/2006/C** - Wsól, V. Modulace aktivity aldo-ketoreduktasy AKR1C3 pomocí fytoestrogenů. Spoluřešitel.

Publikace vztahují se k tématu disertační práce:

Skarydova, L., Zivna, L., Xiong, G., Maser, E., Wsol, V. 2008. AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chem. Biol. Interact.*, 178, 138-144.

Skarydova, L., Skarka, A., Novotna, R., Zivna, L., Martin, H.J., Wsol, V., Maser, E. 2009. Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology*, 264, (1-2) 52-60.

Skarydova, L., Skarka, A., Wsol, V. Enzyme stereospecificity as a tool for searching of new enzymes. *Chirality*, připraveno k publikaci.

Skarydova, L., Wsol, V. Human microsomal carbonyl reductases in metabolism of xenobiotics – well-known and promising members of SDR superfamily. *Curr Drug Metab.*, připraveno k publikaci.

Další publikace:

Zakova, P., Kandar, R., Skarydova, L., Skalický, J., Myjavec, A., Vojtisek, P. 2007. Ubichinol-10/lipids ratios in consecutive patients with different angiographic findings, *Clin Chim Acta*. 180 (1-2),133-8.

Prezentace vztahující se k tématu disertační:

Škarydová, L., Novotná, R., Hubálek, M., Wsól, V. 2007. Carboxylesterase 1 – human liver microsomal carbonyl reductase, XXIV. Xenobiochemické symposium, Liptovský Ján, Slovensko.

Novotná, R., Škarydová, L., Wsól, V. 2007. Reduction of anticancer drug oracin by recombinant AKR1C3, XXIV. Xenobiochemické symposium, Liptovský Ján, Slovensko.

Wsól, V., Novotná, R., Škarydová, L. 2007. Role of AKR1C3 in metabolism of anti-cancer drug oracin, XXIV. Xenobiochemické symposium, Liptovský Ján, Slovensko.

Novotna, R., Skarydova, L., Wsól, V. 2007. Reduction of anticancer drugs doxorubici and oracin by recombinant AKR1C3, 12th international meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, Island of Elba, Italy.

Wsól, V., Novotna, R., Skarydova, L. 2007. Inhibition of AKR1C3 human reductase activity by selected flavonoids and NSAID, 12th international meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, Island of Elba, Italy.

Skarydova, L., Zivna, L., Hubalek, M., Wsól, V. 2008. Purification and identification of human membrane-bound carbonyl reductases, Trends in enzymology, Saint Malo, France.

Wsól, V., Skarydova, L., Zivna, L., Hubalek, M. 2008. New membrane-bound carbonyl reductases in metabolism of xenobiotics, 14th International meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Krajnska Gora, Slovenia.

Wsól, V., Zivna, L., Skarydova, L. 2008. AKR1C3 as a Potential Target for the Inhibitory Effect of Dietary Flavonoids, 14th International meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Krajnska Gora, Slovenia.

Škarydová, L., Živná, L., Hubálek, M., Wsól, V. 2008. Ion-exchange chromatography as a tool for purification of membrane-bound carbonyl reductases, XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice.

Živná, L., Škarydová, L., Wsól, V. 2008. Diet flavonoids inhibits specific aldo-keto reductase AKR1C3, XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice.

Skarydova, L., Skarka, A., Wsól, V. 2009. Purification procedure designed for isolation of „unknown“ membrane-bound carbonyl reductase from human liver and its characterization, VIII. European symposium of the Protein society, Zürich, Switzerland.

Wsól, V., Skarydova, L., Skarka, A., Solich, P. 2009. Enzyme stereospecificity as a tool for searching of new enzymes, Chirality, Breckenridge, USA.

Wsól, V., Škarydová, L., Skarka, A., Solich, P. 2009. Chiral properties of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in deactivation of anticancer drugs, Chirality, Breckenridge, USA.

Škarydová, L., Skarka, A., Wsól, V. 2009. New microsomal carbonyl reductase in metabolism of oracin, XXV. Xenobiochemické symposium, Mikulov.

Skarka, A., Škarydová, L., Wsól, V. 2009. Hydrophobic interaction chromatography – significant step in purification of enzymes, XXV. Xenobiochemické symposium.