

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

Účast membránově vázaných enzymů v metabolismu xenobiotik u člověka

Disertační práce

Hradec Králové, 2012

Školitel

Mgr. Adam Skarka

Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

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

V Hradci Králové, 20. 7. 2012

Mgr. Adam Skarka

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky, grant č. 303/07/0994, Grantové agentury Univerzity Karlovy, grant č. 45508/C/2008 a č. 71710/C/2010 a grantu SVV 265 004.

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Prof. Vladimíru Wsólvi za podporu a přístup k mé práci. Dále Lucce Škarydové za spolupráci při výzkumu a pomoc při řešení různých problémů, paní Aleně Pakostové za ochotu, dětskému pokoji za nikdy nekončící diskuze o podstatných tématech a také ostatním pracovníkům katedry za výbornou atmosféru.

Samozřejmě nemohu vynechat poděkování své rodině a hlavně Verče za každodenní inspiraci.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra biochemických věd

Kandidát Mgr. Adam Skarka

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

Název disertační práce Účast membránově vázaných enzymů v metabolismu xenobiotik u člověka

Cizorodé látky zvané xenobiotika se běžně vyskytují v širokém okolí člověka. Některé z nich jsou aktivně či pasivně přijímány do organismu a podstupují metabolickou přeměnu vedoucí k jejich vyloučení. Důležitou roli v tomto případě hrají různé enzymové systémy. Nejznámějším systémem je nadrodina cytochromů P450 katalyzující oxidační reakce, avšak v poslední době nabývají na významu i systémy redukční, mezi které patří například nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) a aldo-ketoreduktas (AKR). Karbonylová skupina, která je cílem redukce katalyzované nadrodinami SDR, MDR a AKR, se nachází také u různých skupin léčiv, např. antineoplastik a nesteroidních antiflogistik. Přeměna této skupiny může vést ke ztrátě účinku a/nebo ke zvýšení toxicity daného léčiva pro organismus.

Některá xenobiotika mají ve své struktuře tzv. prochirální funkční skupinu. Mezi takové patří například již zmíněná karbonylová skupina, jejíž přeměnou může dojít ke vzniku chirálních produktů. Poměr vzniklých enantiomerů není náhodný a je unikátní pro každý pár enzym-substrát. Nazývá se enzymová stereospecifita, má obdobný význam jako enzymové kinetické konstanty a jako takový může být významným pomocníkem ve výzkumu nových enzymů. Tato vlastnost byla prokázána u mnoha zkoumaných látek a enzymů, mezi něž patří například dvojice alkyl p-tolyl sulfidy a FMO, risperidon a CYP450, NNK a CBR1 či AKR1C1, benzimidazolová anthelmintika a FMO a fenytoin a CYP450. Porovnáním hodnot stereospecifit pro celé frakce a jednotlivé enzymy pak lze případně určit, zdali je ve frakci přítomen ještě další enzym účastnící se přeměny vybrané látky.

Nesoulad poměrů stereospecifit pro tvorbu dihydrooracinu (DHO) mezi lidskými jaterními mikrosomy (40 % tvorby (+)-DHO) a jedinou jaterní mikrosomální karbonylreduktasou s popsanou účastí na redukci xenobiotik HSD11B1 (24 % tvorby (+)-DHO) naznačoval přítomnost dalšího karbonyl redukujícího enzymu v jaterních mikrosomech. Byla provedena purifikace nové karbonylreduktasy z lidské jaterní tkáně. Optimalizací celého purifikačního procesu, který zahrnoval solubilizaci mikrosomů a dva purifikační kroky, bylo získáno

dostatečné množství neznámé karbonylreduktasy k její částečné charakterizaci. Kinetické konstanty pro redukci oracinu na DHO byly srovnatelné s hodnotami cytosolických enzymů. Zvýšení čistoty enzymu purifikačním procesem bylo prokázáno vzestupem hodnoty specifické aktivity (aktivita enzymu vztažená na množství bílkoviny). Následná detekce pomocí hmotnostní spektrometrie nebyla možná z důvodu velmi nízké koncentrace proteinu.

Oracin je potenciální protinádorové léčivo, jehož vývoj byl pozastaven ve druhé fázi klinických testů z ekonomických důvodů. Velmi často používanou skupinou antineoplastik jsou antracykliny (ANT), mezi něž patří doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAUN) a idarubicin (IDA), které jsou stejně jako oracin metabolizovány redukcí karbonylové skupiny za vzniku kardiotoxických produktů. I když jde o léčiva dlouhodobě klinicky používaná, detailní informace o jejich metabolické přeměně chybí. Na základě kinetických konstant pro redukci oracinu na DHO byla zkoumána účast neznámé karbonylreduktasy na redukci ANT. Byla prokázána pouze katalýza redukce DAUN ($K_m=954\pm 129\mu\text{M}$, $V_{max}=720\pm 27$ nmol/min na mg, $CL_{int}=0,76$ ml/min na mg), která v porovnání s cytosolickými enzymy CBR1, CBR3 a AKR1A1 není příliš významná a katalýza redukce IDA ($K_m=301\mu\text{M}$, $V_{max}=158\pm 7$ nmol/min na mg, $CL_{int}=0,52$ ml/min na mg). Rovněž bylo nutno ověřit, v jaké míře jsou vybrané antracykliny redukovány v jaterních mikrosomech. Bylo zjištěno, že při koncentracích ANT převyšujících $100\mu\text{M}$ převažuje hydrolýza za vzniku příslušných aglykonů. Kinetické konstanty pro redukci DOX ($K_m=248\mu\text{M}$, $V_{max}=0,248\pm 0,025$ nmol/min na mg, $CL_{int}=0,001$ ml/min na mg) byly řádově shodné s konstantami známými pro jaterní cytosol, pro redukci DAUN a IDA je nebylo možné vypočítat.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department Department of Biochemical Sciences

Candidate Mgr. Adam Skarka

Supervisor Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis The role of membrane bound enzymes in metabolism of xenobiotics in human

Heterogeneous substances named xenobiotics are commonly present in wide surroundings of man. Some of them are actively or passively acquired into organism and undergo metabolic transformation, which lead to their excretion. In this case, important role is played by different enzymatic systems. The most known system is superfamily of cytochrome P450s catalyzing oxidation reactions. However, the importance of reducing systems like superfamilies of short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), middle-chain dehydrogenases/reductases (MDR) and aldo-keto reductases (AKR) have grown recently. Carbonyl group, the target of reduction catalyzed by SDR, MDR and AKR superfamilies, is also present in various groups of drugs, e.g. antineoplastics and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Conversion of this group can lead to the loss of therapeutic effect and/or to the increase of toxicity for organism.

Some xenobiotics contain so called prochiral functional group in their structure, e.g. carbonyl group. Conversion of this group can lead to the formation of chiral products. Ratio of formed products is not random and is unique for each enzyme-substrate pair. This ratio is called enzyme stereospecificity. It possesses similar importance as enzymatic kinetics constants and can be significant helper in research of the new enzymes. This property has been demonstrated on many examined substances and enzymes, for example pairs alkyl p-tolyl sulfides and FMO, risperidon and CYP450, NNK and CBR1 or AKR1C1, benzimidazole anthelmintics and FMO and phenytoin and CYP450. Comparison of stereospecificity values for whole fractions and separate enzymes can determine whether some other enzyme(s) is/are participating in transformation of chosen substance present in fraction.

Discrepancy between stereospecificity ratios for dihydrooracin (DHO) formation in human liver microsomes (40 % formation of (+)-DHO) and the only liver microsomal carbonyl reductase with described reduction of xenobiotics HSD11B1 (24 % formation of (+)-DHO), suggested presence of another carbonyl reducing enzyme in human liver microsomes. Purification of new carbonyl reductase from human liver tissue was performed. Optimization of whole purification process, which includes solubilization of microsomes and two purification steps, led to acquisition of sufficient amount of unknown carbonyl reductase for its partial characterization.

Kinetic constants for reduction of oracin to DHO were comparable with values for cytosolic enzymes. Increase of enzyme purity was proved by increase of specific activity value (activity of enzyme relative to amount of protein). Subsequent detection of enzyme via mass spectrometry was not possible due to very low concentration of protein.

Oracin is potent antitumor drug, whose development was stopped due to economic reasons in the second stage of clinical trials. Very frequently used group of antineoplastics are anthracyclines, like doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAUN) and idarubicin (IDA), which are like oracin metabolized by reduction of carbonyl group. Although ANTs are used in long term, detail information about their conversion is missing. On the basis of kinetic constants for reduction of oracin to DHO, involvement of unknown carbonyl reductase on reduction of ANT has been investigated. Only catalysis of DAUN reduction ($K_m=954\pm 129\mu\text{M}$, $V_{max}=720\pm 27$ nmol/min per mg, $CL_{int}=0.76$ ml/min per mg), which is not very important compared to cytosolic enzymes CBR1, CBR3 and AKRA1A, and catalysis of IDA reduction ($K_m=301\mu\text{M}$, $V_{max}=158\pm 7$ nmol/min per mg, $CL_{int}=0.52$ ml/min per mg) have been proved. It also had to be checked, what is overall rate of reduction of chosen ANTs in liver microsomes. There has been found that in concentrations higher than $100\mu\text{M}$, hydrolysis takes place in and particular aglycones are formed. Kinetic constants for reduction of DOX ($K_m=248\mu\text{M}$, $V_{max}=0.248\pm 0.025$ nmol/min per mg, $CL_{int}=0.001$ ml/min per mg) were in the same order as constants known for liver cytosol. These constants couldn't be counted for reduction of DAUN and IDA.

Obsah

1. Úvod	11
1.1. Metabolismus xenobiotik	11
1.1.1. První fáze biotransformace	12
1.1.1.1. Cytochromy P450 (CYP)	12
1.1.1.2. Flavinové monooxygenasy (FMO)	17
1.1.1.3. Redukční reakce	17
1.1.2. Druhá fáze biotransformace (konjugace).....	18
1.2. Redukce karbonylové skupiny	19
1.2.1. Aldo-keto reduktasy (AKR)	20
1.2.1.1. Názvosloví a rozdělení AKR.....	21
1.2.1.2. Účast lidských AKR na přeměně látek	22
1.2.2. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR).....	25
1.2.2.1. Názvosloví a rozdělení MDR	26
1.2.2.2. MDR v lidském organismu.....	26
1.2.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	28
1.2.3.1. Názvosloví a rozdělení SDR.....	29
1.2.3.2. Lidské SDR a jejich vliv na přeměnu látek.....	30
1.2.3.3. Nejvýznamnější cytosolické SDR	30
1.2.3.4. Mikrosomální SDR	31
1.2.3.5. Mitochondriální SDR.....	36
1.2.3.6. Peroxisomální SDR.....	38
1.3. Purifikační techniky.....	40
1.3.1. Třífázová strategie.....	40
1.3.2. Metody purifikace	41
1.3.2.1. Iontově výměnná chromatografie (IEX)	41
1.3.2.2. Hydrofobně-interakční chromatografie (HIC)	42
1.3.2.3. Gelová filtrace (GF).....	42

1.3.2.4.	Afinitní chromatografie (AC)	43
1.3.2.5.	Chromatofokusace	43
2.	Cíle.....	44
3.	Metodická část.....	45
3.1.	Chemikálie.....	45
3.2.	Příprava idarubicinolu.....	45
3.3.	Příprava mikrosomálních frakcí	46
3.4.	Purifikace neznámého enzymu	46
3.4.1.	Solubilizace mikrosomů.....	46
3.4.2.	Odsolení mikrosomů	46
3.4.3.	Separace na Q sepharose.....	47
3.4.4.	Separace pomocí hydrofobně-interakční chromatografie.....	47
3.4.5.	Optimalizace purifikačního procesu.....	47
3.5.	Inkubace frakcí s vybranými substráty.....	48
3.5.1.	Inkubace s oracinem	48
3.5.2.	Inkubace s antracykliny	49
3.6.	Analýza metabolitů	50
3.6.1.	Metabolity oracinu	50
3.6.2.	Metabolity antracyklinů	50
3.7.	Měření koncentrace bílkoviny	50
3.8.	SDS elektroforéza.....	50
4.	Výsledky a diskuze.....	52
4.1.	Stereospecifita jako unikátní charakteristika určující enzym	52
4.1.1.	Xenobiotika s „jednoznačným“ metabolismem	52
4.1.2.	Xenobiotika, stereospecifita a vliv polymorfismu	55
4.1.3.	Xenobiotika s neúplně známým či neznámým metabolismem.....	56
4.1.4.	Shrnutí významu stereospecifity jako vlastnosti enzymů	57
4.2.	Purifikace nové lidské jaterní membránově vázané karbonylreduktasy	59

4.2.1.	Optimalizace solubilizace mikrosomální frakce	60
4.2.2.	Optimalizace prvního purifikačního kroku	61
4.2.3.	Optimalizace druhého purifikačního kroku.....	68
4.2.4.	Shrnutí purifikace neznámé karbonylreduktasy	71
4.3.	Ověření účasti mikrosomálních enzymů na metabolismu vybraných antineoplastik ..	73
4.3.1.	Doxorubicin	74
4.3.1.1.	Neznámá karbonylreduktasa (NCR)	74
4.3.1.2.	Jaterní mikrosomy	74
4.3.1.3.	Souhrn	76
4.3.2.	Daunorubicin.....	76
4.3.2.1.	Neznámá karbonylreduktasa (NCR)	76
4.3.2.2.	Mikrosomy.....	78
4.3.2.3.	Souhrn	80
4.3.3.	Idarubicin.....	80
4.3.3.1.	Neznámá karbonylreduktasa (NCR)	81
4.3.3.2.	Jaterní mikrosomy	81
4.3.3.3.	Souhrn	82
4.3.4.	Vliv purifikované karbonylreduktasy a mikrosomálních enzymů na metabolismus antracyklinů.....	83
5.	Závěr.....	84
6.	Seznam zkratk	86
7.	Literatura.....	88
8.	Přílohy	109

1. Úvod

Každý živý organismus, nejen ten lidský, si během své existence vyvinul systém, pomocí kterého je schopen zpracovat látky potřebné pro svou existenci, například sacharidy, lipidy nebo bílkoviny. Potřeba těchto látek je stále stejná a neustále se opakuje. Proto se mohl vyvinout úzce specializovaný a propracovaný systém, který tyto látky zpracovává a případně je uchová pro budoucí využití.

Avšak organismus se setkává i s látkami cizorodými – xenobiotiky, které ke svému přežití nepotřebuje a mohou pro něj být i toxické. Tyto látky mohou mít různé struktury, mohou mít rozdílné fyzikální vlastnosti a obsahovat rozdílné funkční skupiny. Proto se u organismů vyvinul i méně specializovaný systém, který se tyto cizorodé látky snaží tím nejjednodušším a nejrychlejším způsobem eliminovat.

V případě lidského organismu se hlavní část detoxikačního systému nachází v jaterních buňkách. Může se jednat o enzymy nacházející se v cytosolu nebo které jsou součástí membrán. Důkladným prozkoumáním těchto enzymů lze předpovědět chování xenobiotika v organismu, včetně jeho pozitivních či nežádoucích účinků.

1.1. Metabolismus xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé látky, které za fyziologického stavu nejsou v organismu přítomny ani v něm produkovány. Patří mezi ně sloučeniny běžně se vyskytující v okolí člověka, jako jsou léčiva, jedy, potravinové příměsi a mnoho dalších. Průnik xenobiotika organismem je determinován jeho fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Látky lipofilní povahy mají usnadněný přestup membránami, látky hydrofilní musí být aktivně transportovány.

Xenobiotikum, které již vstoupilo do organismu, je podrobeno sérii reakcí, které mají za následek jeho vyloučení z organismu. Důležitou roli v této činnosti hrají enzymy, které cizorodé látky přeměňují. Může se jednat o transportní proteiny aktivně odstraňující xenobiotika z buněk nebo o biotransformační enzymy, které změnou chemické struktury xenobiotika napomáhají k urychlení jeho vylučování z organismu.

Biotransformační proces se dělí na dvě fáze. První z nich má za následek tvorbu nebo odkrytí polárních funkčních skupin, zatímco ve druhé dochází ke spojování (konjugaci) xenobiotika s endogenními látkami za vzniku polárnější molekuly.

1.1.1. První fáze biotransformace

Mezi reakce první fáze biotransformace patří například reakce oxidační (hydroxylace, oxidace aldehydů a alkoholů, oxidační deaminace, dehalogenace, dealkylace, N-, S-oxidace), redukční (redukce karbonylové skupiny, redukce nitro- a azosloučenin, redukce N- a S-oxidů) a hydrolytické.

Enzymy, které se účastní první fáze biotransformace lze zařadit do několika nadrodin. Nejdůležitějšími oxidasami je bezesporu nadrodina cytochromů P450 (CYP450). Mezi další významné oxidasy patří nadrodina flavinových monooxygenas (FMO), alkoholdehydrogenas (ADH), peroxidas či monoaminoxidas (MAO). Velká část redukujících enzymů patří do nadrodin aldo-ketoreduktas (AKR), dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Hydrolytické enzymy zastupují esterasy, peptidasy či epoxidhydrolasy.

1.1.1.1. Cytochromy P450 (CYP)

Nadrodina cytochromů P450 je známa již dlouhou dobu a dnes je u lidí popsáno 60 členů této nadrodiny. Nacházejí se v membránách endoplazmatického retikula a membránách mitochondriálních (The UniProt Consortium). Jejich hlavní funkcí je katalýza oxidačních reakcí. Pevnou součástí struktury CYP je molekula hemu. Katalýza přeměny xenobiotik byla dosud prokázána u 15 cytochromů P450 z prvních tří rodin CYP1, CYP2 a CYP3 (Tabulka 1). Ostatní rodiny se účastní endogenních metabolických pochodů.

Tabulka 1 – Přehled lidských cytochromů P450 účastnících se metabolismu xenobiotik (Guengerich 2008).

Rodina CYP	Zástupci
CYP1	1A1, 1A2
CYP2	2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1
CYP3	3A4, 3A5, 3A7

Zástupci CYP450 jsou zařazeni do jednotlivých podrodin dle názvoslovného systému založeného na shodě sekvence aminokyselin (AMK). Jednotlivé rodiny mezi sebou mají méně než 40% shodu sekvence AMK. Členové podrodiny musí vykazovat shodu vyšší než 70 %. Poslední číslice pak udává pořadí v podrodině. Například CYP3A5 je pátý sekvenovaný člen podrodiny A rodiny 3 cytochromů P450.

Rodina 1 cytochromů P450 (CYP1)

Do první rodiny CYP patří hlavně CYP1A1 nacházející se v extrahepatální tkáni a CYP1A2 nacházející se v játrech. Mezi substráty patří planární aromatické a lipofilní molekuly. Oba

enzymy jsou schopny přeměňovat nebezpečné sloučeniny, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), polychlorované a polybromované bifenyly (PCB, PBB), čímž vznikají produkty s karcinogenním účinkem (Coleman 2010). Dosud známé substráty a látky ovlivňující aktivitu přibližuje Tabulka 2. Některé uvedené induktory mohou velmi významně ovlivnit léčbu. Například tabák zvyšuje expresi CYP1A, tím dochází k rychlejší přeměně theofylinu a ve výsledku ke snížení jeho účinku.

Tabulka 2 – Substráty CYP1A1 a CYP1A2 a látky ovlivňující jejich aktivitu (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	Amitriptylin, cyklobenzaprin, estradiol, fenacetin → paracetamol → NAPQI, fluvoxamin, haloperidol, imipramin, klomipramin, klozapin, kofein, mexiletin, naproxen, olanzapin, ondansetron, propranolol, riluzol, ropivakain, tacrin, theofylin, tizanidin, verapamil, warfarin, zileuton, zolmitriptan
Inhibitory	Silné – ciprofloxacin, fluvoxamin Slabé – cimetidin Ostatní – amiodaron, fluorochinolony, furafyllin, interferon, methoxsalen
Induktory	Brokolice, insulin, maso grilované na dřevěném uhlí, methylcholantren, modafinil, nafcillin, β -naftoflavon, omeprazol, růžičková kapusta, tabák

Rodina 2 cytochromů P450 (CYP2)

Z této rozsáhlé rodiny byly blíže zkoumány cytochromy CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1. První z nich, CYP2B6 je zřejmě nejvíce polymorfním cytochromem vůbec. Přehled xenobiotik, která svou strukturou patří mezi neplanární neutrální až slabě bazické látky, uvádí Tabulka 3 (Coleman 2010).

Tabulka 3 – Xenobiotika ovlivňované a ovlivňující CYP2B6 (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	Bupropion, cyklofosfamid, efavirenz, ifosfamid, metadon, sorafenib
Inhibitory	Klopidogrel, thiotepa, tiklopidin,
Induktory	Fenobarbital, fenytoin, rifampin

Další zástupce CYP2C8 oxiduje zejména větší, slabě kyselé molekuly (Tabulka 4).

Tabulka 4 – Xenobiotika ovlivňované a ovlivňující CYP2C8 (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	Amodiachin, cerivastatin, paklitaxel, repaglinid, sorafenib, torsemid
Inhibitory	Gemfibrozil, trimethoprim, glitazony, montelukast, kvercetin
Induktory	Rifampin

CYP2C9 je „specialistou“ na malé, kyselé a lipofilní molekuly s velmi úzkým terapeutickým indexem (Tabulka 5), proto je jakýkoliv výskyt polymorfismu velmi závažný (Coleman 2010).

Tabulka 5 – CYP2C9 a jeho klinicky významné substráty, inhibitory a induktory (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	Nesteroidní antiflogistika – diklofenak, ibuprofen, piroxikam Perorální antidiabetika – glipizid, tolbutamid Blokátory angiotensinu II – irbesartan, losartan Ostatní – celecoxib, fenytoin, fluvastatin, naproxen, rosiglitazon, sulfamethoxazol, tamoxifen, tolbutamid, torsemid, warfarin
Inhibitory	Flukonazol, amiodaron, isoniazid
Induktory	Rifampin, sekobarbital

Vazebné místo CYP2C19 je přizpůsobeno pro vazbu slabých bází, například amidů (Tabulka 6).

Tabulka 6 – CYP2C19 a jeho klinicky významné substráty, inhibitory a induktory (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	Inhibitory H ⁺ pumpy – lansoprazol, omeprazol, pantoprazol, rabeprazol Antiepileptika – diazepam, fenytoin, fenobarbital Ostatní – amitriptylin, cyklofosfamid, klomipramin, klopidogrel, progesteron
Inhibitory	Fluoxetin, fluvoxamin, ketokonazol, lansoprazol, omeprazol, tiklopidin
Induktory	-

Nejvýznamnějším zástupcem této rodiny a druhým nejvýznamnějším cytochromem P450 celkově je CYP2D6. Ačkoliv se nevyskytuje v tak velkém množství jako CYP3A4 nebo CYP1A1, díky schopnosti N-dealkylace látek je jeho záběr vůči xenobiotikům poměrně široký (Tabulka 7). CYP2D6 nabývá významu i v tom smyslu, že u něj dochází k velmi rozsáhlému polymorfismu vedoucímu nejen k několikanásobnému zvýšení aktivity, ale i k naprosté ztrátě funkce. Zajímavostí je, že CYP2D6 není indukovatelný (Coleman 2010; Gibson and Skett 2001).

Tabulka 7 – CYP2D6 a klinicky významné substráty, inhibitory a induktory (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	<p>β-blokátory – karvedilol, methoprolol, propafenon, timolol</p> <p>Antidepresiva – amitriptylin, desipramin, fluoxetin, imipramin, klomipramin, paroxetin</p> <p>Antipsychotika – haloperidol, perfenazin, tioridazin, zuklopentixol</p> <p>Ostatní – alprenolol, amfetamin, aripiprazol, atomoxetin, bufuralol, debrisochinon, dexfenfluramin, dextromethorfan, donepezil, duloxetin, enkainid, fenacetin, fenformin, flekainid, fluvoxamin, chlorfeniramin, chlorpromazin, klonidin, kodein, lidokain, methoklopramid, methoxyamfetamin, mexiletin, minaprin, nebivolol, nortryptilin, ondansetron, oxykodon, perhexilin, prometazin, propranolol, spartein, tamoxifen, tramadol, venlafaxin</p>
Inhibitory	<p>Silné – bupropion, fluoxetin, chinidin, paroxetin</p> <p>Střední – duloxetin</p> <p>Slabé – amiodaron, cimetidin</p> <p>Ostatní – doxepin, haloperidol, chlorfeniramin, klomipramin, metadon, mibefradil, ritonavir</p>
Induktory	-

Posledním zástupcem rodiny CYP2 je CYP2E1. Nachází se také v mnoha mimojaterních tkáních. Neobvyklá je jeho schopnost vázat malé hydrofilní molekuly jako je ethanol nebo aceton, které mimo jiné patří mezi velmi silné induktory tohoto cytochromu. Mnoho dalších substrátů (Tabulka 8) patří mezi látky, jejichž produkty mohou být toxické či rakovinotvorné (Coleman 2010).

Tabulka 8 – Xenobiotika ovlivňované a ovlivňující CYP2E1 (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	<p>Anestetika – enfluran, halotan, isofluran, methoxyfluran, sevofluran</p> <p>Ostatní – anilin, benzen, N,N-dimethylformamid, etanol, chlorzoxazon, paracetamol, theofylin</p>
Inhibitory	Disulfiram
Induktory	Ethanol, isoniazid

Rodina 3 cytochromů P450 (CYP3)

Jedná se o rodinu CYP vyskytující se v lidských játrech, kde tvoří přibližně 30 % všech cytochromů P450. Tvoří ji tři zástupci – CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7. Na rozdíl od prvních dvou cytochromů se CYP3A7 nachází pouze u plodu, přičemž jeho funkce je shodná s funkcí CYP3A4 a jeho exprese je ihned po porodu zcela potlačena. CYP3A5 je v játrech exprimován přibližně u 50 % lidské populace. Látky, které jsou tímto cytochromem přeměňovány, jsou shodné jako u CYP3A4, avšak rychlost přeměny je pomalejší.

CYP3A4 je nejvýznamnější cytochrom P450, který katalyzuje přeměnu xenobiotik. Nicméně jeho aktivita není shodná u všech lidí. Je známo, že exprese tohoto enzymu silně závisí na předchozím výskytu xenobiotik v organismu. Může se jednat nejen o léčiva, ale i o součásti běžné stravy. Tyto látky mohou působit jako inhibitory či induktory exprese CYP3A4, čímž se aktivita u vybraných jedinců může lišit deseti až stonásobně. Míra aktivity je také závislá na genetické výbavě jedince. Bylo popsáno několik variant CYP3A4, jejichž kinetické parametry se významně liší od běžné „*wild-type*“ formy. Počet klinicky významných substrátů, inhibitorů a induktorů je široký a shrnuje je Tabulka 9 (Gibson and Skett 2001).

Tabulka 9 – Klinicky významné substráty, inhibitory a induktory CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7 (Flockhart 2007).

Skupina látek	Zástupci
Substráty	Makrolidová antibiotika – klaritromycin, erytromycin, telitromycin Benzodiazepiny – alprazolam, diazepam, midazolam, triazolam Imunomodulátory – cyklosporin, takrolim HIV antivirotika – indinavir, ritonavir, saquinavir Antihistaminika – astemizol, chlorfeniramin Blokátory Ca-kanálů – amlodipin, diltiazem, felodipin, nifedipin, nisoldipin, nitrendipin, verapamil Inhibitory HMG-CoA reductasy – atorvastatin, lovastatin, simvastatin Ostatní – buspiron, gleevec, haloperidol, metadon, chinin, sildenafil, tamoxifen, trazodon, vinkristin
Inhibitory	Silné – indinavir, nelfinavir, ritonavir, klaritromycin, itrakonazol, ketokonazol, nefazodon Střední – erytromycin, grapefruitová šťáva, verapamil, diltiazem Slabé – cimetidin Ostatní – amiodaron, chloramfenikol, boceprevir, ciprofloxacin, delaviridin, diethyl-dithiokarbamát, fluvoxamin, gestoden, imatinib, mibefradil, mifepriston, norfloxacin, norfluoxetin, karambola, telaprevir, voriconazole
Induktory	Karbamazepin, fenobarbital, fenytoin, pioglitazon, rifabutin, rifampin, troglitazon, třezalka tečkovaná

1.1.1.2. Flavinové monooxygenasy (FMO)

Flavinové monooxygenasy jsou druhou nejdůležitější nadrodinou oxidas, které se účastní metabolismu xenobiotik. Jedná se o membránové proteiny endoplazmatického retikula. V lidském organismu se jich nachází pět, z nichž je nejvýznamnější FMO3 a pak také FMO1 přítomná u plodu a novorozenců. Mezi xenobiotika metabolizována FMO patří S- a N-oxidy, např. fenothiaziny, efedrin, N-methylamfetamin a norkokain a pesticidy obsahující thioether a karbamát. Indukce FMO není ovlivňována xenobiotiky a rovněž nejsou známy xenobiotické inhibitory (Gibson and Skett 2001; Mitchell 2008).

1.1.1.3. Redukční reakce

Hlavní skupina redukčních enzymů zabývající se redukcí karbonylové skupiny patří do nadrodin SDR, MDR a AKR (blíže jsou popsány v kapitole 1.2). Neméně důležitou skupinou reductas je i nadrodina CYP450 známá spíše svou oxidační funkcí. Avšak její zástupci katalyzují také reakce

redukční, kterým podléhají látky obsahující halogen či dusíkový atom, např. N-oxidy, iminy, hydroxylaminy, nitro-, nitroso- a azosloučeniny. Mezi významné reductasy patří také skupina enzymů zvaná NAD(P)H-chinonoxidoreduktasy. V organismu hrají důležitou roli v redukci chinonů, která na rozdíl od ostatních chinonreduktas probíhá v jediném kroku, čímž se eliminuje vznik toxického meziprojektu - semichinonového radikálu. Dalšími reduktasami jsou například xanthinoxidasa či aldehydoxidasa účinné při přeměnách funkčních skupin obsahujících dusík (Utrecht and Trager 2007).

1.1.2. Druhá fáze biotransformace (konjugace)

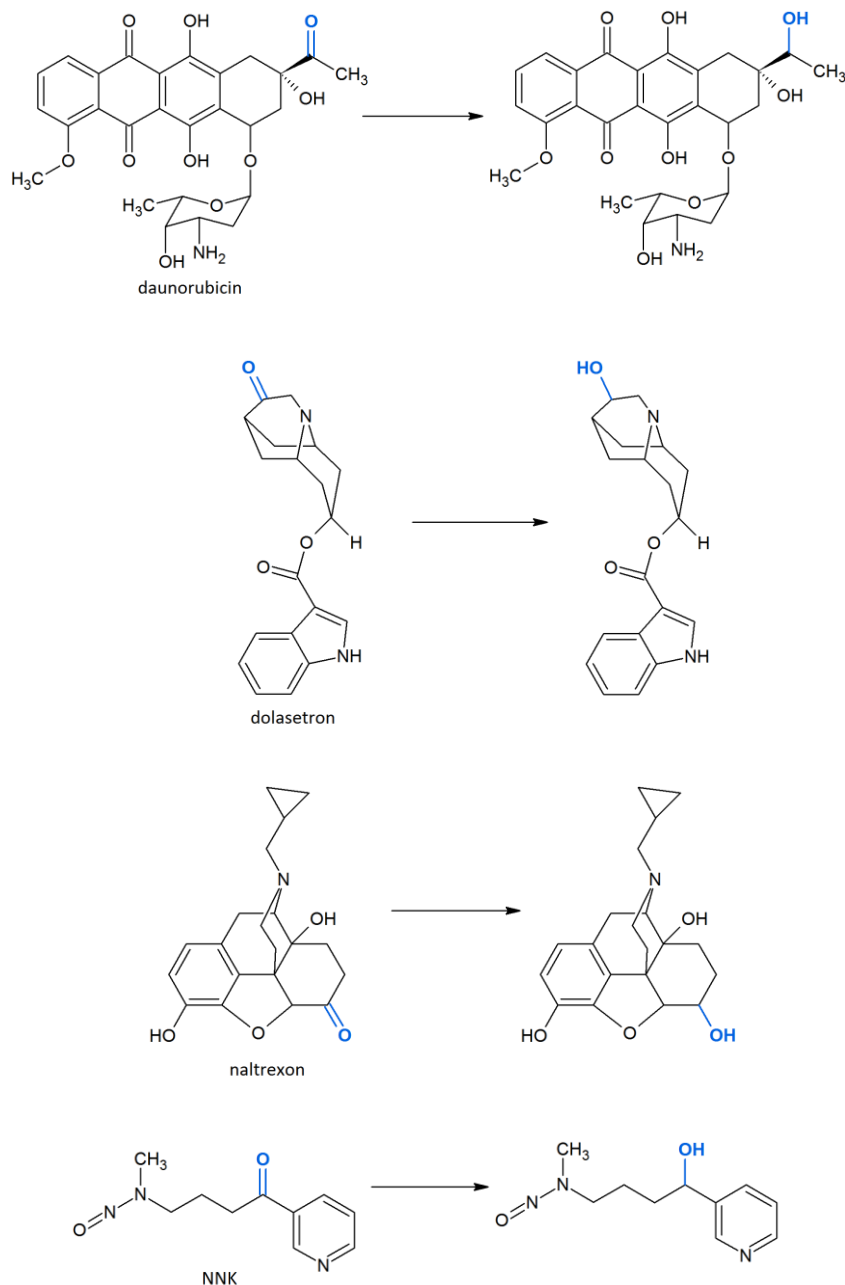
V druhé fázi biotransformace ve valné většině dochází k vazbě molekul zvyšujících rozpustnost ve vodě na funkční skupiny vzniklé či odkryté v první fázi biotransformace. Mezi reakce druhé fáze patří například glukuronidace, sulfonace, konjugace s glutathionem, acetylace, methylace a konjugace s aminokyselinami.

Glukuronidace je zřejmě nejrozšířenější konjugační reakce. Dochází při ní k vazbě kyseliny glukuronové na vhodnou molekulu (např. alkoholy, fenoly, hydroxylaminy, karboxylové kyseliny, aminy, sulfonamidy a thioly) pomocí enzymu UDP-glukuronosyltransferasy za vzniku příslušných O- či N-glukuronidů. Produkty glukuronidace jsou často vylučovány žlučí. Sulfonace je reakce podobná glukuronidaci, avšak její podstatou je zavedení sulfonové funkční skupiny na molekulu za přítomnosti sulfotransferas. Jako substráty mohou sloužit fenoly, alkoholy či aminy. Konjugace s glutathionem probíhá v cytosolu např. jaterních, střevních a ledvinových buněk a slouží k odstranění toxicity elektrofilních xenobiotik, jako jsou epoxidy, aromatické nitrosloučeniny a další. Reakce může probíhat s i bez přítomnosti glutathiontransferasy.

K acetylaci běžně dochází u primárních aromatických aminů, hydroxylaminů a sulfonamidů za přítomnosti kofaktoru acetyl-CoA. Substráty methylačních reakcí jsou kupříkladu katecholy a látky obsahující sulfhydrylovou a dusíkatou funkční skupinu. Konjugaci s aminokyselinami, kterou je u člověka glycin, podléhají aromatické karboxylové kyseliny, např. kyselina benzoová nebo skořicová (Gibson and Skett 2001; Utrecht and Trager 2007).

1.2. Redukce karbonylové skupiny

Karbonylová skupina a převážně její ketoforma, je součástí velkého množství xenobiotických látek, toxinů a obzvláště léčiv z různých skupin zahrnujících antineoplastika, antipsychotika, antiemetika, nesteroidní antiflogistika a další. Všechny tyto látky jsou proto potenciálními kandidáty pro enzymy první fáze biotransformace redukujícími právě karbonylovou skupinu – aldo-keto reductasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy se středním řetězcem (MDR) a obzvláště dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR). Redukce karbonylové skupiny je u mnoha látek hlavní biotransformační přeměnou. U některých léčiv může vést ke snížení až ztrátě účinku, např. antracykliny, u dalších naopak k aktivaci, např. dolasetron. Obojí může vést až k projevu toxických účinků na organismus a proto je nutné pochopit vliv karbonylreduktas na tyto látky. Redukci karbonylové skupiny vybraných látek uvádí Obrázek 1.

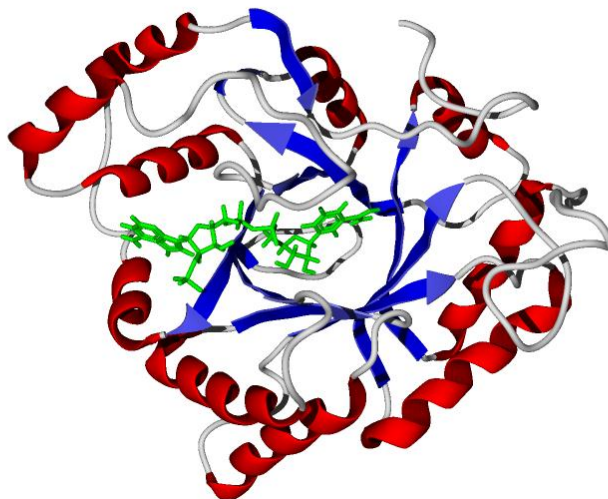


Obrázek 1 – Redukce karbonylové skupiny u vybraných xenobiotik.

1.2.1. Aldo-keto reductasy (AKR)

Nadrodina enzymů redukujících karbonylovou skupinu zvaná aldo-keto reductasy je v dnešní době tvořena 161 členy rozdělenými do patnácti rodin. Tyto enzymy jsou převážně cytosolické monomery s molekulovou hmotností mezi 34 a 37 kDa. Jako redukční kofaktor upřednostňují redukovanou formu koenzymu NADPH před NADH. Jejich výskyt byl potvrzen v mnoha rostlinných i živočišných druzích, včetně mikroorganismů. V různých lidských tkáních bylo dosud potvrzeno patnáct aldo-keto reductas náležících do tří rodin – AKR1, AKR6 a AKR7. Jejich stručný přehled s alternativními názvy a výskytem uvádí Tabulka 10 (HGNC ; Penning and Drury 2007; The UniProt Consortium).

Reduktasy z rodiny AKR spojuje trojrozměrné uspořádání nazvané $(\alpha/\beta)_8$ -barel, ve které je osm β -listů tvořících kostru barelu obklopeno osmi α -helixy v antiparalelním směru (Obrázek 2). Oblast pro vazbu kofaktoru NAD(P)H je tvořena zachovanou katalytickou tetradou Tyr, His, Asp, Lys (Y, H, D, K) na C-konci barelu (Bennett et al. 1996; Schlegel et al. 1998).



Obrázek 2 – Trojrozměrná struktura AKR1C1 se zobrazením $(\alpha/\beta)_8$ -barelu a molekulou kofaktoru NADPH (zeleně) (El-Kabbani et al. 2011).

1.2.1.1. Názvosloví a rozdělení AKR

Postupné rozšiřování nadrodiny AKR si vynutilo vytvoření jednotného názvosloví, které by bylo schopno přesně určit každého člena této skupiny reduktas. Názvosloví postavené na substrátové specifitě jednotlivých AKR bylo nedostačující, a proto bylo v roce 1997 zavedeno názvosloví nové, založené na shodě řetězce aminokyselin. Název každého člena je tvořen písmeny „AKR“ naznačujícími příslušnost k nadrodině aldo/keto reduktas následovaný číslem rodiny, písmenem podrodiny a nakonec opět číslem. Tento systém jednoduchým způsobem zaručuje unikátnost jména každé AKR, např. AKR1C3 je třetí člen rodiny 1, podrodiny C. Protože je názvosloví založeno na shodě aminokyselin, bylo nutné určit hranice jednotlivých rodin a podrodin a zároveň rozlišit, kdy se jedná o isoformu nebo alelu již pojmenovaného enzymu. Pokud je shoda řetězce aminokyselin nižší než 40 %, jedná se o rozdílné rodiny. Jestliže je v nějaké rodině shoda nižší než 60 %, jedná se o rozdílné podrodiny. V případě, že je podobnost vyšší než 97 %, jsou porovnávány enzymy alelami. Ovšem toto neplatí, pokud nastane jedna z následujících možností a) aktivity enzymů jsou různé, b) enzymy jsou kódovány různými cDNA nebo c) enzymy jsou kódovány různými geny. Kupříkladu AKR1C1 a AKR1C2 jsou z 98 procent shodné, ale jejich funkce a substrátová specifita je zcela odlišná. AKR1C1 je 20 α -hydroxysteroiddehydrogenasa, kdežto AKR1C2 je 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa (Jez et al. 1997b).

Tabulka 10 – Přehled aldo/keto reduktas u člověka (*The UniProt Consortium*).

Protein	Alternativní název	Výskyt
AKR1A1	Aldehydreduktasa	Široce se vyskytující – obzvláště ledviny, játra, slinné žlázy
AKR1B1	Aldosareduktasa, Prostaglandin-2 α -synthasa	Embryonální epiteliální buňky, čočka, ledviny, játra, endometrium
AKR1B10	Aldosareduktasa tenkého střeva	Tenké a tlusté střevo, nadledviny
AKR1B15	-	Oko, varle
AKR1C1	20 α -HSD, dihydrodioldehydrogenasa 1	Široce se vyskytující – obzvláště játra, prsní žláza, mozek
AKR1C2	3 α -HSD typ 3, dihydrodioldehydrogenasa 2, protein vázající žlučové kyseliny	Široce se vyskytující
AKR1C3	3 α -HSD typ 2, 17 β -HSD typ 5, prostaglandin F synthasa	Široce se vyskytující
AKR1C4	3 α -HSD typ 1 dihydrodioldehydrogenasa 4	Játra
AKR1D1	Δ^4 -3-ketosteroid-5- β -reduktasa, Δ^4 -3-oxosteroid-5- β -reduktasa	Játra, méně varle
AKR1E2	1,5-anhydro-D-fruktosareduktasa	Varle
AKR6A3	KCNAB1	Mozek
AKR6A5	KCNAB2	Mozek
AKR6A9	KCNAB3	Mozek
AKR7A2	Aflatoxinaldehydreduktasa 2, sukcinátsemialdehydreduktasa	Široce se vyskytující extrahepatálně, membrána Golgiho aparátu
AKR7A3	Aflatoxinaldehydreduktasa 3	Žaludek, ledviny, játra, slinivka

1.2.1.2. Účast lidských AKR na přeměně látek

Enzymy rodiny AKR jsou schopny katalyzovat širokou paletu redoxních reakcí, ve kterých se vyskytují látky obsahující karbonylovou skupinu. Tato typická vlastnost AKR naznačuje jejich vliv na přeměnu a detoxikaci aldehydů a ketonů vzniklých v organismu během metabolismu nejen endogenních, ale i xenobiotických látek (Bachur 1976).

AKR1A1

Tato aldehydreduktasa je klasický zástupce rodiny AKR. Jedná se monomerní cytosolický enzym vyžadující přítomnost NADPH. Vyskytuje se ve valné většině tkání a nejvíce je zastoupen v ledvinách a játrech (Barski et al. 2005). Substrátová specifita AKR1A1 je široká, je rovněž známa jako prostaglandin-2 α -synthasa nacházející se v endometriu (Bresson et al. 2011), avšak její hlavní role v lidském organismu je prozatím neznámá.

Vzhledem k vlastnostem AKR1A1 je zřejmé, že se bude podílet na přeměně xenobiotických látek obsahujících karbonylovou skupinu. V dnešní době je již znám její vliv na antineoplastika antracykliny, a to daunorubicinu a doxorubicinu, jejichž redukcí vznikají neúčinné a kardiotoxické metabolity (Bains et al. 2008; Kassner et al. 2008; Olson et al. 1988) a také přeměně perorálního antidiabetika acetohehexamidu (Ohara et al. 1995). Ačkoliv se jedná o reduktasu, byla také prokázána schopnost oxidovat molekuly polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) za vzniku dvojných vazeb a tím jejich následná přeměna na reaktivní radikály (Palackal et al. 2001).

AKR1B1

Enzym byl poprvé objeven v placentární tkáni již v roce 1956 a v letech pozdějších také ve tkáních ostatních (Chung and LaMendola 1989). Během minulých let byl zkoumán a prokázán vliv AKR1B1 na metabolismu glukosy při hyperglykemických stavech u sekundárního diabetu, který vede k následnému poškození tkání – retinopatie, nefropatie a neuropatie (Kinoshita 1990; Ramana 2011). Stejně jako v případě AKR1A1 je substrátová specifita AKR1B1 velmi široká, což předurčuje vliv na různé látky s karbonylovou skupinou. Kassner et al. (2008) prokázal aktivitu vůči doxorubicinu a o několik let dříve Lee et al. (2001) vůči daunorubicinu.

AKR1B10

Výskyt aldosareduktasy tenkého střeva nebo také retinalreduktasy v lidském organismu úzce souvisí s výskytem rakoviny plic, jater, tlustého střeva či rakoviny dělohy, kdy dochází k několikanásobnému nárůstu exprese (Fukumoto et al. 2005). Díky tomu byla objevena schopnost tohoto enzymu redukovat většinu antracyklinů – doxorubicin, epirubicin a obzvláště daunorubicin a idarubicin (Zhong et al. 2011). Martin et al. (2006) zjistil, že AKR1B10 velmi dobře redukuje dolasetron a rovněž prokázal přeměnu oracinu na dihydrooracin. V souvislosti s rakovinou plic byla objevena i schopnost redukovat některé PAH (Quinn et al. 2008).

AKR1B15

Tento enzym byl objeven, rekombinantně připraven a popsán teprve v nedávné době (Salabei et al. 2011) a proto zatím nejsou známy bližší informace o vlivu na metabolismus látek v lidském organismu. Jedná se o jednu z mála mikrosomálních AKR.

AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4

Tyto čtyři enzymy jsou navzájem velmi podobné – shoda jejich primárních sekvencí je vyšší než 86 % (Jez et al. 1997a). I přesto je jejich výskyt v lidském těle rozdílný. Zatímco AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C3 jsou exprimovány hlavně v prostatě a mléčné žláze, AKR1C4 se nalézá pouze v játrech. Oproti předešlým členům z nadrodiny AKR jsou tyto známy hlavně jako enzymy přeměňující látky steroidní povahy jak oxidací, tak i redukcí (Penning et al. 2000).

AKR1C1 hraje hlavní roli v inaktivaci progesteronu na 20 α -hydroxyprogesteron. AKR1C2 mimo jiné vykazuje schopnost vázat žlučové kyseliny a transportovat je v rámci hepatocytu. AKR1C3 má díky 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasové aktivitě vliv na přeměnu estronu na estradiol a androstandionu na testosteron. Kromě toho Suzuki-Yamamoto et al. (1999) objevil PGF-synthasovou aktivitu. AKR1C4 je neaktivnější člen této skupiny enzymů (Penning et al. 2000). Bohužel i přes výborné znalosti substrátové specifity této skupiny enzymů je jejich role v organismu nejasná.

Rovněž schopnost metabolizovat xenobiotika je velmi široká. Patří mezi ně aktivace PAH (Palackal et al. 2002), redukce 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonu (NNK) vznikajícího z nikotinu v cigaretovém kouři na rakovinotvorný 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) (Breyer-Pfaff et al. 2004) či redukce protinádorových látek oracinu na dihydrooracin (Wsol et al. 2007) a antracyklinů (Novotna et al. 2008; Ohara et al. 1995). Také jsou aktivní v přeměnách antihistaminika ketotifenu (Breyer-Pfaff and Nill 1999), syntetického steroidního hormonu tibolonu (Steckelbroeck et al. 2006), dolasetronu používaného jako antiemetikum po léčbě chemoterapeutiky a naltrexonu užívaného při léčbách závislosti na alkoholu a opioidních látkách (Breyer-Pfaff and Nill 2004).

AKR1D1

Přítomnost této reduktasy v lidském organismu a její schopnost 5 β -redukce je nezbytná pro správnou syntézu žlučových kyselin (Palermo et al. 2008). Případná změna funkce způsobená genovými mutacemi vede k novorozeneckému selhání jater (Lemonde et al. 2003). Bylo zjištěno, že AKR1D1 je schopna redukovat široké spektrum steroidních látek, nicméně širší znalosti o funkci tohoto enzymu jsou zatím nejasné (Chen et al. 2011).

AKR1E2

Byla objevena ve varlatech již v roce 2003, avšak do dnešní doby je o tomto členu nadrodiny AKR známo velmi málo informací. Již teď je ale zřejmé, že nebude mít vliv na přeměnu steroidních struktur (Nishinaka et al. 2003).

AKR6A3, AKR6A5, AKR6A9

Rodina AKR6 má oproti ostatním členům nadrodiny AKR zcela ojedinělou vlastnost. Tvoří β -podjednotku napěťově regulovatelných draslíkových kanálů, ve kterých ovlivňuje aktivitu samotného kanálu tvořeného různými typy α -podjednotek (Li et al. 2006; McCormack and McCormack 1994). I přes intenzivní studium probíhající v posledních letech, které prokázalo vliv na inaktivaci draslíkového kanálu (Peri et al. 2001) či katalýzu redukčních reakcí oxidovaných fosfolipidů (Xie et al. 2011), je jejich funkce ne zcela známa.

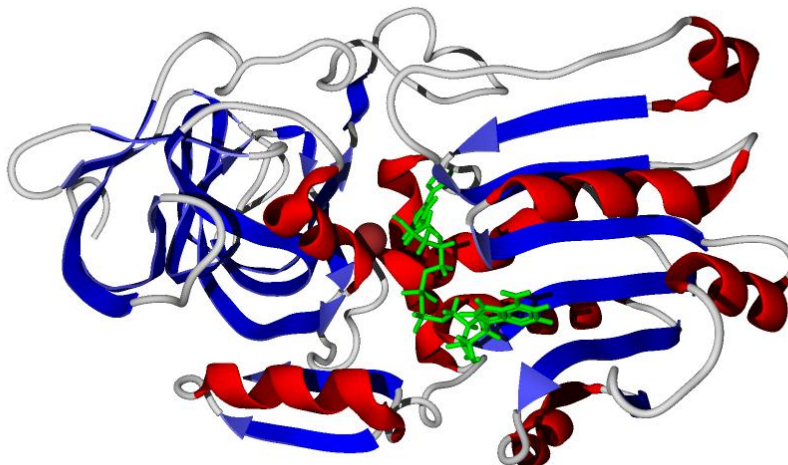
AKR7A2, AKR7A3

Jedny z mála z nadrodiny AKR, které tvoří dimerní enzymy. AKR7A2 je schopna katalyzovat přeměnu sukcinát-semialdehydu – metabolit neurotransmiteru GABA (Lyon et al. 2007) a nedávno byl rovněž prokázán vliv na redukci daunorubicinu (Bains et al. 2010a). AKR7A3 je přisuzována role detoxifikačního enzymu díky schopnosti redukovat produkt přeměny aflatoxinu-B₁ (Guengerich et al. 2001). Oba enzymy byly považovány za cytosolické, avšak u AKR7A2 bylo zjištěno, že je součástí membrány Golgiho komplexu (Kelly et al. 2002).

1.2.2. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

Nadrodina MDR v posledních letech prodělala bouřlivý rozvoj díky rozmachu sekvenačních programů a bioinformatiky. V dnešní době ji tvoří více než 15000 členů z více než pěti set rodin, mezi které patří například Zn^{2+} -dependentní alkoholdehydrogenasy, chinonreduktasy, leukotrien-B₄-dehydrogenasy, polyoldehydrogenasy a mnoho dalších. Lidských MDR je nyní 49 a jsou zastoupeny v prvních devíti rodinách se systematickým pojmenováním MDR001 – MDR009 (Hedlund et al. 2010; MDR).

Enzymům nadrodiny MDR je společných několik znaků. Na C-konci se nachází, tzv. „Rossmann-fold“ motiv, který slouží jako místo pro vazbu koenzymu NAD(P)⁺. K vazbě substrátu pak dochází na N-konci (Obrázek 3). Většina MDR proteinů až na občasné výjimky tvoří homodimery (Persson et al. 2008).



Obrázek 3 – Typický motiv „Rossmann-fold“ v pravé části monomeru ADH1B s molekulou NAD⁺ (zeleně). Katalytický zinečnatý ion je naznačen jako červená koule (Gibbons and Hurley 2004).

1.2.2.1. Názvosloví a rozdělení MDR

Vzhledem k rozsáhlosti nadrodiny MDR bylo nutné vytvořit systém, který by jednoznačně charakterizoval příslušnost k nadrodině. Nebylo ovšem možné použít stejný přístup jako v případě nadrodiny AKR. Proto bylo s výhodou použito bioinformatického přístupu, což vedlo k vytvoření 86 unikátních „*hidden Markov*“ modelů (HMM), jedinečně charakterizujících 86 rodin. Detailní popis tvorby těchto modelů publikoval Hedlund et al. (2010).

1.2.2.2. MDR v lidském organismu

I přes obrovský počet MDR v nadrodině jich u člověka zatím bylo potvrzeno pouze 49. Jak již bylo uvedeno, patří do prvních devíti rodin systematicky označených MDR001 až MDR009. Stručný přehled těchto rodin, včetně alternativního názvu a předpokládaného počtu členů je uveden v tabulce (Tabulka 11). Právě díky velkému rozvoji této skupiny, který nastal v posledních letech, jsou prozatím ve většině případů podrobnější informace o fyziologické funkci a vlivu jednotlivých členů MDR na metabolismus xenobiotik neznámé.

Tabulka 11 – Přehled lidských MDR dle *mdr-enzymes.org*.

Systematický název	Alternativní název	Počet lidských
MDR001	Alkoholdehydrogenasy (ADH)	27
MDR002	Prostaglandinreduktasy (PTGR)	4
MDR003	Synthasy mastných kyselin (FAS)	3
MDR004	Předpokládané chinonoxidoreduktasy (QORX)	1
MDR005	Polyoldehydrogenasy (PDH)	2
MDR006	Zinek-vázající alkoholdehydrogenasy typ 2 (ZADH2)	4
MDR007	Mitochondriální trans-2-enoyl-CoA-reduktasy (MECR)	2
MDR008	„Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like“* (VAT1)	8
MDR009	Chinonoxidoreduktasy (vertQOR)	1

* - Vzhledem k neurčitosti českého překladu je uveden originální název

MDR001 – alkoholdehydrogenasy (ADH)

Jedná se o největší rodinu MDR nejen v celkovém počtu u všech organismů, ale i v případě člověka s potvrzenými 7 členy – ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4, ADH5, ADH6 a ADH7 (The UniProt Consortium). Základním principem reakcí této rodiny je přeměna alkoholů na aldehydy, respektive ketony, za přítomnosti NAD^+ . Nejznámější substráty ADH jsou bezpochyby ethanol, methanol, ethylenglykol či isopropanol, jejichž přeměna může vést ke vzniku toxických produktů. Mezi další látky, jejichž přeměna je katalyzována alkoholdehydrogenasami, patří také retinoidy, steroidy, biogenní aminy, produkty lipidové peroxidace, ω -hydroxymastné kyseliny či aldehydy (Lee et al. 2011b).

MDR002 – prostaglandinreduktasy (PTGR)

Rodina prostaglandinreduktas, dříve označována jako leukotriendehydrogenasy (LTD), je u člověka zastoupena dvěma NADPH dependentními členy, prostaglandinreduktasou 1 (PTGR1, LT4DH) a prostaglandinreduktasou 2 (PTGR2, ZADH1) (The UniProt Consortium). PTGR1 v lidském organismu slouží jako katalyzátor klíčového kroku přeměny a inaktivace prozánětlivého faktoru leukotrienu B_4 (Yokomizo et al. 1996) a její případná indukce může vést k potlačení přeměny buněk na nádorové (Wei et al. 2011).

MDR003 – synthasy mastných kyselin (FAS)

Rodina vznikla sloučením rodin acyl-CoA reduktas (ACR) a proteinů syntézy myocerové kyseliny (MCAS) (Hedlund et al. 2010). Syntéza mastných kyselin je komplexní proces katalyzovaný synthasou mastných kyselin (FASN) tvořenou sedmi různými doménami za

přítomnosti NADPH. Za běžného stavu je její exprese a aktivita striktně regulována, ovšem v případě nádorového onemocnění dochází k výraznému zvýšení obojího. Z tohoto důvodu jsou prováděny experimenty s inhibitory FASN (orlistat, epigallokatechin, cerulenin, C75 a další), které by ve výsledku snížily syntézu lipidů potřebných pro tvorbu membrán nádorových buněk (Flavin et al. 2010). Byla také prokázána souvislost s diabetem druhého typu a vznikem insulinové rezistence (Menendez et al. 2009).

MDR004 – předpokládané chinonoxidoreduktasy (QORX)

Zástupce této rodiny v dnešní době slouží jako proapoptotický marker (Polyak et al. 1997). Jeho předpokládaná role je dána funkcí chinonoxidoreduktasy – zvýšení oxidativního stresu.

MDR005 – polyoldehydrogenasy (PDH)

Nejnámějším a prozatím jediným zkoumaným členem polyoldehydrogenas přítomných v lidském organismu je sorbitoldehydrogenasa. Její přítomnost byla prokázána téměř ve všech lidských tkáních, obzvláště pak v ledvinách a čočce (Carr and Markham 1995). Byla zkoumána hlavně v souvislosti s diabetem, kde její nedostatečná aktivita vede k akumulaci sorbitolu v buňkách (El-Kabbani et al. 2004).

MDR006 – zinek-vázající alkoholdehydrogenasy typ 2 (ZADH2)

Podrobnější informace o této rodině nejsou známy.

MDR007 – mitochondriální trans-2-enoyl-CoA-reduktasy (MECR)

Zatím jediný zkoumaný zástupce této rodiny se účastní syntézy mastných kyselin, kde redukuje dvojnou vazbu substrátu (Miinalainen et al. 2003).

MDR008 – „Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like“ (VAT1)

I přes větší počet proteinů přítomných u člověka jsou znalosti o jejich funkci minimální. V dnešní době je známa pouze jejich ATPasová funkce (Hayess et al. 1998).

MDR009 – chinonoxidoreduktasy (vertQOR)

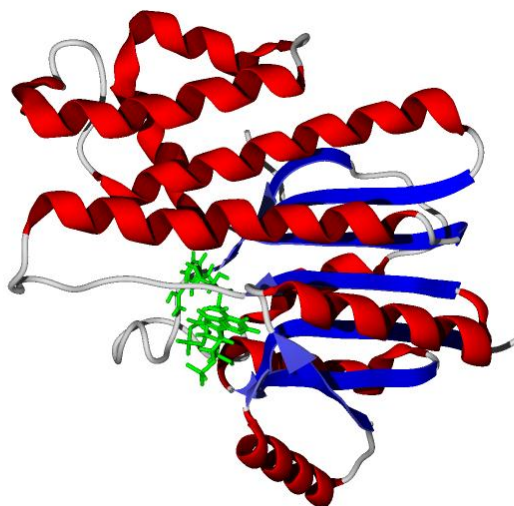
Jediný dosud známý zástupce této rodiny u člověka je zeta-krystalin. Na rozdíl od ostatních MDR se jedná o homotetramer a neobsahuje zinečnatý kation (Fernandez et al. 2007). Předpokládá se schopnost vazby RNA.

1.2.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

Jedná se o jednu z největších nadrodin dehydrogenas/reduktas vůbec s více než 51 tisíci členy s molekulovou hmotností mezi 25 a 45 kDa (The UniProt Consortium). Nejnovější data z června 2012 prezentována na konferenci "Congress of Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism" uvádějí 134908 zástupců. Vyskytují se v různých organismech od jednoduchých

bakterií až po člověka (Jornvall et al. 1999). Databáze nyní uvádějí 76 ověřených SDR a dalších 68 předpokládaných SDR přítomných v lidském organismu, mezi které patří například cytosolické karbonylreduktasa 1 (CBR1, SDR21C1) a 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (17 β -HSD1, SDR28C1) či membránově vázaná 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD1, SDR26C1) (SDR enzymes ; The UniProt Consortium).

Enzymy nadrodiny SDR nejsou sekvenčně příliš shodné. Podobnost jejich primárních sekvencí aminokyselin je běžně pod 30 procenty. Nicméně jsou spojovány dvěma charakteristickými motivy a to motivem pro vazbu kofaktoru NAD(P)(H) TGxxxGxG a takzvanou katalytickou tetradou N-S-Y-K (Filling et al. 2002; Jornvall et al. 1995). Také v jejich prostorovém upořádání lze nalézt společný jmenovatel, kterým je strukturní motiv „*Rossmann-fold*“ (Pfam 25.0) (Obrázek 4).



Obrázek 4 – Karbonylreduktasa 1 (CBR1) a její typický motiv „*Rossmann-fold*“ (vpravo). Molekula NADPH je zobrazena zeleně (Tanaka et al. 2005).

1.2.3.1. Názvosloví a rozdělení SDR

Rovněž pro nadrodinu SDR enzymů bylo nutné stanovit pravidla pro pojmenování a zařazování jednotlivých zástupců. Celá nadrodina je popsána třemi základními „*hidden Markov*“ modely (HMM), které jsou publikovány v databázi Pfam pod označením *adh_short* (PF00106), *3Beta_HSD* (PF01073) a *Epimerase* (PF01370) (Pfam 25.0). Zástupci určení těmito modely byli poté použiti pro následnou tvorbu nových HMM modelů charakteristických pro každou podrodinu (Kallberg et al. 2010).

Pro pojmenování SDR byl zvolen systém podobný systému u CYP450 či AKR. Nadrodina je dána písmeny „SDR“. Rodiny jsou poté určeny číslem (prvních 48 rodin je určeno pro SDR nacházející se také u člověka). Podrodiny jsou označeny písmenem, které naznačuje typ SDR

proteinu (C – classical, E – extended, A – atypical, I – intermediate, D – divergent, X – complex, U – unknown) v závislosti na motivu vazebného místa pro kofaktor a/nebo aktivního místa (Kallberg et al. 2002). Každý člen rodiny je poté určen číslem. Ve výsledku je například CBR1 označena jako SDR21C1 (Persson et al. 2009).

1.2.3.2. Lidské SDR a jejich vliv na přeměnu látek

Do dnešní doby bylo blíže popsáno 76 ze 144 členů rodiny SDR přítomných u člověka (SDR enzymes). Jejich umístění v buňce shrnuje Tabulka 12. Role v lidském organismu je velice různorodá, od přeměny steroidních látek jako jsou hormony či prostaglandiny, přes lipidový metabolismus po katalýzu přeměny xenobiotik. Jejich význam potvrzují také objevy bodových polymorfismů, které vedou k projevu různých geneticky založených chorob (Moeller and Adamski 2009; Oppermann et al. 2001).

Tabulka 12 – Umístění SDR v lidské buňce.

Umístění v buňce	Počet SDR
Endoplasmatické retikulum	22
Cytosol	19
Mitochondrie	11
Peroxisom	8
Sekretované	6
Membrána (bez bližšího určení)	5
Jádro	1
Golgiho aparát	1
Neznámé	5

Některé SDR se nachází v mnoha částech buňky, proto je celkový součet vyšší než 76.

1.2.3.3. Nejvýznamnější cytosolické SDR

Karbonylreduktasa 1 (CBR1, SDR21C1)

Karbonylreduktasa 1 je bezesporu nejvýznamnější enzym z rodiny SDR. Byl izolován již v sedmdesátých letech dvacátého století a popsán na počátku let osmdesátých (Ris and von Wartburg 1973; Wermuth 1981). CBR1 je NADPH-dependentní monomer s molekulovou hmotností 30,4 kDa a je přítomna téměř ve všech orgánech, v největších koncentracích v játrech, žaludku, tenkém střevě a ledvinách – orgánech, které přichází do styku s xenobiotickými látkami (Wirth and Wermuth 1992).

Účast CBR1 na přeměnách endogenních a xenobiotických substrátů je široce prozkoumána a zahrnuje velké množství látek obsahujících karbonylovou skupinu. Mezi endogenní látky, na jejichž syntéze či degradaci se CBR1 podílí, patří kupříkladu chinony, přesněji menadion a koenzym Q10 (Wermuth et al. 1986), prostaglandiny (Wermuth 1981), isatin, metabolit vykazující různé fyziologické funkce (Medvedev et al. 2005), a v menší míře také tetrahydrobiopterin, kofaktor syntézy katecholaminů a degradace aminokyselin (Iino et al. 2003). Ke xenobiotickým substrátům se řadí opět chinony, ze skupiny benzo- a naftochinonů působící cytotoxicky a karcinogenně (Bolton et al. 2000), NNK, látka přítomná v cigaretovém kouři (Atalla et al. 2000), protinádorová antracyklinová léčiva doxorubicin a daunorubicin (Bains et al. 2009) a další látky jako je dolasetron (Breyer-Pfaff and Nill 2004), haloperidol a loxoprofen (Ohara et al. 1995).

1.2.3.4. Mikrosomální SDR

Jako mikrosomální se označují enzymy vázané v membráně endoplasmatického retikula (ER), které se během přípravy subcelulárních frakcí rozpadá a tvoří „měchýřky“ zvané mikrosomy. Přehled lidských mikrosomálních karbonylreduktas z nadrodiny SDR uvádí Tabulka 13. Níže uvedený souhrn všech nyní známých mikrosomálních karbonyl reduktas z nadrodiny SDR je zpracován do skupin dle oficiálního názvu založeného na reakci, kterou enzym katalyzuje. Ačkoliv by bylo aktuálnější popisovat chování a vlastnosti enzymů v jednotlivých podrodinách SDR, často to není možné z důvodu velmi kusých informací a tím neexistence spojovacího článku mezi jednotlivými členy podrodiny. Lze uvést příklad skupiny 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas (HSD11B), dehydrogenas/reduktas nadrodiny SDR (DHRS) nebo retinoldehydrogenas (RDH), kde téměř každý člen patří do odlišné podrodiny.

Tabulka 13 – Přehled mikrosomálních karbonylreduktas z nadrodiny SDR a jejich systematické zařazení (SDR enzymes ; The UniProt Consortium).

Název	Používané zkratky	SDR zařazení
Dehydrogenasa/reduktasa 1 nadrodiny SDR	DHRS1	SDR19C1
Dehydrogenasa/reduktasa 3 nadrodiny SDR	DHRS3, RETSDR1	SDR16C1
Dehydrogenasa/reduktasa 7 nadrodiny SDR	DHRS7, RETSDR4	SDR34C1
Dehydrogenasa/reduktasa 9 nadrodiny SDR	DHRS9	SDR9C4
3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa/ Δ 5 \rightarrow 4-isomerasa 1	HSD3B1	SDR11E1
3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa/ Δ 5 \rightarrow 4-isomerasa 2	HSD3B2	SDR11E2
3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa/ Δ 5 \rightarrow 4-isomerasa 7	HSD3B7	SDR11E3
Kortikosteroid-11β-dehydrogenasa 1	HSD11B1	SDR26C1
Kortikosteroid-11 β -dehydrogenasa 2	HSD11B2	SDR9C3
Estradiol-17 β -dehydrogenasa 2	HSD17B2	SDR9C2
Testosteron-17 β -dehydrogenasa 3	HSD17B3	SDR12C2
17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 6	HSD17B6, RODH	SDR9C6
Estradiol-17 β -dehydrogenasa 11	HSD17B11, DHRS8	SDR16C2
Estradiol-17 β -dehydrogenasa 12	HSD17B12	SDR12C1
3-ketodihydrosphingosinreduktasa	KDSR, FVT1	SDR35C1
11-cis-retinoldehydrogenasa	RDH5	SDR9C5
Retinoldehydrogenasa 10	RDH10	SDR16C4
Retinoldehydrogenasa 11	RDH11, PSDR1	SDR7C1
Retinoldehydrogenasa 12	RDH12	SDR7C2
Retinoldehydrogenasa 14	RDH14, PAN2	SDR7C4
Retinoldehydrogenasa 16	RDH16, RODH4	SDR9C8
Epidermální retinoldehydrogenasa 2	RDHE2	SDR16C5

Tučně jsou označeny reduktasy, u kterých byl doposud popsán vliv na metabolismus xenobiotik.

Dehydrogenasa/reduktasa 1, 3, 7 a 9 nadrodiny SDR (DHRS1, DHRS3, DHRS7, DHRS9)

DHRS1 byla popsána již v roce 2001, kdy byl její gen byl izolován z cDNA knihovny lidského fetálního mozku. Analýza mRNA ukázala dvě formy DHRS1. Delší, se zvýšenou expresí v játrech, a kratší, s expresí v srdci, játrech, svalech, ledvinách a slinivce (Wu et al. 2001). Je známa rovněž krystalová struktura tohoto proteinu (Pilka et al. 2007).

Druhý zástupce této skupiny DHRS3 je známa jako all-*trans*-retinol dehydrogenasa přítomná v sítnici (Haeseleer et al. 1998). Na úrovni mRNA byl prokázán výskyt ve fetálních ledvinách, játrech a plicích a mnoha orgánech dospělých. Stejně jako DHRS1 byla připravena

rekombinantně (Cerignoli et al. 2002). V nedávné době byla prokázána také účast na metabolismu lipidů (Deisenroth et al. 2011).

DHRS7 zatím není blíže popsána. Objevují se pouze informace o její expresi v souvislosti s rakovinou prostaty (Romanuik et al. 2010). Tento enzym byl připraven společně s DHRS3 v rekombinantním systému bacmid-SF9 (Saari et al. 2000).

Poslední z této skupiny DHRS9, která byla podobně jako předchozí DHRS získána rekombinantně z cDNA knihovny, se ve velkém množství nachází v průdušnici a dále také v míše, kostní dřeni, srdci a střevu. Prvně byla charakterizována jako 3 α -HSD a 17 α -HSD, avšak katalyzuje také přeměnu all-*trans*-retinolu na retinal (Chetyrkin et al. 2001a; Jones et al. 2007).

3 β -hydroxysteroiddehydrogenasy/ Δ (5 \rightarrow 4)-isomerasy 1, 2 a 7 (HSD3B1, HSD3B2, HSD3B7)

Jedná se o velmi důležitou podrodinu NADH-dependentních karbonylreduktas mající vliv na klíčový krok syntézy všech steroidních hormonů v lidském organismu (Lachance et al. 1990). Typ 1 se nachází v placentě, ze které byl poprvé izolován (Luu-The et al. 1990), a periferních tkáních, zatímco typ 2, již připravený rekombinantně, v nadledvinách, vaječnících a varlatech (Rheume et al. 1991). Poruchy jejich funkce vedou ke vzniku různých chorob způsobených nedostatkem těchto hormonů, například vrozené zbytnění nadledvinek (Simard et al. 2005). Typ 7 se nachází v játrech, účastní syntézy žlučových kyselin a jeho případný nedostatek vede až k úplnému zastavení tvorby těchto kyselin. Stejně jako HSD3B2 byl připraven rekombinantními postupy (Schwarz et al. 2000).

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (HSD11B1, HSD11B2)

Oba enzymy jsou významné v regulaci hladiny aktivních glukokortikoidů. HSD11B2 byla získána pomocí rekombinantních metod (Albiston et al. 1994). Jedná se o NAD⁺-dependentní enzym nacházející se v distálních tubulech ledvin a také v koncové části tlustého střeva. Rovněž byla nalezena v placentě. Tím, že katalyzuje přeměnu aktivních glukokortikoidů (11 β -hydroxyglukokortikoidy) na jejich inaktivní formu (11-ketoglukokortikoidy), působí jako prvek chránící tkáň před nadměrným působením glukokortikoidních látek (Albiston et al. 1994). HSD11B1 byla úspěšně purifikována z lidských jater (Maser et al. 2003). Rovněž je dostupná trojrozměrná struktura získána krystalograficky (Hosfield et al. 2005). Výskyt NADPH-dependentní HSD11B1 je odlišný a souvisí se zcela opačným účinkem této reduktasy, kdy mění inaktivní formy glukokortikoidů na aktivní. Nalézá se hlavně v játrech a svalové tkáni (Atanasov and Odermatt 2007). Regulace exprese jedné či druhé HSD11B proto vede k různému nastavení citlivosti buněk vůči glukokortikoidům. Některé výzkumy naznačují vliv

inhibice HSD11B1 na zlepšení stavů spojených s obezitou, diabetem druhého typu či aterosklerózou (Odermatt and Nashev 2010).

HSD11B1 je v dnešní době v podstatě jediná lidská mikrosomální karbonylreduktasa, u které je znám vliv na přeměnu xenobiotických látek. Prvním xenobiotikem, u kterého byla popsána redukce karbonylreduktasou HSD11B1, je metyrapon, látka používaná při léčbě nedostatečnosti nadledvinek (Maser 1989). Mezi další xenobiotické substráty patří potenciální cytostatikum oracin, který je redukován na svůj hlavní metabolit dihydrooracin (Wsol et al. 2003), nesteroidní antiflogistikum ketoprofen (Hult et al. 2001), karcinogenní látka NNK nacházející se v tabáku, která je vlivem HSD11B1 redukována na méně toxický NNAL (Maser et al. 2003) a také fungicidní triadimefon, užívaný v léčbě houbových infekcí (Kenneke et al. 2008).

Experimentálně bylo testováno několik potenciálních inhibitorů HSD11B2. Případné xenobiotické substráty podléhající redukcí karbonylové skupiny za účasti HSD11B2 nejsou doposud známy.

17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2, 3, 6, 11 a 12 (HSD17B2, HSD17B3, HSD17B6, HSD17B11, HSD17B12)

Všechny reduktasy z této skupiny ovlivňují metabolismus steroidních látek, mezi něž patří hormonálně aktivní estradiol či testosteron. První z nich HSD17B2 se nachází především ve tkáních, které jsou ovlivňovány steroidními hormony, jako je prsní tkáň, endometrium, placenta a prostata. Právě z prostatické a placentární tkáně byla získána cDNA sloužící k následné rekombinantní přípravě HSD17B2. Katalyzuje oxidační přeměnu aktivních estradiolu a testosteronu na méně aktivní 17-keto formy estron a androstendion a v menší míře taky reakce opačné, čili redukční (Saloniemi et al. 2012; Wu et al. 1993).

HSD17B3 se vyskytuje pouze ve varlatech, kde redukuje prekurzor testosteronu na aktivní testosteron. Případné mutace jejího genu mohou vést až ke vzniku mužského pseudohermafroditismu. Připravena byla rovněž rekombinantním způsobem (Geissler et al. 1994).

Podobně jako předchozí HSD17B byla HSD17B6 také připravena rekombinantně. Její výskyt je omezen hlavně na játra a v menší míře také na slezinu, nadledviny, varlata a prostatu. Má vliv na tvorbu androsteronu a předpokládá se redukce androstendiolu na dihydrotestosteron (Biswas and Russell 1997; Mohler et al. 2011). Projevuje se také jako 3($\alpha \rightarrow \beta$)-epimerasa androsteronu, kdy nejprve dojde k HSD aktivitě a poté k redukcí ketoskupiny (Huang and Luu-The 2000), a jako retinoldehydrogenasa (Chetyrkin et al. 2001b).

HSD17B11 katalyzuje přeměnu estradiolu na estron (Li et al. 1998) a androstadiolu na androsteron (Brereton et al. 2001). Velmi široce se vyskytuje v různých tkáních, mezi něž patří např. plíce, oči, játra, prostata či vaječníky (Chai et al. 2003). Její exprese ve tkáni prostaty se zvyšuje při výskytu rakovinného onemocnění (Nakamura et al. 2009). Získána byla opět rekombinantní formou.

HSD17B12 se také podílí na přeměně estronu na estradiol (Luu-The et al. 2006), ale od ostatních enzymů podrodiny HSD17B se odlišuje funkcí 3-ketoacyl-CoA-reduktasy a účastí na syntéze mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Moon and Horton 2003). S tím také souvisí její výskyt ve tkáních, jako jsou játra, ledviny a svaly (Sakurai et al. 2006). Podobně jako předchozí HSD17B byla připravena klonováním.

Je zřejmé, že v případě mikrosomálních HSD17B, byly použity výhradně metody rekombinantní přípravy za použití různých expresních systémů.

3-ketodihydrosfingosinreduktasa (KDSR, FVT1)

Tato reduktasa, poprvé připravená rekombinantně, se nachází ve svalech, srdci, placentě a játrech (Kihara and Igarashi 2004). Hraje důležitou roli v syntéze sfingolipidů a tím ovlivňuje signální dráhy vedoucí k apoptóze (Gupta et al. 2009).

Retinoldehydrogenasa 5, 10, 11, 12, 14 a 16 (RDH5, RDH10, RDH11, RDH12, RDH14, RDH16)

Lidská forma RDH5 byla nalezena v cDNA díky shodě s bovinním typem (Simon et al. 1996). Nachází se ve většině tkání, mezi které patří kupříkladu játra, prsní tkáň, thymus, sítnice či tlusté a tenké střevo. Vedle účasti v metabolismu retinolu byla popsána také 3 α -HSD aktivita. Její případné mutace se projevují ve formě jednoho z typů noční slepoty (Driessen et al. 2000; Wang et al. 1999).

RDH10 se ve větší míře vyskytuje v kůži, kde se podílí na syntéze kyseliny retinové (oxidace *all-trans*-retinolu na retinaldehyd), která zvyšuje proliferaci a snižuje diferenciaci kožních buněk (Lee et al. 2011a). V embryích je RDH10 hlavní enzym syntézy vitamínu A (Farjo et al. 2011). Byla rekombinantně připravena z cDNA sítnice expresí v COS buněčné linii (Wu et al. 2002).

RDH11 je zajímavá tím, že se ve velmi vysoké míře nachází v tkáni prostaty. Z toho také vychází její původní název „prostate short-chain dehydrogenase/reductase 1“ (PSDR1) (Lin et al. 2001). O rok později byl tento enzym připraven rekombinantně a byla u něj popsána redukce *all-trans*-retinalu na retinol (Kedishvili et al. 2002). Nejnovější výzkumy také prokazují přítomnost v pigmentové vrstvě sítnice (Parker and Crouch 2010).

RDH12 se nachází v sítnici a zřejmě slouží jako ochránce této tkáně před nadbytkem *all-trans*-retinalu (Haeseleer et al. 2002; Maeda et al. 2006).

RDH14, dříve známa jako pankreatický protein 2 (PAN2), se vyskytuje ve valné většině tkání. Preferuje NADP(H) jako kofaktor a mezi její substráty patří hlavně *all-trans*-retinal, sloužící jako prekurzor kyseliny retinové. Enzym byl poprvé připraven pomocí klonování v SF9 buněčné linii (Belyaeva and Kedishvili 2002).

Posledním zástupcem této skupiny je NAD(H)-dependentní RDH16, v literatuře uváděna také jako retinoldehydrogenasa 4 (RODH4). Ve velmi vysokém množství se nachází v jaterní tkáni. Substráty tohoto enzymu jsou různé formy retinolu, které oxiduje na příslušné aldehydy, a 3 α -hydroxysteroidy, které může nejen oxidovat, ale také redukovat (Gough et al. 1998; Lapshina et al. 2003).

Stejně jako v případě HSD17B byli výše popsaní zástupci skupiny RDH připraveni rekombinantním způsobem.

Epidermální retinoldehydrogenasa 2 (RDHE2)

Zvýšená exprese tohoto enzymu byla nalezena v kůži u onemocnění nazývaného psoriáza (Matsuzaka et al. 2002). V roce 2009 byla zjištěna její aktivita se substráty RDHE2 *all-trans*-retinolem a *all-trans*-retinaldehydem (Lee et al. 2009). Zatím nebyla popsána na úrovni proteinu.

1.2.3.5. Mitochondriální SDR

Ačkoliv mitochondriálních SDR je uváděno 12, ne všechny jsou nutně vázány v membráně (Tabulka 14). Jako membránové byly potvrzeny pouze HSD3B1 a HSD3B2, zatímco ostatní se nacházejí buďto v mitochondriálním matrix nebo u nich nebyla určena lokalizace.

Tabulka 14 – Umístění SDR v mitochondrii.

Místo (počet)	Název SDR	Užívaná zkratka
Matrix (3)	Karbonylreduktasa 4	CBR4
	Estradiol-17 β -dehydrogenasa 8	HSD17B8
	NADH-dehydrogenasa-[ubichinon]-1 α -podkomplex, podjednotka 9	NDUFA9
Membrána (2)	3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa/ Δ 5 \rightarrow 4-isomerasa 1	HSD3B1
	3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa/ Δ 5 \rightarrow 4-isomerasa 2	HSD3B2
Neurčeno (6)	2,4-dienoyl-CoA-reduktasa 1	DECR1
	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 10	HSD17B10, HADH2
	Neaktivní, podobný hydroxysteroiddehydrogenasam, 1	HSDL1
	Retinoldehydrogenasa 13	RDH13
	Neaktivní L-threonin-3-dehydrogenasa	TDH
	Oxidoreduktasa s doménou WW	WWOX

Karbonylreduktasa 4 (CBR4)

CBR4 se nachází v mitochondriálním matrix v játrech a ledvinách a je schopna redukovat chinony (Endo et al. 2008). Společně s HSD17B8 může tvořit heterotetramery, které jsou poté aktivní jako ketoacylreduktasa (Chen et al. 2009).

Estradiol-17 β -dehydrogenasa 8 (HSD17B8)

Podobně jako ostatní HSD17B je schopna katalyzovat přeměnu steroidních látek a to estradiolu na estron a testosteronu, 5 α -dihydrotestosteronu a 5-androsten-3 β ,17 β -diolu na příslušný ketosteriod (Ohno et al. 2008). Schopnost tvořit heterotetramery s CBR4 již byla uvedena výše.

NADH-dehydrogenasa-[ubichinon]-1 α -podkomplex, podjednotka 9 (NDUFA9)

Je součástí obrovského komplexu dýchacího řetězce tvořeného 45 různými podjednotkami (Scott et al. 2012).

3 β -hydroxysteroiddehydrogenasy/ Δ (5 \rightarrow 4)-isomerasy 1 a 2 (HSD3B1, HSD3B2)

Tyto HSD již byly pospány v kapitole 1.2.3.4.

2,4-dienoyl-CoA-reduktasa 1 (DECR1)

Funkce DECR1 plně odpovídá používanému názvu, kdy katalyzuje redukci dvojně vazby u produktů β -oxidace mastných kyselin (Koivuranta et al. 1994).

17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 10 (HSD17B10)

HSD17B10 působí jako dehydrogenasa 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA. Její defekty vedou k psychomotorické retardaci a ke ztrátě mentálních a pohybových schopností (Lenski et al. 2007). Také je schopna vázat peptid amyloid- β , což může mít vliv na průběh Alzheimerovy choroby. Rovněž jednu ze tří heteropodjednotek mitochondriální ribonukleasy P, kde ovlivňuje zránění tRNA (Holzmann et al. 2008).

Neaktivní, podobný hydroxysteroiddehydrogenasam 1 (HSDL1)

U HSDL1 doposud nebyla prokázána HSD aktivita.

Retinoldehydrogenasa 13 (RDH13)

V *in vitro* experimentech nebyla prokázána retinodehydrogenasová aktivita.

Neaktivní L-threonin-3-dehydrogenasa (TDH)

Podobně jako u HSDL1, ani u TDH nebyla prokázána žádná aktivita.

Oxidoreduktasa s doménou WW (WFOX)

Oxidoreduktasová funkce je pouze předpokládána. Diskutuje se její vliv na buněčnou apoptosu zprostředkovanou tumor nekrotizujícím faktorem (TNF) a tím tumor-supresorová funkce, avšak tento fakt prozatím nebyl potvrzen.

1.2.3.6. Peroxisomální SDR

Peroxisomy jsou velmi jednoduché organely nacházející se prakticky ve všech eukaryotických buňkách. Jsou ohraničeny jedinou lipidovou membránou a jsou zodpovědné například za rozklad mastných kyselin.

Tabulka 15 – Peroxisomální SDR.

Název SDR	Užívaná zkratka
Dehydrogenasa/reduktasa 4 nadrodiny SDR ^a	DHRS4
Dehydrogenasa/reduktasa 7B nadrodiny SDR	DHRS7B
2,4-dienoyl-CoA-reduktasa 2	DECR2
Fatty acyl-CoA reduktasa 1	FAR1
Fatty acyl-CoA reduktasa 2	FAR2
17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 4	HSD17B4
Neaktivní, podobný hydroxysteroiddehydrogenasam 2	HSDL2
Peroxisomální trans-2-enoyl-CoA-reduktasa	PECR

^a – pouze isoforma 1

Dehydrogenasa/reduktasa 4 a 7B nadrodiny SDR (DHRS4, DHRS7B)

U DHRS4 ani DHRS7B zatím nebyla potvrzena žádná funkce ani s ní spojený substrát.

2,4-dienoyl-CoA-reduktasa 2 (DECR2)

Aktivita tohoto enzymu byla prokázána u redukcí látek 2,4-hexadienoyl-CoA a 2,4-dekadienoyl-CoA, což potvrzuje vliv na degradaci dlouhých mastných kyselin v peroxisomech (De Nys et al. 2001).

Fatty acyl-CoA reduktasa 1 a 2 (FAR1, FAR2)

Obě reduktasy se v rostlinách účastní syntézy přírodních vosků, avšak byly nalezeny i v peroxisomech živočichů, kde redukují mastné kyseliny na příslušné alkoholy (Cheng and Russell 2004).

17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 4 (HSD17B4)

Jedná se o polyfunkční peroxisomální enzym. Je schopen vykonávat hydratasovou, dehydratasovou i dehydrogenasovou funkci (Jiang et al. 1997).

Neaktivní, podobný hydroxysteroiddehydrogenasam, typ 2 (HSDL2)

Pro tento enzym prozatím nebyly zjištěny žádné substráty.

Peroxisomální trans-2-enoyl-CoA-reduktasa (PECR)

Enzym se účastní prodlužování řetězce mastných kyselin v jaterních peroxisomech, během kterého redukuje dvojnou vazbu mezi uhlíky 2 a 3 (Das et al. 2000).

1.3. Purifikační techniky

Vzhledem k podstatě biologického vzorku je před započítím samotné purifikace vybraného enzymu nutno prozkoumat vzorek sloužící jako výchozí materiál a získat následující informace:

- kde se enzym nachází (cytosol, endoplasmatické retikulum, mitochondrie, jádro)
- jaká je stabilita enzymu v prostředí (teplota, pH, vliv solí a dalších přidaných látek)
- jaké jsou fyzikální vlastnosti enzymu (náboj, hydrofilita, lipofilita)
- jaká je funkce enzymu a jaké látky jsou jeho substrátem (oxidace, redukce, hydrolýza)

První bod, kterým je umístění zkoumaného enzymu v buňce, je velice podstatný. Samotný materiál není vhodný pro přímé použití v izolačním postupu právě pro obsah velkého množství látek, čímž by došlo k zahlcení purifikačního systému. Ve valné většině případů se proto pracuje s buněčnými frakcemi, které jsou již dostatečně vhodné pro zpracování pomocí purifikačních technik.

Znalost o stabilitě enzymu je nutná pro zachování jeho aktivity během purifikačního procesu. Většina enzymů je proto zpracovávána při 4 °C a používané pufrů mají pH blízké fyziologickému (7,4). Mikrosomální enzymy navíc vyžadují použití detergentů (Triton X-100, SDS), které nahrazují přítomnost membrány a tím enzym stabilizují a izolují jej od jeho nepřirozeného prostředí.

Všechny tyto kroky a nutnost jejich optimalizace jsou velmi časově náročné činnosti vedoucí k nejistému výsledku. S rozvojem studia genomů všech organismů a dostupnosti cDNA knihoven společně s neustálým zdokonalováním klonovacích technik (prokaryotický systém *E. Coli*, eukaryotický systém hmyzích buněk SF9 a mnoho dalších) je v dnešní době již velmi patrný odklon od „starých“ purifikačních postupů, kdy je enzym získáván z tkání.

1.3.1. Třífázová strategie

Rekombinantně připravené enzymy lze s výhodou purifikovat pomocí afinitní chromatografie (1.3.2.4) a tím v jediném kroku získat velice čistý a zakoncentrovaný enzym. V případě izolací enzymů z tkání tomu tak není a proto je potřebné kroků zapojit více. Každý krok však znamená určitou ztrátu množství a/nebo aktivity výsledného produktu. Proto je třeba najít rovnováhu mezi požadovanou čistotou a množstvím/aktivitou enzymu. Obecně doporučovaný postup se nazývá třífázová purifikační strategie. Jedná se o tyto tři po sobě následující kroky (GE-Healthcare 2010):

- Prvotní záchyt (initial capture), kdy je zachycena většina nečistot a dojde k částečné izolaci enzymu, který je mírně koncentrován a jeho aktivita je plně zachována.
- Střední pročištění (intermediate purification), kdy dojde k podstatnému odstranění nečistot a ke koncentraci enzymu.
- Závěrečné pročištění (polishing), ve kterém je enzym zcela purifikován.

1.3.2. Metody purifikace

Valná většina purifikačních technik je prováděna s využitím ručních či automatických chromatografických systémů. Separační účinnost je založena na rozdílných fyzikálních vlastnostech enzymů. Jednotlivé metody uvádí Tabulka 16.

Tabulka 16 – Závislost použité purifikační metody na vlastnosti enzymu (GE-Healthcare 2010).

Vlastnost enzymu	Purifikační metoda
Náboj	Iontově-výměnná chromatografie (IEX)
Hydrofobita	Hydrofobně-interakční chromatografie (HIC)
Velikost molekuly	Gelová filtrace (GF)
Vazba k ligandu	Afinitní chromatografie (AC)
Izoelektrický bod	Chromatofokusace

1.3.2.1. Iontově výměnná chromatografie (IEX)

Tento typ chromatografie využívá celkového náboje vyskytujícího se na povrchu molekuly enzymu. Pro úspěšné navázání této molekuly pak náboj ligandových molekul na chromatografickém substrátu musí být opačný. Příklady běžně používaných ligandů uvádí Tabulka 17.


Tabulka 17 – Ligandy používané při iontově-výměnné chromatografii (Amersham-biosciences 2004).

Kationtový ligand (aniontový měnič)	Charakteristická funkční skupina
Kvartérní amoniová sůl (Quarternary amonium, Q)	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)	$-O-CH_2CHOHCH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Aniontový ligand (kationtový měnič)	Charakteristická funkční skupina
Sulfopropyl (SP)	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methylsulfonát (S)	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2SO_3^-$
Karboxymethyl (Carboxymethyl, CM)	$-O-CH_2COO^-$

1.3.2.2. Hydrofobně-interakční chromatografie (HIC)

Principem tohoto typu chromatografie je interakce mezi hydrofobními částmi enzymu a hydrofobním povrchem stacionární fáze kolony. Vzhledem k tomu, že voda je polární rozpouštědlo, jsou hydrofilní části enzymu obalovány molekulami vody a hydrofobní části schovány dovnitř molekuly. Přidáním solí do roztoku se změní vlastnosti prostředí, kdy molekuly vody začnou přednostně obalovat ionty solí, čímž dojde k obnažení hydrofobní části molekuly enzymu. Pro úspěšnou purifikaci je nutno zvolit dostatečně silnou hydrofobní chromatografickou matici. Jejich přehled a sílu uvádí Tabulka 18. V případě, že síla ligandu není vhodná či dostatečná, lze do startovacího pufru přidat soli, které sílu vazeb zvyšují. Nejpoužívanější jsou síran sodný, draselný a amonný, které nejen že zesilují vazby mezi molekulou enzymu a chromatografickou maticí, ale také protein stabilizují. Koncentraci soli je nutno volit opatrně, aby nedošlo k nežádoucí precipitaci enzymu.

Tabulka 18 – Ligandy a jejich hydrofobní síla (GE-Healthcare 2006).

Typ ligandu	Vzorec ligandu	Tvořené vazby	Síla vazeb
Fenyl	-O-C ₆ H ₅	Hydrofobní, aromatické	
Oktyl	-O-(CH ₂) ₇ -CH ₃	Hydrofobní	
Butyl	-O-(CH ₂) ₃ -CH ₃	Hydrofobní	
Isopropyl	-O-CH-(CH ₃) ₂	Hydrofobní	
Ether	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -OH	Hydrofobní	

Speciálním případem hydrofobně-interakční chromatografie je chromatografie na obrácené fázi (RPC – reversed phase chromatography), kdy se hydrofobní vazby tvoří i v polárním prostředí. Nevýhodou je nutnost použití organických rozpouštědel pro uvolnění navázaného produktu, což má za následek denaturaci enzymu a ztrátu aktivity.

1.3.2.3. Gelová filtrace (GF)

Při gelové filtraci dochází k dělení látek dle jejich molekulové hmotnosti. Chromatografická matrice je tvořena póry různých rozměrů, do kterých se při purifikaci dostávají molekuly nanesené směsi a tím se v závislosti na své velikosti zpomalují. GF může být použita ke dvěma základním účelům. První je klasické dělení směsi podle molekulové hmotnosti, které s sebou nese jednu obrovskou nevýhodu a to je velmi nízká kapacita, při které dojde k důkladnému rozdělení vzorku. Obvykle lze nanést vzorek o objemu maximálně 0,5-2 % z celkového objemu kolony při nízkých průtocích. Proto se klasická GF používá až jako poslední purifikační krok (GE-Healthcare 2010). Druhým typem využití GF je skupinová separace s hlavním použitím k odsolování vzorků například po solubilizaci membrán nebo po iontově-výměnné

chromatografii. Póry matrice mají určenu maximální velikost, při které dojde k zachycení iontů solí (například molekulová hmotnost 5000), ale už není ovlivněn průchod proteinů. Oproti klasické GF lze nanést mnohem větší objem vzorku za vyšších průtoků. Na rozdíl od dialýzy, která poskytuje stejné výsledky, je použití GF mnohem rychlejší a pohodlnější.

1.3.2.4. Afinitní chromatografie (AC)

Afinitní chromatografie je založena na vazbě molekuly enzymu na specifický ligand. Tento typ chromatografie je vysoce selektivní a již po prvním kroku lze získat vysoce čistý a koncentrovaný produkt. AC je první volbou u purifikací molekul, které jsou produktem klonovacích protokolů a které ve své struktuře mají zahrnutu určitou značku (tag, např. FLAG-tag, Histag). Enzym se pomocí značky nebo specifické oblasti naváže na ligand chromatografického substrátu. Po vymytí nečistot se upraví podmínky například změnou pH nebo přidáním látky soutěžící s molekulou enzymu o vazbu na ligand (His-tag – imidazol). Tím dojde k uvolnění zachyceného čistého enzymu.

1.3.2.5. Chromatofokusace

Metoda rozděluje proteiny podle jejich izoelektrického bodu (pI). I přes vynikající schopnost izolovat proteiny je její používání problematické. Vyžaduje speciální pufry (polybuffers), jejichž složení je ve většině případů neznámé a neovlivnitelné. Také se nelze vyhnout nevratnému precipitování proteinů při dosažení jejich pI.

2. Cíle

Experimentální práce je zaměřena na studium membránově vázaných enzymů v metabolismu xenobiotik u člověka. Jednotlivé dílčí cíle jsou pak zaměřeny na:

- 1) Stereospecifitu jako unikátní charakteristiku určující enzym
- 2) Purifikaci a charakterizaci nové lidské jaterní membránově vázané karbonylreduktasy na úrovni enzymově kinetických parametrů a stereospecifity enzymu
 - a. Optimalizaci solubilizace mikrosomálních reduktas, prvního a druhého purifikačního kroku
 - b. Zjištění enzymově kinetických parametrů purifikované karbonylreduktasy
 - c. Zjištění stereospecifity purifikované karbonylreduktasy
- 3) Ověření účasti neznámé membránově vázané karbonylreduktasy na metabolismu vybraných antineoplastik doxorubicinu, daunorubicinu a idarubicinu

3. Metodická část

3.1. Chemikálie

Acetonitril GG – Merck, Praha, Česká republika, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Daunorubicin – TRC, Toronto, Kanada

Daunorubicin hydrochlorid - Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Daunorubicinol hydrochlorid – TRC, Toronto, Kanada

Dihydrooracin – Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha, Česká republika

Doxorubicin hydrochlorid – TRC, Toronto, Kanada

Doxorubicinol hydrochlorid – TRC, Toronto, Kanada

Glukosa-6-fosfát - Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, Grade II – Roche diagnostics, Mannheim, Německo

Idarubicin hydrochlorid - Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

NADP⁺ - Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Oracin – Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha, Česká republika

Ostatní chemikálie – Běžně dostupné produkty nejvyšší čistoty

3.2. Příprava idarubicinolu

Idarubicinol byl připraven selektivní kvantitativní redukcí výchozí látky idarubicinu vybranou rekombinantní karbonylreduktasou (utajeno pro patentové účely). Inkubace probíhala v 1,5 ml mikrozkušavkách Eppendorf. Objem reakční směsi byl 100 μ l a skládal se z 5 μ l reduktasy, 65 μ l 0,1M fosfátového pufru (pH 7,4, tvořený smícháním Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4) a 20 μ l NADPH-regeneračního systému (konečná koncentrace: 0,8mM NADP⁺, 12mM glukosa-6-fosfátu, 0,35 jednotek glukosa-6-fosfát dehydrogenasy, 3mM MgCl_2). Po pětiminutové preinkubaci při 37 °C byla reakce odstartována přidáním 10 μ l 1mM roztoku idarubicinu. Reakce byla udržována při 37 °C po dobu 26 hodin, poté byla ukončena přidáním 40 μ l 26% roztoku amoniaku a zchlazením na 0 °C. Produkty reakce byly extrahovány 15minutovým vytřepáváním do 1 ml chloroformu. Celá směs byla poté centrifugována 2 minuty při 13 tisících otáčkách. Extrakt byl odebrán a odpařen při 30 °C pod vakuem. Odparek byl následně rozpuštěn v 250 μ l mobilní fáze a analyzován pomocí HPLC. Současně

byla prováděna inkubace kontrolních vzorků, aby byly vyloučeny neenzymatické přeměny idarubicinu. Analýzou byla zjištěna kompletní redukce idarubicinu na idarubicinol.

3.3. Příprava mikrosomálních frakcí

Vzorky lidských jaterních tkání byly získány ve spolupráci s Transplantačním centrem Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tři gramy lidských jater byly homogenizovány třemi objemy $0,1\text{M}$ pufru ($\text{pH } 7,4$, tvořený smícháním Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4) ve sklo-teflonovém Potter-Elvehjemově homogenizátoru. Homogenát byl centrifugován 20 minut při 5000 g . Peleta tvořená vazivem, zbytky jader a buněk již nadále nebyla použita. Supernatant byl poté centrifugován 60 minut při 20000 g , aby došlo k odstranění mitochondrií. Výsledný supernatant byl následně ultracentrifugován 65 minut při 105000 g . Došlo k rozdělení cytosolu (supernatant) a mikrosomů (peleta). Pelety byly resuspendovány v jednom objemu homogenizačního pufru a opět ultracentrifugovány za shodných podmínek. Tento krok byl opakován třikrát, aby došlo ke kompletnímu odstranění cytosolu. Výsledné přečištěné pelety byly resuspendovány v jednom objemu $0,1\text{M}$ fosfátového pufru ($\text{pH } 7,4$, tvořený smícháním Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4) s 20% glycerolem (v/v) a uloženy do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechny kroky, včetně centrifugací, byly prováděny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kontaminace mikrosomální frakce cytolem byla vyloučena analýzou laktátdehydrogenasové aktivity, která v mikrosomech není přítomna.

3.4. Purifikace neznámého enzymu

3.4.1. Solubilizace mikrosomů

Mikrosomální frakce byla opatrně rozmrazena v ledové lázni. Poté byl přidán shodný objem solubilizačního pufru, skládajícího se z 10mM fosfátového pufru (tvořený smícháním Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4), 1mM EDTA, 1M NaCl, 40% glycerolu (v/v) a 1% (w/v) detergentu Triton X-100 o výsledném $\text{pH } 7,4$. Směs byla mírně míchána v ledové lázni po dobu 45 minut a následně centrifugována v ultracentrifuze Sorvall s rotorem TST 60.4 (DuPont, USA) při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 38000 otáček za minutu po dobu 60 minut.

3.4.2. Odsolení mikrosomů

Odsolování bylo prováděno na chromatografickém přístroji ÄKTApurifier. Pětimililitrové kolony HiTrap Desalting (GE Healthcare, Švédsko) byly promyty puftrem A (20mM Tris-HCl, $\text{pH } 8,0$, 10% glycerol (v/v) a 1,98% Triton X-100). Následně byly nanášeny solubilizované mikrosomy. Odsolování probíhalo při průtoku $1,5\text{ ml/min}$ a průběh byl sledován pomocí absorpance při 280 nm a měřením vodivosti. Odsolené mikrosomy byly koncentrovány ve zkumavkách Amicon Ultra-15 10K (Millipore, USA) při 5000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.3. Separace na Q sepharose

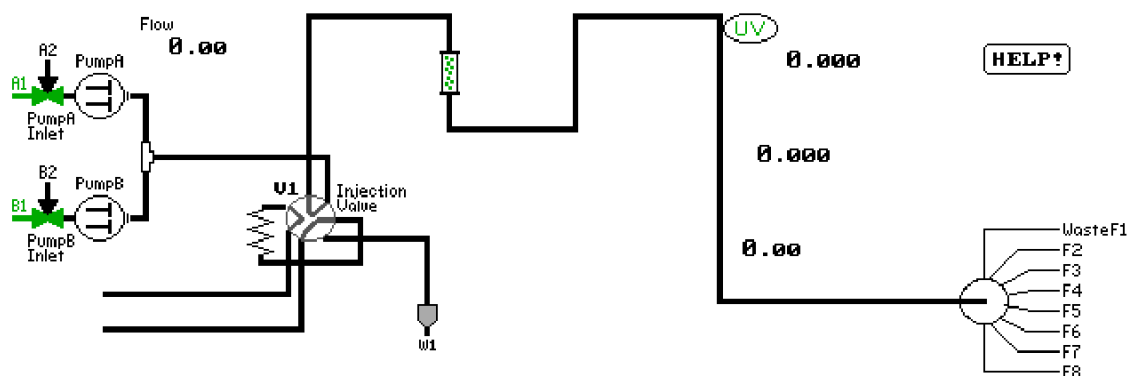
Chromatografická kolona HiTrap Q Sepharose FF 1ml (GE Healthcare, Švédsko), byla promyta puřrem A (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% glycerol (v/v) a 1,98% Triton X-100). Puřr B pro vymývání kolony se skládal z puřru A a 1M NaCl. Průtok byl udržován na 0,5 ml/min. Po nanesení koncentrovaných a odsolených mikrosomů byla kolona promývána dle následujících podmínek. V první části (0-7 ml) byla kolona promývána pouze puřrem A, ve druhé části (7-19 ml) byl použit gradient s puřrem B, kdy docházelo k postupnému nárůstu koncentrace NaCl až do výše 0,5M (50 % puřru B). Ve třetí části (19-23 ml) došlo k postupnému zvýšení koncentrace NaCl do maximální výše 1 M (100 % puřru B). V závěrečné části (23-29 ml) byla kolona promývána pouze puřrem B. Jednotlivé frakce o objemu 1 ml byly sbírány automatickým sběračem frakcí. Průběh separace byl sledován měřením absorbance při 280 nm a 254 nm a měřením konduktivity. Aktivita ve frakcích byla testována inkubacemi s oracinem.

3.4.4. Separace pomocí hydrofobně-interakční chromatografie

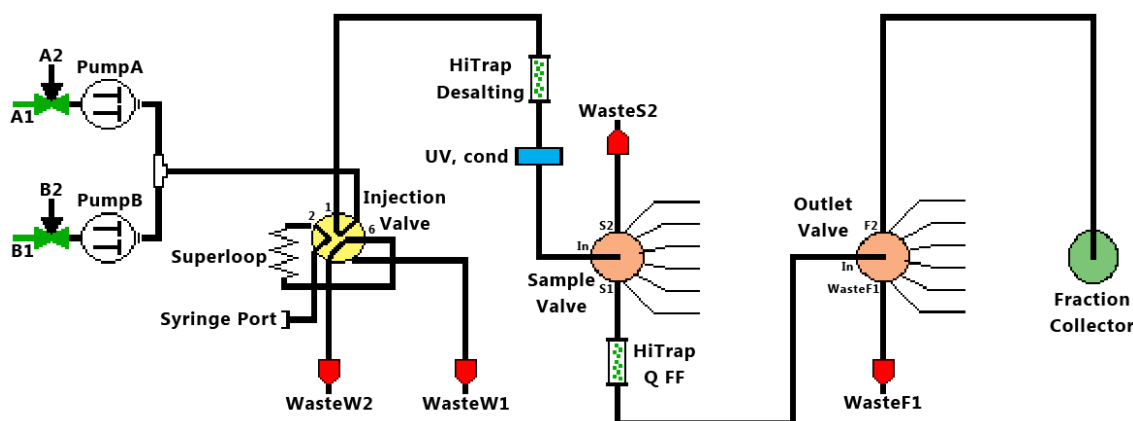
Frakce získaná separací na Q sepharose, která vykazovala největší aktivitu ve smyslu tvorby enantiomeru (+)-DHO, byla použita pro následné jednotlivé separace na kolonách HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) 1 ml, HiTrap Octyl Sepharose FF 1 ml a HiTrap Phenyl Sepharose HP 1 ml (GE Healthcare, Švédsko). Pro separaci byly použity následující puřry: puřr C (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% glycerol (v/v), 1M síran amonný, 0,11% Triton X-100 (w/v)) a puřr D (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% glycerol (v/v), 0,11% Triton X-100 (w/v)). Průtok byl nastaven na 1 ml/min. Kolona byla promyta puřrem C a poté byla nanesa vybraná frakce z Q sepharosy. V první fázi (0-5 ml) byla kolona promývána pouze puřrem C. Následně v druhé části (6-20 ml) byla sniřována koncentrace síranu amonného k nule (100 % puřru D). Ve třetí části (21-30 ml) byl použit pouze puřr D. Frakce o objemu 1 ml byly sbírány automatickým sběračem frakcí. Průběh separace byl sledován měřením absorbance při 280 nm a 254 nm a měřením konduktivity. Aktivita ve frakcích byla testována inkubacemi s oracinem.

3.4.5. Optimalizace purifikačního procesu

Využitím plného potenciálu chromatografického systému ÄKTApurifier lze dosáhnout významného sniřžení ztráty enzymové aktivity a to sloučením tří kroků purifikačního procesu – odsolení solubilizovaných mikrosomů, koncentrace odsolených mikrosomů a separace na Q sepharose. Schéma původního a optimalizovaného procesu přibližuje Obrázek 5 a Obrázek 6.



Obrázek 5 – Původní nastavení systému ÄKTApurifier, které umožňuje použití pouze jedné chromatografické kolony.



Obrázek 6 – Optimalizované nastavení systému ÄKTApurifier, které slučuje dva následné separační kroky, vyřazuje koncentrování vzorku a tím minimalizuje ztráty enzymatické aktivity.

Pufry použité v optimalizovaném postupu jsou shodné jako u postupu klasického – pufr A (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% glycerol (v/v) a 1,98% Triton X-100) a pufr B (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% glycerol (v/v) a 1,98% Triton X-100, 1M NaCl). Před zahájením jsou zvoleny hodnoty (limit absorbance UV 280 nm, limit vodivosti, objem nástřiku, počet opakování), podle kterých bude separace probíhat. Solubilizované mikrosomy jsou automaticky dávkovány a nanášeny na odsolovací kolonu HiTrap Desalting 5 ml. Odsolování probíhá shodným způsobem jako klasické odsolování (viz výše). Dle nastavených hodnot poté dochází ke směrování odsoleného vzorku přímo na kolonu HiTrap Q Sepharose FF 1 ml a sbírání 1ml frakcí automatickým sběračem. Při dokončení nástřiku solubilizovaných mikrosomů se místo odsolovací kolony zapojí kolona s Q sepharosou. V této fázi pak probíhá klasická separace na Q sepharose (viz výše).

3.5. Inkubace frakcí s vybranými substráty

3.5.1. Inkubace s oracinem

Karbonylreduktasová aktivita byla zjišťována inkubacemi s oracinem následným způsobem. Inkubace probíhala v 1,5ml mikrozkuvkách Eppendorf tvořené 5 µl mikrosomů, respektive

20 μl (frakce Q sepharosa) nebo 50 μl (frakce Phenyl sepharosa), 20 μl NADPH-regeneračního systému (konečná koncentrace: 0,8mM NADP^+ , 12mM glukosa-6-fosfátu, 0,35 jednotek glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3mM MgCl_2) a doplněno do 90 μl 0,1M fosfátovým pufrům (pH 7,4, tvořený smícháním Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4). Po pětiminutové preinkubaci při 37 °C byla reakce odstartována přidáním 10 μl 5mM roztoku oracinu. Reakce byla udržována při 37 °C po dobu 30 minut, poté byla ukončena přidáním 40 μl 26% roztoku amoniaku a zchlazením na 0 °C. Produkty reakce byly extrahovány 15minutovým vytřepáváním do 1 ml ethylacetátu. Celá směs byla poté centrifugována 2 minuty při 13000 otáčkách. Extrakt byl odebrán a odpařen při 30 °C pod vakuem. Odparek byl následně rozpuštěn v 250 μl mobilní fáze a analyzován pomocí HPLC (3.6.1). Pro vyloučení neenzymatické přeměny byly současně inkubovány kontrolní reakce.

Kinetika byla zjišťována třemi paralelními inkubacemi s oracinem v koncentraci od 0,05 do 0,8mM a následným měřením vzniklého produktu DHO na HPLC. Kinetické konstanty byly vypočítány programem GraphPad Prism 5,0.

3.5.2. Inkubace s antracykliny

Inkubace probíhaly v 1,5 ml mikrozkuvkách Eppendorf v celkovém objemu reakční směsi 100 μl skládající se z 5 μl mikrosomů, respektive 20 μl částečně purifikovaného enzymu, 20 μl NADPH-regeneračního systému (konečná koncentrace: 0,8mM NADP^+ , 12mM glukosa-6-fosfátu, 0,35 jednotek glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3mM MgCl_2) doplněných 0,1M fosfátovým pufrům (pH 7,4, tvořený smícháním Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4). Po pětiminutové preinkubaci při 37 °C byla reakce zahájena přidáním 10 μl 1mM roztoku doxorubicinu, daunorubicinu nebo idarubicinu. Po 60 minutách byla reakce ukončena 40 μl 26% roztoku amoniaku a zchlazením na 0 °C. Metabolity byly extrahovány 15minutovým vytřepáváním do 1 ml ethylacetátu (v případě doxorubicinu 2x1ml). Celá směs byla poté centrifugována 2 minuty při 13000 otáčkách. Extrakt byl odebrán a odpařen při 30 °C pod vakuem. Odparek byl následně rozpuštěn v 250 μl mobilní fáze a analyzován pomocí HPLC (3.6.2). Neenzymatické přeměny byly kontrolovány současnou inkubací kontrolních vzorků (stejná příprava i proces, ale bez přítomnosti enzymu).

Kinetika byla zjišťována třemi paralelními inkubacemi s doxorubicinem, daunorubicinem nebo idarubicinem v koncentraci od v koncentraci od 0,02 do 1,0mM v případě karbonylreduktasy a 0,04 do 1,3mM v případě mikrosomů a následným měřením vzniklých produktů na HPLC. Kinetické konstanty byly vypočítány programem GraphPad Prism 5,0.

3.6. Analýza metabolitů

3.6.1. Metabolity oracinu

Množství vzniklého dihydrooracinu bylo měřeno pomocí HPLC Agilent 1100 Series (Santa Clara, USA) složeného z gradientové pumpy, autosampleru, degasseru, kolonového modulu s termostatem a fluorescenčním detektorem. Byla použita metoda podle *Wsol et al. (1996)* – kolona BDS Hypersil C18 250×4 mm, 5 μm; mobilní fáze skládající se z 10mM hexansulfonanového pufru s 0,04mM triethylaminem, celkové pH 3,27 a acetonitrilu v poměru 25:75 (v/v); průtok 1,5 ml/min; fluorescenční detekce excitace/emise: 340/418 nm.

Chirální poměr (+)-DHO a (-)-DHO byl analyzován dle *Wsol et al. (1999)* – kolona Chiralcel OD-R 240×4,6 mm; mobilní fáze skládající se z 0,3M chloristanu amonného, pH 3,0 a acetonitrilu v poměru 31:69 (v/v); průtok 0,5 ml/min; fluorescenční detekce excitace/emise: 340/418 nm.

3.6.2. Metabolity antracyklinů

Doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAUN) a idarubicin (IDA), jejich redukované metabolity doxorubicinol (DOXOL), daunorubicinol (DAUNOL) a idarubicinol (IDAOL), aglykony doxorubicinon (ADOX), daunorubicinon (ADAUN) a idarubicinon (AIDA) a redukované aglykony doxorubicinolon (ADOXOL), daunorubicinolon (ADAUNOL), a idarubicinolon (AIDAOL) byly měřeny na HPLC Agilent 1100 Series (Santa Clara, USA) složeného z gradientové pumpy, autosampleru, degasseru, kolonového modulu s termostatem a fluorescenčním detektorem s využitím metody podle *Maudens et al. (2008)* – kolona Discovery C18, 150×4 mm, 5 μm s chránicí kolonou; mobilní fáze A (0,1% kyselina mravenčí v ultradestilované vodě), mobilní fáze B (0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu); gradient začínal na 24 % mobilní fáze B, následované postupným zvyšováním množství mobilní fáze B o 0,86 %/min po 7 minut a poté zvyšováním fáze B o 4 %/min; fluorescenční detekce excitace/emise: 480/555 nm.

3.7. Měření koncentrace bílkoviny

Koncentrace bílkoviny v mikrosomální frakci byla měřena metodou BCA (bicinchoninic acid). Množství částečně purifikované karbonylreduktasy bylo měřeno mikrometodou CBB-AS (Coomassie Brilliant Blue – ammonium sulphate) dle *Georgiou et al. (2008)*.

3.8. SDS elektroforéza

Solubilizované mikrosomy, odsolené koncentrované mikrosomy a vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Použitý 1,5mm Tris-glycinový gel se skládal z 12% (w/v) separačního gelu a 4% (w/v) zaostřovacího gelu. Vzorky byly smíchány s 5× koncentrovaným vzorkovým pufrům (150mM Tris-HCl, 6% (w/v) SDS, 18% (w/v) glycerol,

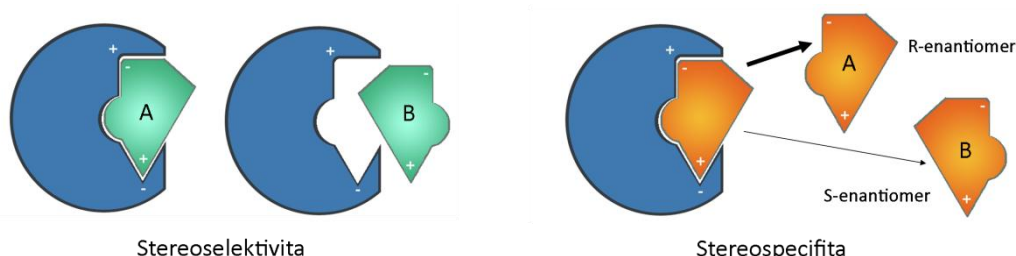
3% (w/v) merkaptoetanol, 0,012% (w/v) bromfenolová modř) v poměru 4:1. Elektroforéza probíhala v Mini-Protean sadě (BioRad, USA) při 100 V (zaostřování), respektive při 200 V (separace). Gel byl obarven metodou Sweet Silver Stain kompatibilní s MS analýzou podle Chevallet et al. (2008), kde stříbro bylo redukováno ribosou.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Stereospecifita jako unikátní charakteristika určující enzym

Chiralita je vlastnost, která zásadně ovlivňuje chování a osud velkého množství endogenních látek, např. aminokyseliny, cukry, ale také látek xenobiotických, např. ibuprofen, warfarin. Tyto látky mohou být buď přímo chirální, kdy tvoří páry enantiomerů, nebo se může jednat o látky prochirální, ze kterých se biochemickými procesy mohou látky chirální stát. Poměr enantiomerů, vznikajících právě při přeměnách látek s prochirální skupinou, se nazývá enzymová stereospecifita (Obrázek 7). Tato hodnota pak představuje charakteristickou konstantu pro každý pár enzym-substrát a je stejně jedinečná a významná jako kupříkladu Michaelisova konstanta.

Stereospecifita je vlastnost aditivní a u celých frakcí je pak dána součtem stereospecifit všech enzymů, které jsou v dané frakci přítomny a které se účastní přeměny vybrané prochirální látky. Jestliže je stereospecifita celé frakce rozdílná od součtu stereospecifit všech známých enzymů, je jisté, že musí existovat nějaký další enzym nebo enzymy účastnící se metabolismu dané látky. Společně s mohutným rozvojem technik, které umožňují studium chirálních látek, lze znalosti o stereospecifitě s výhodou využít při hledání nových enzymů a bylo tomu tak i při hledání neznámé karbonylreduktasy purifikované naší pracovní skupinou.



Obrázek 7 – Grafické zobrazení termínů stereoselektivita a stereospecifita s preferencí jednoho enantiomeru. Látky A a B jsou enantiomery a nelze je volnou otáčivostí navzájem zaměnit.

Níže popsaná vybraná xenobiotika byla v *in vitro* experimentech částečně nebo velmi dobře prozkoumána a jsou proto známy hodnoty stereospecifit enzymů či celých subcelulárních frakcí, které je přeměňují.

4.1.1. Xenobiotika s „jednoznačným“ metabolismem

Cimetidin

Tato látka je známa jako antagonist histaminového H₂ receptoru a používá se při léčbě žaludečního vředu. Již v roce 1993 bylo potvrzeno, že na prochirálním centru dochází k oxidaci na dva enantiomery cimetidin-S-oxidu. V případě prasete byla nalezena shoda poměru

vznikajících enantiomerů pro mikrosomální frakci a FMO1. Podobného výsledku bylo dosaženo při experimentu s lidskými mikrosomy a FMO3 (Cashman et al. 1993). Je tedy téměř jisté, že se v lidském organismu nenachází žádný další enzym, který by byl zodpovědný za oxidační metabolismus cimetidinu. Nelze samozřejmě vyloučit, že může docházet k zpětné redukci oxidovaných metabolitů a tím k určitému ovlivnění hodnot stereospecifity, ovšem tato oblast nebyla doposud prozkoumána.

Alkyl-p-tolyl sulfidy

Látky z této skupiny ve své struktuře obsahují prochirální centrum a jejich oxidací dochází podobně jako u cimetidinu ke tvorbě sulfoxidů. Na rozdíl od něj se však jedná nikoliv o léčiva, ale o modelové látky sloužící k identifikaci oxidas ze skupiny FMO a CYP450. Při správně zvolené sadě alkyl-p-tolyl sulfidů lze jednoznačně určit, které FMO či CYP450 se účastní oxidačních reakcí (Tabulka 19). Byla tak prokázána kupříkladu účast na těchto reakcích u CYP2B4 v králičích plicních mikrosomech (Rettie et al. 1994; Rettie et al. 1995).

Tabulka 19 – Porovnání stereospecifit králičích mikrosomů a vybraných králičích enzymů při oxidaci methyl- a ethyl-p-tolyl sulfidů.

Frakce/Enzym	(R)/(S)-methyl-p-tolyl sulfoxid	(R)/(S)-ethyl-p-tolyl sulfoxid
Plicní mikrosomy ^a	73/27	69/31
FMO2	100/0	91/9
CYP2B4	19/81	20/80
CYP4B1	Metabolity nebyly detekovány	
Jaterní mikrosomy ^b	97/3	97/3
FMO1	98/2	98/2
FMO3	50/50	52/48
FMO5	Metabolity nebyly detekovány	

^a – králičí plicní mikrosomy obsahují pouze oxidasy FMO2, CYP2B4 a CYP4B1

^b – králičí jaterní mikrosomy obsahují pouze oxidasy FMO1, FMO3 a FMO5

Výše uvedená data celkem jednoznačně dokazují, že stereospecifita je významná vlastnost a že ji lze použít k identifikaci dalších enzymů. Ovšem je třeba vzít v potaz případnou účast reduktas, které mohou zasáhnout do případné zpětné konverze metabolitů na mateřskou látku. Bohužel tato oblast je podobně jako u cimetidinu neprozkoumána.

Benzimidazolová anthelmintika

Tato skupina látek a obzvláště albendazol a fenbendazol je v dnešní době hojně používána při léčbě parazitárních onemocnění u zvířat. Primární cestou biotransformace albendazolu je reverzibilní oxidace na dva enantiomery albendazolsulfoxidu (ABZSO) následovaná

ireverzibilní oxidací na albendazolsulfon za přítomnosti FMO a CYP450. Fenbendazol je podobně jako albendazol reverzibilně oxidován na dva enantiomery oxfendazolu (OFZ) a poté ireverzibilně na fenbendazolsulfon (Moroni et al. 1995; Rawden et al. 2000; Velik et al. 2005; Virkel et al. 2004).

Tabulka 20 – Přehled stereospecifit dobytčích jaterních enzymatických systémů.

Frakce/Enzym	(+)/(-)-albendazolsulfoxid	(+)/(-)-oxfendazol
Mikrosomy	72/28	77/23
FMO	100/0	89/11
CYP450	11/89	22/78

Z předložených výsledků lze vyvodit závěry, že FMO tvoří výhradně, respektive převážně (+)-ABZSO a (+)-OFZ a CYP450 (-)-ABZSO a (-)-OFZ (Tabulka 20). Opět to ukazuje důležitost stereospecifity pro charakteristiku enzymů. Je zřejmé, že by bylo vhodnější uvést poměry enantiomerů pro jednotlivé FMO a CYP450, avšak tyto informace jsou v dnešní době stále neznámé.

NNK

Ketolátka s názvem 4-methylnitrosoamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon neboli NNK, která je přítomna v tabáku, zvyšuje pravděpodobnost propuknutí nádorového bujení v plicích a slinivce (Upadhyaya et al. 2000). NNK ve své struktuře obsahuje keto skupinu podléhající reakci katalyzované karbonylredukujícími enzymy, při které vznikají enantiomery chirálního alkoholu NNAL (4-methylnitrosoamino-1-(3-pyridyl)-1-butanol) se zachovaným karcinogenním účinkem. Provedené experimenty ukázaly, že u (*S*)-NNAL je tento účinek mnohem vyšší než u (*R*)-NNAL. Proto byly změřeny stereospecifity u cytosolických karbonylreduktas CBR1, CR2, AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4 zodpovědných na danou přeměnu (Breyer-Pfaff et al. 2004; Trushin et al. 2008; Upadhyaya et al. 1999). Porovnáním s hodnotami u jaterní cytosolické frakce, ve které je rovněž tvořen převážně (*S*) enantiomer, lze usoudit, že buďto není jiný žádný další cytosolický enzym upřednostňující tvorbu druhého z enantiomerů nebo případně další enzymy také katalyzují tvorbu (*S*) enantiomeru (Tabulka 21).

Tabulka 21 – Chirální poměry tvorby metabolitu NNK v lidských játrech.

Frakce/Enzym	(R)/(S)-NNAL
Cytosol I.	90/10
Cytosol II.	95/5
CBR1	96/4
CR2	96/4
AKR1C1	99/1
AKR1C3	96/4
AKR1C4	94/6
Mikrosomy I.	64/36
Mikrosomy II.	30/79
HSD11B1	65/35

Zatímco znalost stereospecifit cytosolických enzymů je dobrá, u mikrosomální frakce tomu tak není. Do nynější doby byla známa pouze jediná karbonylreduktasa metabolizující xenobiotika a to HSD11B1. Stereospecifity mikrosomální frakce a právě HSD11B1 se významně liší (Tabulka 21). Proto je zřejmé, že musí existovat, a poslední výzkumy tomu naznačují (nepublikováno), nějaká další neznámá karbonylreduktasa, která vykazuje opačnou stereospecifitu než HSD11B1. Odlišná hodnota u obou mikrosomálních frakcí doposud nebyla objasněna (Breyer-Pfaff et al. 2004; Upadhyaya et al. 2000).

4.1.2. Xenobiotika, stereospecifita a vliv polymorfismu

Fenytoin

Za metabolickou přeměnu antiepileptika fenytoinu jsou v lidském organismu zodpovědné CYP2C9 a také polymorfní CYP2C19. Právě polymorfismus druhého z cytochromů, který zvyšuje množství (*R*) metabolitu, má výrazný vliv na výsledný poměr enantiomerů tvořených v mikrosomech (Bajpai et al. 1996; Yasumori et al. 1999) (Tabulka 22).

Tabulka 22 – Poměry enantiomerů při metabolické přeměny fenytoinu na *p*-HPPH.

Frakce/Enzym	(R)/(S)- <i>p</i> -HPPH
Mikrosomy PM	10/90
Mikrosomy RM	32/68
CYP2C9	12/88
CYP2C19	58/42

PM – pomalí metabolizátoři, *RM* – rychlí metabolizátoři.

V případě fenytoinu se projevuje komplikace, která může falešně naznačovat přítomnost dalšího enzymu v metabolismu xenobiotika, a tou je polymorfismus. Avšak lze ji eliminovat analýzou subcelulárních frakcí od různých jednotlivců.

Bufuralol

Všechny výše uvedené látky se staly enantiomery až po své metabolizaci. Ovšem prochirální centrum mohou obsahovat také sloučeniny, které již enantiomery jsou. Kupříkladu β -blokátor bufuralol ve své struktuře jedno opticky aktivní místo má. V organismu pak dále podstupuje hydroxylaci, čímž vznikají čtyři diastereoizomery ($1''R,R$), ($1''S,R$), ($1''R,S$), ($1''S,S$) (Narimatsu et al. 2002). Podobně jako u fenytoinu je poměr vznikajících enantiomerů závislý na míře exprese metabolických enzymů. Polymorfní CYP2D6 tvoří převážně $1''S$ hydroxyderiváty, zatímco CYP2C19 dává vzniknout produktům $1''R$ (Tabulka 23).

Tabulka 23 – Hodnoty stereospecifit pro enzymy zodpovědné za metabolickou přeměnu bufuralolu.

Frakce/Enzym	$1''(R)/(S)$ -hydroxybufuralol
Mikrosomy I.	17/83
Mikrosomy II.	62/38
CYP2D6	20/80
CYP2C19	80/20

Mikrosomy I. a mikrosomy II. ukazují vliv polymorfismu na chirální poměr tvořených metabolitů.

Je třeba doplnit, že CYP2D6 je hlavní enzym biotransformace bufuralolu, zatímco CYP2C19, CYP1A2 a CYP3A4 mají zřejmě podstatnější význam pouze u osob s nízkou expresí CYP2D6 (Narimatsu et al. 2003).

4.1.3. Xenobiotika s neúplně známým či neznámým metabolismem

Haloperidol

O enzimech redukujících karbonylovou skupinu tohoto antipsychotika není mnoho známo. Bylo zjištěno, že v lidské jaterním cytosolu je tvořen téměř výhradně (S) enantiomer (Eyles and Pond 1992). Zajímavé je, že poměr enantiomerů v plazmě se významně liší od naprosté převahy (S) formy až po lehkou převahu (R) formy. Protože v cytosolu je tvořen první z nich, je pravděpodobné, že (R) enantiomer je výsledkem redukci v mikrosomech.

Oxkarbazepin

Toto proléčivo ve své struktuře obsahuje ketoskupinu, která je v organismu redukována, čímž dojde ke vzniku dvou aktivních a antiepilepticky působících enantiomerů (Grant and Faulds

1992). Bylo zjištěno, že v plasmě se nachází převážně (*S*) forma (Flesch et al. 2011). Ačkoliv se jedná o zajímavou oblast výzkumu, nejsou do dnešní doby popsány ani subcelulární frakce ani reduktasy, které tuto reakci katalyzují, ani hodnoty stereospecifit pro vznikající enantiomery.

Benfluron, dimefluron

Jedná se o látky s potenciálně antineoplastickým účinkem (Miko et al. 1991). Karbonylová skupina přítomná v molekule je redukována na dva enantiomery (Kucera et al. 2005; Nobilis et al. 1991; Skalova et al. 2002). Vzhledem k faktu, že se tyto látky z různých důvodů nadále neprosadily, nejsou známy karbonyl redukující enzymy ani stereospecifity, které by se účastnily jejich redukce.

Flobufen

Flobufen je sloučenina ze skupiny nesteroidních antiflogistik. Podobně jako bufuralol ve své molekule obsahuje jedno chirální centrum a další prochirální centrum. Toto prochirální centrum je reprezentováno karbonylovou skupinou, která je redukována, čímž vznikají čtyři diastereoizomery dihydroflobufenu (DHF). Bylo zjištěno, že DHF vzniká v potkaní jaterní mikrosomální frakci, avšak ani v tomto případě nejsou známy žádné další informace o metabolizujících enzymech (Kvasnickova et al. 1999; Skalova et al. 2003).

4.1.4. Shrnutí významu stereospecifity jako vlastnosti enzymů

Předložené příklady rozdílných stereospecifit vybraných párů enzym-xenobiotikum ukazují, že se jedná o důležitou a unikátní vlastnost. Porovnáním hodnot stereospecifit celých frakcí s již známými enzymy lze až na výjimky vcelku jednoduše určit, zda je možná existence ještě nějakého dalšího potenciálního enzymu, který vybrané xenobiotikum přeměňuje. U některých výše uvedených látek (4.1.1) byly právě tímto způsobem nalezeny další enzymy, které se jejich metabolismu účastní. U dalších (4.1.2) je nutno počítat s případným polymorfismem již popsaných metabolizujících enzymů, kdy naměřené hodnoty mohou falešně ukazovat na jiný neznámý enzym. A některé z látek (4.1.3) stále ještě čekají na objev „svých enzymů“. Výše uvedený seznam zcela jistě není úplný, protože velké množství xenobiotik, která se v dnešní době vyskytují v okolí člověka a jejichž metabolickou přeměnou vznikají enantiomery, není detailněji prozkoumáno.

Výhoda znalosti stereospecifity se projeví v okamžiku, kdy je jeden ze vznikajících enantiomerů více účinný, či naopak více toxický pro organismus. Vhodným použitím inhibitoru nebo induktoru enzymu, který tvoří daný enantiomer, lze docílit výhodnějšího terapeutického indexu případné léčby.

Všechny výše uvedené příklady ukazují, že metodou založenou na purifikaci studovaného biologického materiálu (játra, ledviny a další) dle hodnot stereospecifity, je možné dosáhnout izolace potenciálně nového a neznámého enzymu.

4.2. Purifikace nové lidské jaterní membránově vázané karbonylreduktasy

Jak již bylo přiblíženo v úvodu této práce, lidské jaterní membránově vázané karbonylreduktasy endoplasmatického retikula hrají důležitou roli v metabolismu endogenních látek. Stejně tak tomu může být v případě biotransformace látek xenobiotických. V dnešní době je popsána zatím pouze jedna mikrosomální karbonylreduktasa, která má vliv na metabolismus xenobiotik. Jedná se o HSD11B1, která redukuje potenciální antineoplastikum oracin na dihydrooracin (DHO). Oracin je prochirální látka, jejíž redukcí mohou vznikat dva enantiomery (+)-DHO a (-)-DHO. V případě lidské HSD11B1 je stereospecifita tvorby DHO výrazně přikloněna k (-)-DHO, kterého vzniká 76 %. Avšak poměr enantiomerů (+):(-) v lidské mikrosomální frakci je odlišný a to 40:60 (Wsol et al. 2004). Tento poznatek naznačuje přítomnost nejméně jedné další karbonylreduktasy, jejíž stereospecifita je posunuta k tvorbě (+)-DHO. V kapitole 4.1 byly předloženy příklady, kdy rozdíly mezi stereospecifitami mezi již známými enzymy a celými subcelulárními frakcemi vedly k popsání dalšího enzymu. Proto byla přeměna oracinu na DHO zvolena jako prostředek sloužící k purifikaci nového enzymu.

Vývoj molekulárně-biologických metod se významně podepsal na způsobu získávání izolovaných enzymů. Původní postup, kterým je purifikace z tkání, je postupně nahrazován analýzou cDNA knihoven a následnou rekombinantní přípravou enzymu. Vzhledem k tomu, že o předpokládané mikrosomální karbonylreduktase (NCR) nebylo známo dostatečné množství informací, které by dovolilo použití druhého způsobu, byla použita metoda purifikace z lidské jaterní tkáně. Samotné purifikaci předcházela analýza metod, které byly využity při izolaci jiných membránově vázaných enzymů (Tabulka 24). Bez ohledu na dobu, kdy byl enzym purifikován, či nadroдинu, do které se enzym řadí, lze pozorovat téměř shodné postupy, které zahrnovaly solubilizaci převážně cholátem sodným a následně použití hydrofobně-interakční chromatografie (HIC) s navazující iontově-výměnnou chromatografií (IEX).

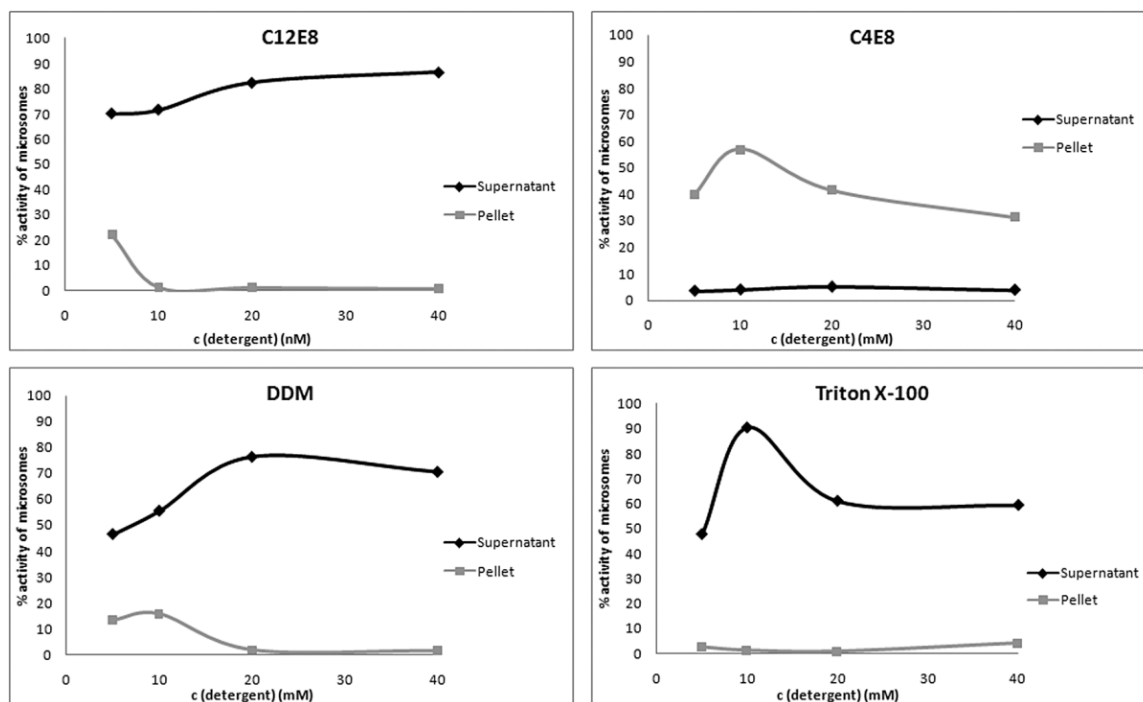
Tabulka 24 – Vybrané lidské membránově vázané enzymy izolované z tkání.

Enzym	Solubilizace	Purifikační metoda	Reference
CYP2C9	Cholát sodný	HIC – Oktyl sepharosa AnEX – DEAE sepharosa IEX – Hydroxylapatit	Haining et al. (1996)
CYP3A4	Cholát sodný	HIC+AnEX – <i>n</i> -oktylamín sepharosa AnEX – DEAE celuloza KatEx – CM celuloza IEX – Hydroxylapatit	Watkins et al. (1985)
HSD3B1	Cholát sodný	HIC – Fenyl sepharosa IEX – Hydroxylapatit I. IEX – Hydroxylapatit II.	Luu-The et al. (1990)
HSD11B1	Emulgen 913	HIC – Oktyl sepharosa AnEX – Q sepharosa AC – Red sepharosa Gelová filtrace	Maser et al. (2003)

AC – afinitní chromatografie, AnEX – aniontově-výměnná chromatografie, DEAE – diethylaminoethyl, CM – karboxymethyl, HIC – hydrofobně interakční chromatografie, IEX – iontově-výměnná chromatografie, KatEX – kationtově-výměnná chromatografie, Q – kvartérní amonium

4.2.1. Optimalizace solubilizace mikrosomální frakce

Enzymy vázané v membráně mikrosomů vzniklých při zpracování jaterní tkáně musí být pro potřebu následné purifikace uvolněny. Procesem zvaným solubilizace má být dosaženo toho, aby bylo získáno maximální množství potřebných enzymů a současně byla maximálně zachována jejich biologická aktivita. Membránové enzymy díky své hydrofobní povaze nemohou fungovat v běžném vodném prostředí. Při solubilizaci je proto nutné nahradit původní membránu tak, aby si enzym co nejvíce zachoval svou přirozenou strukturu a s ní spojenou enzymovou aktivitu. To je dosaženo použitím detergentů, které „simulují“ původní membránu a tím chrání enzym před okolním prostředím. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím 10mM Tritonu X-100 (poměr bílkovina:detergent 1:2 (w/w)), kdy bylo po solubilizaci zachováno 90 % enzymové aktivity (Skarydova et al. 2009). Přehled použitých detergentů a testovaných koncentrací přibližuje Obrázek 8.



Obrázek 8 – Zachování aktivity při použití různých detergentů. Součet aktivit nedává 100 % z důvodu velmi špatné rozpustnosti pelety (Skarydova et al. 2009).

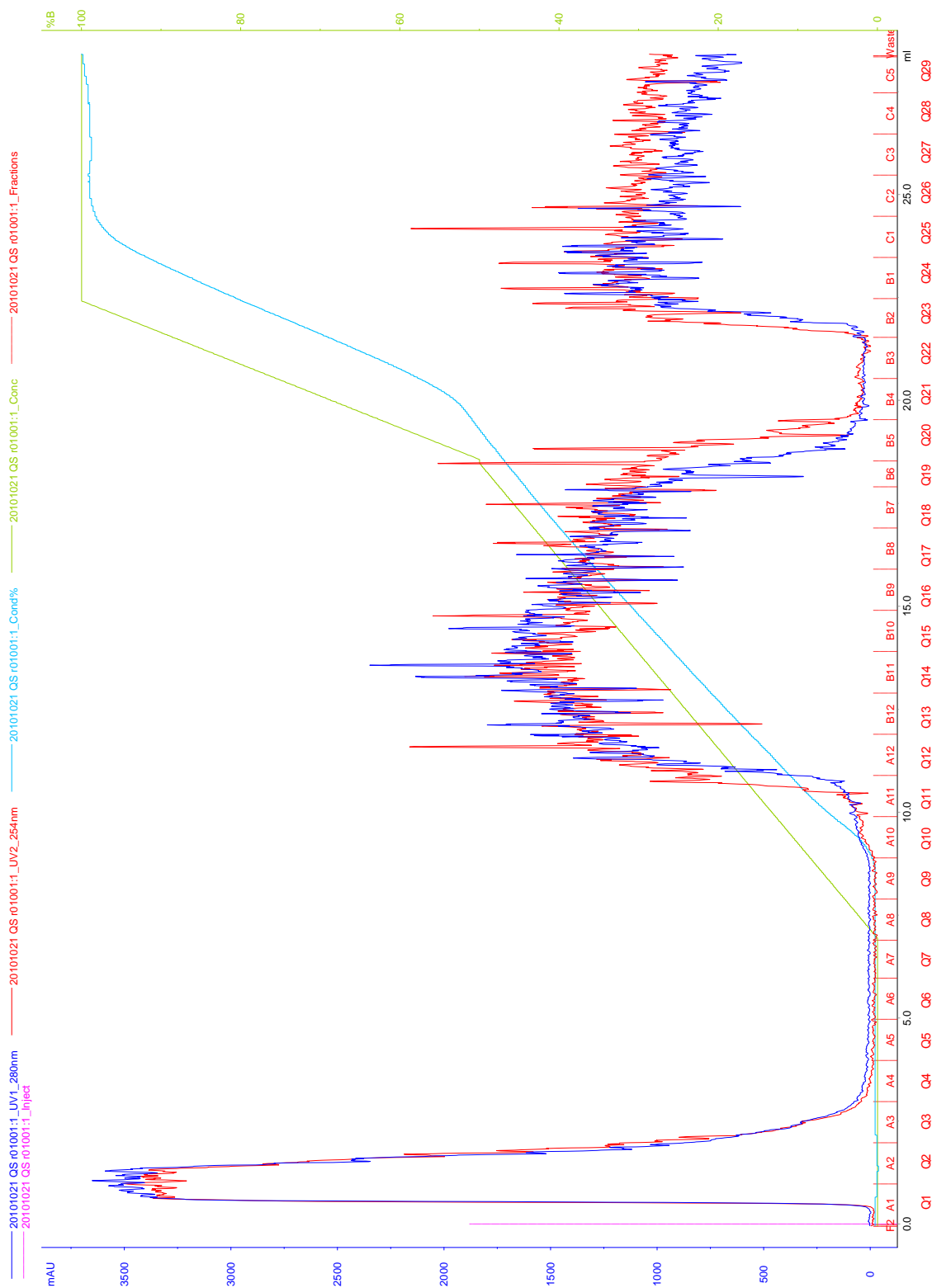
Volbou Tritonu X-100 se tato purifikace liší od postupů u jiných membránově vázaných enzymů (Tabulka 24).

4.2.2. Optimalizace prvního purifikačního kroku

IEX je principem svého fungování více než vhodná pro první purifikační krok, protože chromatografická matrice velmi dobře pracuje i při vysoké koncentraci bílkovin a nečistot v purifikovaném vzorku. Nevýhodou této metody je potřeba nízké až nulové salinity vzorku (GE-Healthcare 2010). Vzhledem k tomu, že mikrosomy jsou v první fázi procesu solubilizovány v roztoku solí a detergentů, je nutné vzorek kompletně odsolit a případně zkoncentrovat, což vede ke ztrátám bílkoviny a biologické aktivity. Samozřejmě se zde nabízelo využít již přítomných solí v roztoku vzorku a dle zavedených postupů místo IEX zařadit HIC, avšak vzhledem k tomu, že by IEX poté byla zařazena ve druhém kroku, odsolení by bylo tak jako tak potřebné.

Odsolený a zkoncentrovaný vzorek byl nanesen na chromatografickou kolonu obsahující matrici Q sepharosu tvořenou polysacharidovým gelem sepharosu s navázanými kladně nabitými ligandy kvartérní amoniové soli, což zaručovalo vazbu záporně nabitých molekul a jejich rozdělení podle síly iontových vazeb. Dle obecných doporučení byly zvoleny pufrы založené na 20mM Tris-HCl (Amersham-biosciences 2004) upravené přidávkem Tritonu X-100 ve stejném poměru bílkovina:detergent 1:2 (w/w) jako v případě solubilizace mikrosomů. Po nanesení vzorku na chromatografickou kolonu a ustálení stavu byla postupně zvyšována

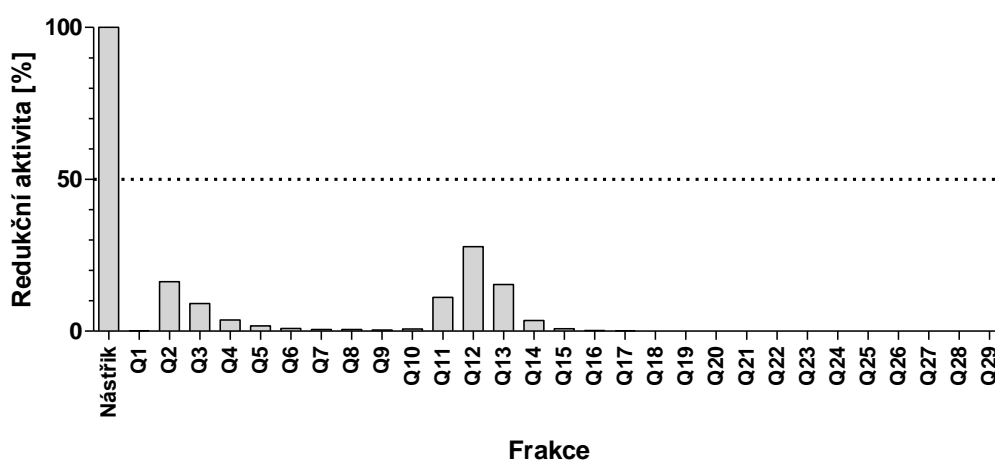
koncentrace chloridu sodného v pufrch až k hodnotě 1M, čímž docházelo k postupnému uvolňování zachycených molekul z kolony. Průběh celého procesu byl opět zvolen dle obecných doporučení (kapitola 3.4.3, Obrázek 9).



Obrázek 9 – Průběh purifikace na Qsepharose. Neobvyklý vzhled křivky absorbance je pravděpodobně způsoben přítomností Tritonu X-100. Jednotlivé frakce mají objem 1 ml.

Tmavomodře – absorbance při 280 nm v mAU, červeně – absorbance při 250 nm v mAU, zeleně – koncentrace elučního pufru B v %, světle modře – vodivost v mS/cm.

V prvních čtyřech frakcích označených Q1-Q4 a souhrnně nazvaných „flow through“ jsou molekuly, které se nezachytily na chromatografickou kolonu. Protože u těchto frakcí byla změřena významná redukční aktivita, byly jednotlivě uchovány při -80 °C pro případný budoucí výzkum. Křivka absorbance u frakcí Q11-Q20 a Q23-Q29 naznačuje přítomnost bílkovin, avšak chromatogram je zřejmě ovlivněn přítomností Tritonu X-100. V každé frakci byla změřena redukční aktivita vůči oracinu a v aktivních frakcích (poměr redukční aktivity ve frakci k celkové redukční aktivitě naneseného vzorku vyšší než 1 %) byla rovněž změřena koncentrace bílkoviny. Aktivitu v jednotlivých frakcích uvádí Obrázek 10.



Obrázek 10 – Redukční aktivita v jednotlivých frakcích po separaci na Q sepharose. Sloupce reprezentují redukční aktivitu ve frakcích vůči celkové redukční aktivitě v nástříku (100 %).

U frakce Q12 lze pozorovat přibližně 4,5násobné zvýšení specifické aktivity, což znamená, že došlo ke zvýšení čistoty dané frakce oproti nástříku. V aktivních frakcích byla také zjištěna stereospecifita redukce (Tabulka 25). Nejvíce aktivní frakce s hledaným poměrem (+)-DHO:(-)-DHO pak byla vybrána pro další purifikační krok.

Tabulka 25 – Stereospecifita redukčně aktivních frakcí po klasické purifikaci na Q sepharose.

Frakce	Specifická aktivita [nmol.mg ⁻¹ .30min ⁻¹]	Chirální poměr (+)-DHO/(-)-DHO
OKM	17,7	84,4/15,6
Q2	7,1	83,0/17,0
Q3	9,0	87,7/12,3
Q4	7,9	88,7/11,3
Q5	7,8	87,7/12,3
Q11	52,7	84,9/15,1
Q12	80,0	88,3/11,7
Q13	35,8	88,0/12,0
Q14	8,9	85,3/14,7

Tučně je označena frakce použitá v druhém purifikačním kroku.

OKM – Solubilizované, odsolené a koncentrované mikrosomy

Rovněž byly zjištěny ztráty biologické aktivity po každém kroku. Byla změřena redukční aktivita v čistých mikrosomech, v solubilizovaných mikrosomech a odsolených koncentrovaných mikrosomech. Tyto aktivity pak byly porovnány s celkovou aktivitou všech frakcí po purifikaci na Q sepharose. Jak uvádí Tabulka 26, aktivita významně klesá hlavně během odsolování a koncentrování vzorku. Tento pokles je zřejmě způsoben zachytáváním částí vzorků na stěny zkumavek použitých k purifikacím a také na membránu koncentračních zkumavek. Vzhledem ke vzácnosti výchozího materiálu bylo více než vhodné tyto ztráty snížit na minimum.

Tabulka 26 – Zachování redukční aktivity v průběhu purifikace.

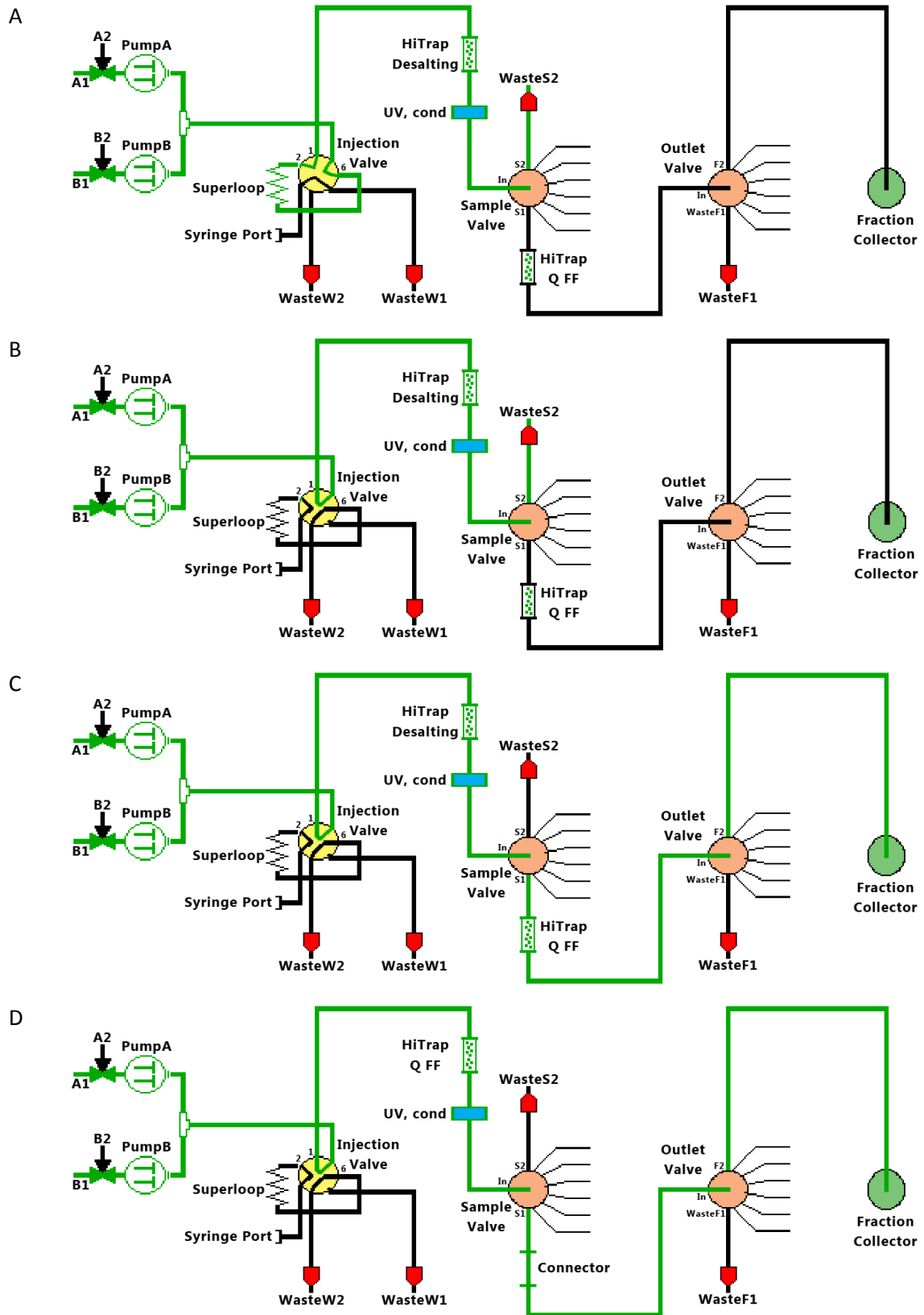
Frakce	Aktivita vůči M [%]	Aktivita vůči SM [%]
M	100,0	-
SM	66,1	100,0
OM	37,5	56,7
OKM	32,1	48,6
QS	24,4	36,9

M – mikrosomy, SM – solubilizované mikrosomy, OM – odsolené solubilizované mikrosomy, OKM – koncentrované odsolené solubilizované mikrosomy, QS – celková redukční aktivita všech frakcí po separaci na Q sepharose

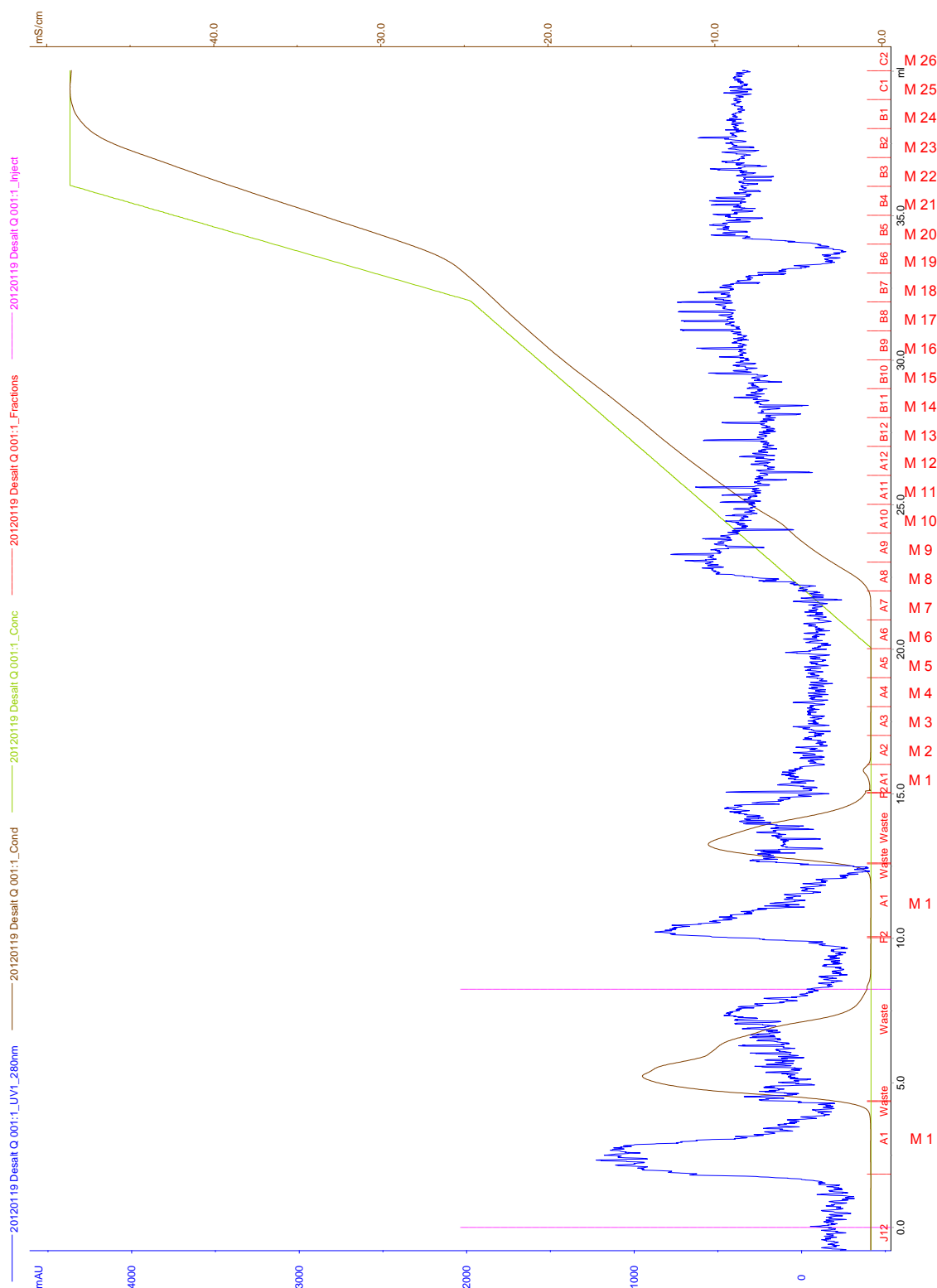
Jak již bylo uvedeno výše, k největším ztrátám docházelo během odsolování a koncentrování solubilizovaných mikrosomů. Oba tyto kroky byly prováděny ručně. Odsolené solubilizované mikrosomy byly odebírány do frakčních zkumavek, které byly následně převedeny do koncentrační zkumavky a zahušťovány centrifugací.

Chromatografický systém ÄKTApurifier přítomný na pracovišti je však možno nastavit tak, že lze tyto dva kroky spojit s purifikací na Q sepharose. Celý proces poté probíhá následujícím způsobem. Na počátku jsou nastaveny hraniční hodnoty UV absorbance při 280 nm a hraniční hodnoty vodivosti, společně s objemem a počtem nástřiků (kapacita odsolovací kolony je omezena nanášeným objemem 1,5 ml). Po spuštění metody je naneseno zvolené množství solubilizovaných mikrosomů a systém čeká, dokud nedojde k vzestupu absorbance UV nad zvolenou hranici. Jakmile k tomu dojde, přepne se systém tak, aby byl vzorek ihned a bez mezikroku nanášen na Q sepharosu. Současně se sbírá nezachycená část po Q sepharose v kolektoru frakcí. Tento stav trvá, dokud nedojde k vzestupu vodivosti nad zvolenou hranici. Při dosažení této hranice se systém přepne zpět a vzorek je směřován do odpadní nádoby. V tomto stavu pak systém přetrvává do poklesu vodivosti pod zvolenou hranici. Popsaný postup je pak opakován podle počtu nastavených nástřiků.

Jakmile jsou solubilizované mikrosomy kompletně naneseny, je vhodné kvůli sledování UV absorbance odstranit odsolovací kolonu a na její místo přesunout kolonu s Q sepharosou. Pak již proces probíhá stejným způsobem jako klasická purifikace na Q sepharose. Schéma optimalizovaného procesu přibližuje Obrázek 11 a příklad chromatogramu Obrázek 12.



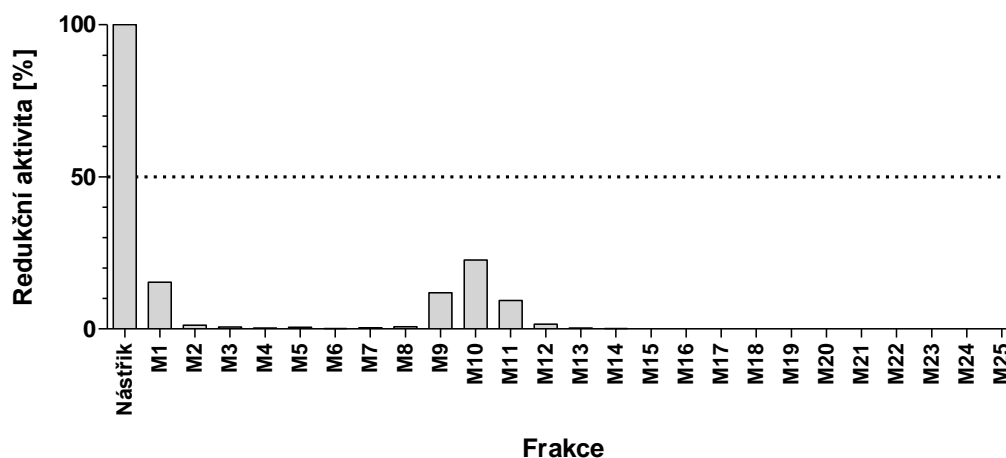
Obrázek 11 – Průběh optimalizované purifikace. A – nástřik vzorku, B – čekání na vstoup UV absorbance, C – odsolování vzorku a jeho okamžité nanášení na Q sepharosu, D – Následná purifikace na Q sepharose, která je přesunuta na původní pozici odsolovací kolony.



Obrázek 12 – Chromatogram optimalizovaného procesu purifikace. V levé části dochází k nástřiku vzorku a jeho odsolování. V pravé části je již klasická purifikace na Q sepharose. Frakce M2 až M26 mají objem 1 ml. Modře – absorbance při 280 nm v mAU, zeleně – koncentrace elučního pufru B v %, hnědě – vodivost v mS/cm, fialově – jednotlivě nástřiky vzorku.

Ve frakcích M1 až M25 byla změřena redukční aktivita (Obrázek 13). Kromě frakce M1, která obsahuje téměř kompletní „flow through“ část vzorku, je pak další průběh purifikace na

Q sepharose zcela shodný, kdy frakce Q11–Q14 odpovídají frakcím M9–M12 včetně chirálních poměrů tvořeného DHO.



Obrázek 13 – Redukční aktivita v % vyjádřena vůči nástříku (100 %).

Porovnáním redukčních aktivit obou postupů bylo dosaženo významného nárůstu redukční aktivity u optimalizované purifikace a to o 77 % (Tabulka 27).

Tabulka 27 – Srovnání redukční aktivity klasického a optimalizovaného prvního purifikačního kroku.

Frakce	Klasický postup – aktivita		Optimalizovaný postup – aktivita	
	Vůči M [%]	Vůči SM [%]	Vůči M [%]	Vůči SM [%]
M	100,0	-	100,0	-
SM	66,1	100,0	70,8	100,0
OKM	32,1	48,6	-	-
QS	24,4	36,9	46,2	65,3

M – mikrosomy, SM – solubilizované mikrosomy, OKM – koncentrované odsolené solubilizované mikrosomy, QS – Q sepharosa celkem. Rozdílná aktivita u solubilizace mikrosomů je dána biologickou podstatou vzorku.

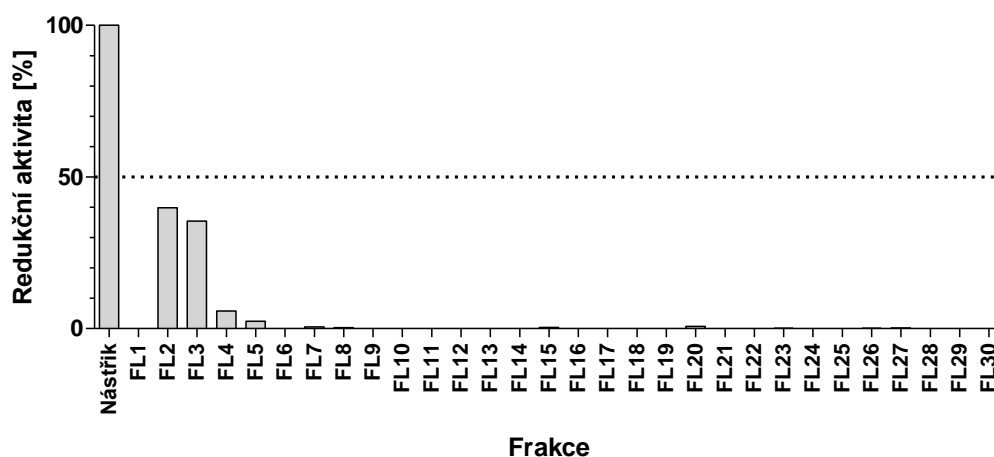
I přes optimalizaci tohoto procesu se může zdát, že ztráta aktivity je příliš výrazná. Srovnáním s purifikačním postupem u HSD11B1, u kterého došlo k poklesu redukční aktivity při použití kolony s náplní Q sepharosa o 50 % (Maser et al. 2003), se tato ztráta naopak ukazuje jako nízká (pokles o 35 %).

4.2.3. Optimalizace druhého purifikačního kroku

Dle dostupných zdrojů se jako druhý purifikační krok (intermediate purification) doporučuje použití hydrofobně-interakční chromatografie (HIC) (GE-Healthcare 2010). Tato metoda je svým principem výhodná pro enzymy, jejichž struktura obsahuje vyšší počet hydrofobních míst,

a proto se rovněž hodí pro purifikace membránově vázaných enzymů. Pro HIC je dostupný širší výběr chromatografických kolon lišících se buďto navázaným ligandem, např. fenyl, butyl, butyl-S, oktyl, hustotou navázaného ligandu nebo hustotou matrice. Obecně nelze vybrat kolonu s ligandem tvořícím nejsilnější hydrofobní vazby (obvykle fenyl), protože metoda je silně závislá na vlastnostech purifikovaného enzymu. Pro prvotní optimalizaci byly vybrány kolony HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF (low sub), HiTrap Octyl Sepharose 4 FF a HiTrap Phenyl Sepharose HP, aby byla pokryta co nejširší škála dostupných kolon. V používaných pufrch byla přítomna limitní koncentrace 1M síranu amonného, který patří mezi látky nejvíce zesilující hydrofobní vazby. Vyšší koncentrace již nebylo možno použít z důvodu možné precipitace bílkovin. Jakékoliv změny teploty ani pH nebyly možné z důvodu ztráty biologické aktivity. Frakcí nejvhodnější pro druhý purifikační krok byla frakce Q12 klasické purifikace, což odpovídá frakci M10 optimalizované purifikace. Chromatogramy druhého purifikačního kroku nejsou prezentovány, protože rozdíly v zastoupení proteinů ve frakcích nejsou vzhledem k jejich nízké koncentraci viditelné.

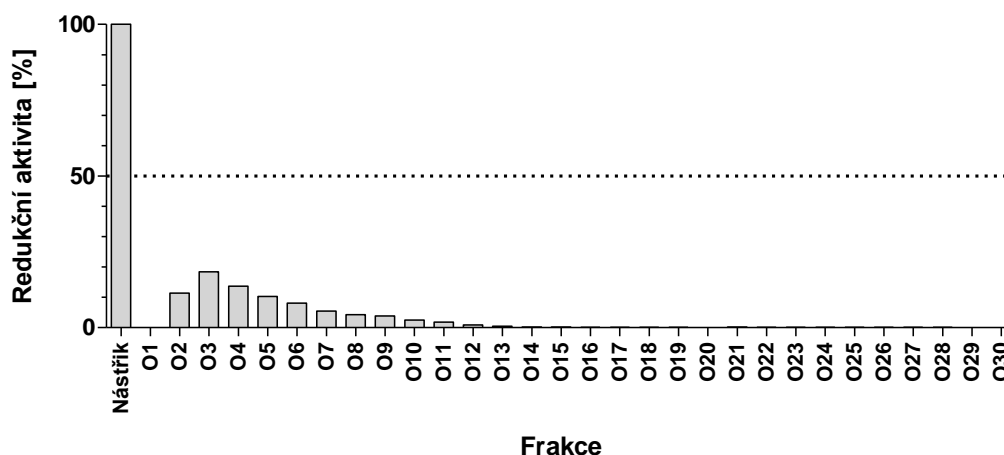
Fenyl, který je součástí kolony HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF low sub (dále jen kolona FL) patří mezi ligandy s nejsilnějšími hydrofobními vlastnostmi. Po provedené purifikaci s FL kolonou byla změřena redukční aktivita ve všech frakcích (Obrázek 14).



Obrázek 14 – Rozložení redukční aktivity ve frakcích v případě použití kolony FL.

Většina redukční aktivity byla získána ve frakcích FL2-FL4 patřící do „flow through“. Z těchto výsledků je zřejmé, že nedošlo k zachycení reduktas na koloně. Proto byla kolona FL označena jako nevyhovující pro druhý separační krok.

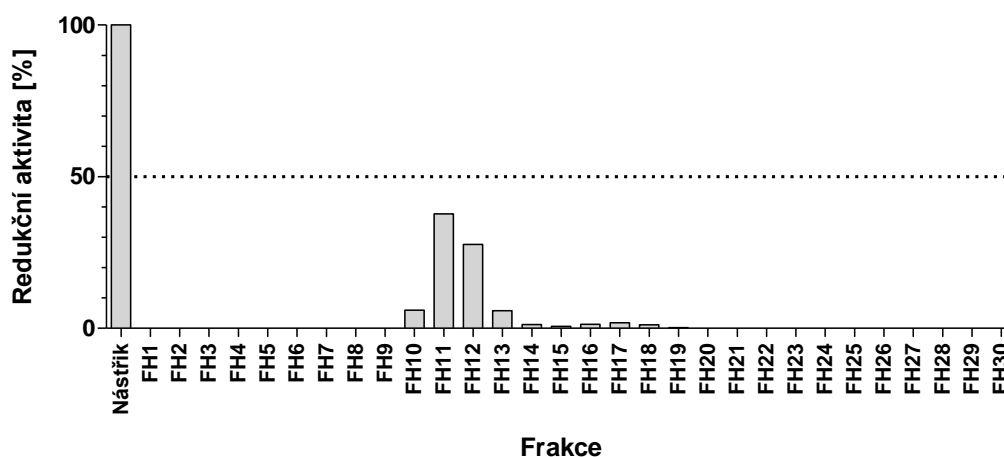
Druhým použitým typem byla kolona HiTrap Octyl Sepharose 4 FF (dále jen kolona O) s navázaným oktylovým ligandem. Opět byla změřena redukční aktivita v každé získané frakci (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Purifikace na koloně O.

Při purifikaci na koloně O již došlo k částečnému navázání reduktas, avšak i tato vazba je nedostatečná, protože většina aktivity je opět přítomna ve „flow through“ frakcích O2-O6.

Vzhledem k tomu, že již nebylo možné zesílit hydrofobicitu vazeb, byla použita kolona HiTrap Phenyl Sepharose HP (dále jen kolona FH), která obsahuje stejný ligand jako kolona FL. Avšak substrát kolony FH je mnohem hustší s póry o velikosti 34 μm , oproti koloně FL s 90 μm póry. Tímto byl zajištěn pravděpodobněji a delší kontakt vzorku s ligandy. Výsledky měření aktivit ve frakcích uvádí Obrázek 16.



Obrázek 16 – Purifikace na koloně FH.

Na výše uvedeném obrázku lze vidět, že již došlo k zachycení reduktas na koloně a jejich separaci dle síly hydrofobních vazeb při postupném snižování koncentrace síranu amonného. Proto byla v aktivních frakcích zjištěna stereospecifita tvorby DHO (Tabulka 28). Specifická aktivita byla zjišťována pouze ve frakci FH11 s nejvyšší aktivitou enzymu, protože měření koncentrace bílkoviny vyžadovalo časově náročnou přípravu materiálu z důvodu přítomnosti rozdílného množství síranu amonného.

Tabulka 28 – Stereospecifita tvorby DHO po druhém purifikačním kroku na FH.

Frakce	Chirální poměr (+)-DHO/(-)-DHO
FH10	89,2/10,8
FH11	89,5/10,5
FH12	89,5/10,5
FH13	88,7/11,3

Frakce FH11 vykazovala největší aktivitu a zároveň byl chirální poměr silně ve prospěch tvorby (+)-DHO. Vzhledem k získaným výsledkům byla kolona FH zvolena jako vhodná pro druhý purifikační krok.

Ztráty redukční aktivity během použití všech tří chromatografických kolon nebyly příliš výrazné a pohybovaly se od 10 do 18 %, což lze srovnáním s purifikací HSD11B1 pomocí HIC považovat za výborný výsledek (pokles aktivity o 46 %) (Maser et al. 2003).

4.2.4. Shrnutí purifikace neznámé karbonylreduktasy

Během purifikačního postupu byl získán vzorek obsahující částečně přečištěnou membránově vázanou karbonylreduktasu. Optimalizací všech kroků – solubilizace mikrosomů, první separace a druhá separace – bylo získáno maximální možné množství proteinu s maximálně zachovanou redukční aktivitou na úrovni 54,5 % aktivity solubilizovaných mikrosomů, což lze považovat za dobrý výsledek. V případě membránové HSD11B1 bylo po dvou krocích zahrnujících HIC a IEX zachováno pouze 27,8 % redukční aktivity solubilizovaných mikrosomů (Maser et al. 2003). Bohužel ve srovnání není možné uvést hodnoty u purifikací dalších lidských mikrosomálních karbonylreduktas z důvodů neuvedení těchto hodnot (případ HSD3B1) nebo použití rekombinantních technik namísto klasické purifikace z tkání (ostatní mikrosomální SDR).

Stupeň čistoty proteinu mimo jiné udává hodnota specifické aktivity, což je aktivita enzymu vztažená na množství bílkoviny. Jestliže specifická aktivita stoupá, dochází ke zvyšování čistoty. Celkový souhrn jednotlivých purifikačních kroků včetně důležitých veličin uvádí Tabulka 29.

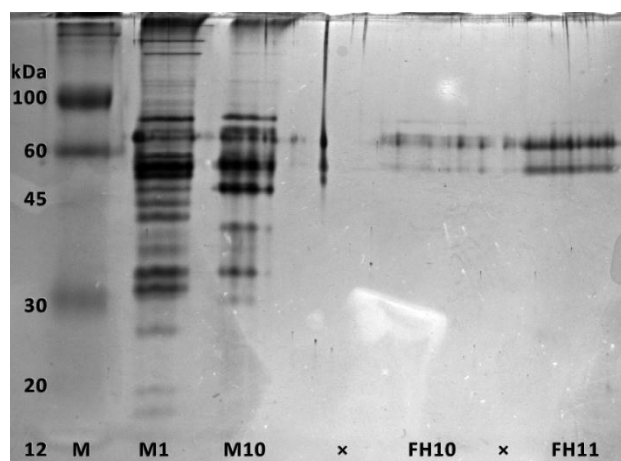
Hodnota stereospecifity u frakce FH11 je odlišná od již uvedených výsledků (Tabulka 28), protože se jedná o další nezávislý experiment.

Tabulka 29 – Shrnutí purifikace neznámé karbonylreduktasy.

Frakce	Specifická aktivita [nmol.mg ⁻¹ .30min ⁻¹]	Přečištění [x]	Stereospecifita (+)-DHO/(-)-DHO	Zachování redukční aktivity
M	10,0	-	40,0/60,0	-
SM	16,2	1,6	-	100 %
Frakce M10	139,0	13,9	87,2/12,8	65,3 %
Frakce FH11	283,0	28,3	88,0/12,0	54,5 %

M – mikrosomy, SM – solubilizované mikrosomy

Po dvou purifikačních krocích byla získána již velice čistá neznámá karbonylreduktasa, s vysokou aktivitou, avšak s nízkou koncentrací potřebnou pro dokončení její plné charakterizace. Čistota byla ověřena elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s následným barvením Sweet silver stain (Obrázek 17), která je pouze kvalitativní, avšak je schopna detekovat proteiny do úrovně 1 ng/proužek. Ve frakci FH11 jsou jasně viditelné dva proužky o velikosti kolem 60 kDa. Jejich původ je neznámý, avšak objevují se pouze v souvislosti s metodou Sweet silver stain. Žádné další proužky již nejsou viditelné. Lze proto předpokládat, že přítomná karbonylreduktasa je vysoce aktivní i v extrémně nízkých koncentracích.



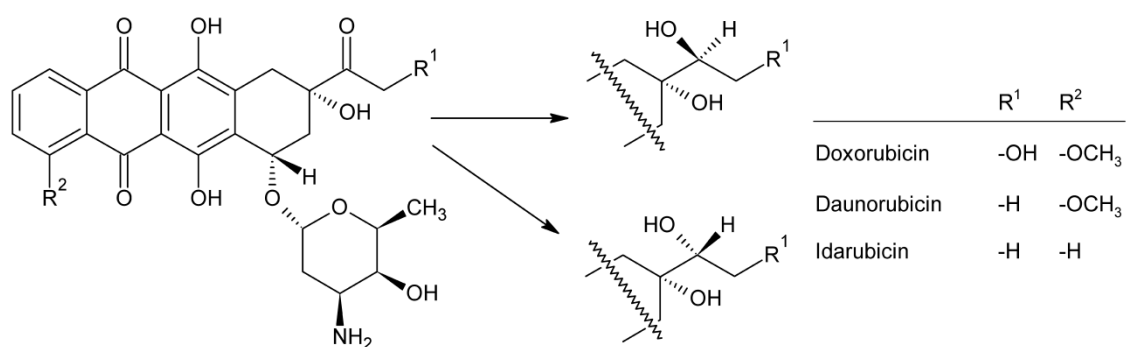
Obrázek 17 – SDS polyakrylamidový gel obarvený metodou Sweet silver. M – molekulový marker, M1 – „flow through“ frakce prvního kroku, M10 – frakce prvního kroku použitá pro další purifikaci, FH10 – frakce 10 druhého kroku, FH11 – nejvhodnější frakce po druhém kroku.

Pro další purifikační krok, např. gelová chromatografie nebo afinitní chromatografie, či detekci pomocí hmotnostní spektrometrie je nutno použít mnohem větší množství výchozího materiálu. Koncentrace proteinu je však dostatečná pro ověření redukce karbonylové skupiny u vybraných substrátů.

4.3. Ověření účasti mikrosomálních enzymů na metabolismu vybraných antineoplastik

HSD11B1 byla v době, kdy byla tato práce vytvářena, experimentálně potvrzena jako jediný mikrosomální membránově vázaný enzym, který se účastní metabolismu látek obsahujících karbonylovou skupinu. V souvislosti s vlastnostmi neznámé karbonylreduktasy (dále jen NCR), která byla získána postupem uvedeným v sekci 4.2, a kinetickými parametry vůči oracinu, kdy K_m je přibližně 5krát nižší a V_{max} přibližně 30krát vyšší než u HSD11B1 a které jsou zároveň řádově na úrovni cytosolických enzymů (Skarydova et al. 2009; Wsol et al. 2004), bylo více než vhodné ověřit také další substráty s karbonylovou skupinou. Vzhledem k tomu, že oracin je potenciální antineoplastikum, byla ze stejné skupiny vybrána skupina látek nazvaná antracykliny.

Antracykliny (ANT), mezi které patří dnes běžně používané protinádorové látky doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAUN) a idarubicin (IDA), mají na své struktuře přítomnu karbonylovou skupinu (Obrázek 18). Bylo potvrzeno, že v lidském organismu je tato skupina látek redukována cytosolickými karbonylreduktasami CBR1 (Kassner et al. 2008) a CBR3 (Bains et al. 2010b), což má v případě DOX a DAUN za následek vznik méně aktivních (Soldan et al. 1996) a kardiotoxických metabolitů (Forrest et al. 2000; Olson et al. 2003; Olson et al. 1988). Dosud publikované experimenty se zabývají pouze enzymy cytosolickými i přes to, že v mikrosomech již byla doložena přítomnost karbonylredukcujících enzymů. Proto byla prověřena účast purifikované mikrosomální reduktasy a lidské jaterní mikrosomální frakce na přeměnách ANT.



Obrázek 18 – Karbonylová skupina na molekule antracyklinů podléhající redukci na sekundární alkohol.

NCR i mikrosomální frakce byly nejprve podrobeny inkubacím s DOX, DAUN a IDA, aby bylo zjištěno, zdali dochází k redukci jednotlivých substrátů. Dle naměřených hodnot, které ověřily přítomnost redukováných antracyklinů, pak byl zvolen rozsah koncentrací antracyklinů mezi 20 a 1000 μM , respektive 40 a 1200 μM pro zjištění kinetického profilu. Vybrané hodnoty se na první pohled mohou jevit jako vysoké, avšak publikované výzkumy ukazují, že koncentrace

látek mohou v leukemických buňkách dosáhnout až 140 μ M v případě DAUN (Bogason et al. 2009) a až 10 μ M v případě DOX (Muller et al. 1993). Nelze samozřejmě vyloučit, že tyto koncentrace jsou v jiném typu buněk mnohem vyšší. Kinetické parametry byly vypočítány metodou dle Michaelis-Mentenové (K_m a V_{max}) a metodou sigmoidální kinetiky (zdánlivá K_m a V_{max}). Pro každý z testovaných ANT bylo zjištěno množství všech redukovaných a hydrolyzovaných metabolitů.

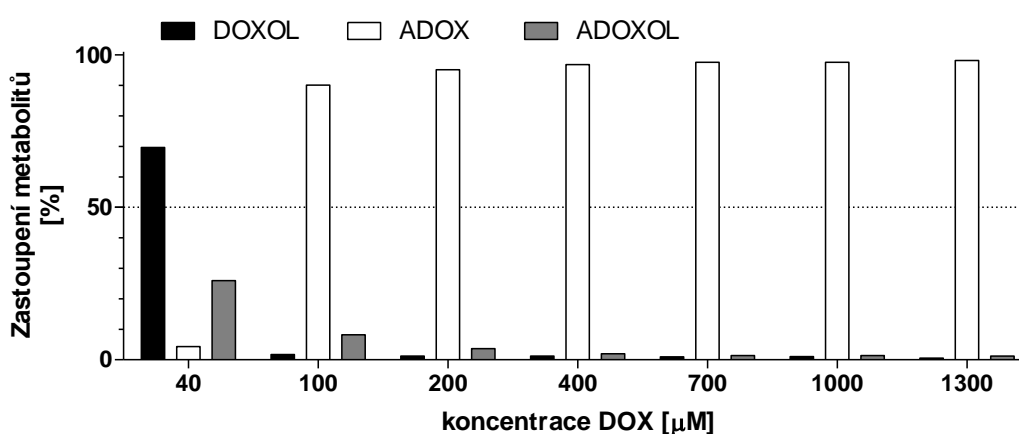
4.3.1. Doxorubicin

4.3.1.1. Neznámá karbonylreduktasa (NCR)

Ačkoliv bylo vyzkoušeno více koncentrací DOX v inkubační směsi, nebyla v případě NCR zjištěna žádná redukce DOX na DOXOL.

4.3.1.2. Jaterní mikrosomy

Analýzou metabolitů, které vznikly inkubacemi DOX s mikrosomy, bylo oproti původním předpokladům zjištěno, že redukce na DOXOL v lidských jaterních mikrosomech nemusí být hlavní cestou biotransformace DOX. Výsledky ukazují, že při koncentracích vyšších než 100 μ M zcela převažuje hydrolytický rozklad DOX za vzniku aglykonu ADOX (Obrázek 19).



Obrázek 19 – Procentuální zastoupení metabolitů DOX vznikajících v mikrosomech. DOX – doxorubicin, DOXOL – doxorubicinol, ADOX – aglykon doxorubicinu, ADOXOL – aglykon doxorubicinolu.

Tvorba ADOX v mikrosomální frakci byla předpokládána již v sedmdesátých letech 20. století (Loveless et al. 1978) a potvrzena v pozdější době (Licata et al. 2000). Enzymy zodpovědné za tuto přeměnu – mikrosomální hydrolasy – jsou striktně specifické vůči DOX, protože případná reakce zastoupena hydrolýzou redukovaného DOXOLu na ADOXOL byla vyloučena inkubacemi mikrosomů s DOXOL. DOX i ADOX jsou si strukturně velmi podobné látky. Ovšem díky menší molekule ADOX se dá očekávat jeho vyšší afinita k vazebným místům karbonylredukujících

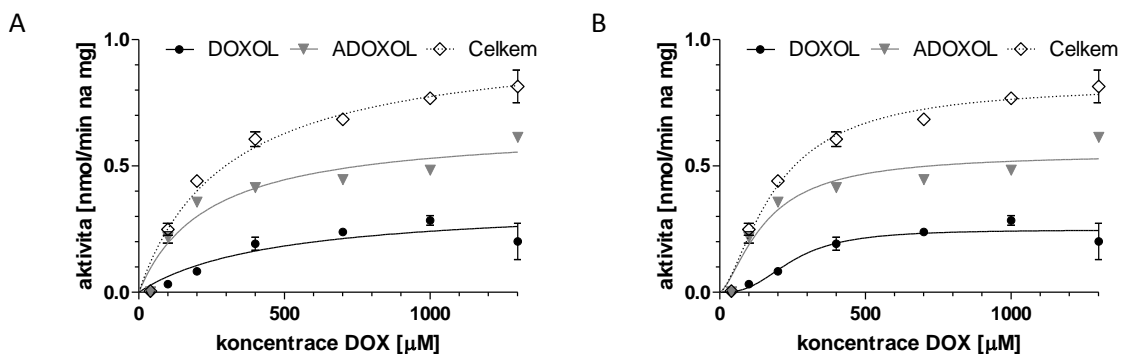
enzymů, což může výrazně ovlivnit kinetiku redukce DOX. Kinetické konstanty byly vypočítány pro obě redukční reakce – DOX na DOXOL a ADOX na ADOXOL – z hodnot získaných ze tří paralelních inkubací a shrnuje je Tabulka 30.

Tabulka 30 – Kinetické parametry pro redukci DOX v mikrosomech.

Substrát	K_{mm}/K_{ms} [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Hillův koeficient
Kinetika dle Michaelis-Mentenové				
DOX	467±249	0,354±0,076	0,0008	-
ADOX	237±51	0,656±0,044	0,0028	-
DOX+ADOX	304±53	1,009±0,060	0,0033	-
Sigmoidální kinetika				
DOX	248	0,248±0,025	0,0010	2,70±1,19
ADOX	155	0,550±0,038	0,0036	1,50±0,33
DOX+ADOX	193	0,825±0,044	0,0043	1,53±0,23

Konstanta K_{mm} a K_{ms} jsou ekvivalentem Michaelisovy konstanty K_m pro jednotlivý enzym. Konstanta K_{ms} pro sigmoidální kinetiku je vyjádřena z rovnice $K_{prime} = K_{ms}^h$, kde K_{prime} a h byly vypočítány programem GraphPad Prism 5. Konstanta CL_{int} vyjadřuje efektivitu enzymatické přeměny a je definována jako poměr V_{max}/K_{mm} , respektive V_{max}/K_{ms} .

Dle hodnot spolehlivosti R^2 je pro výpočet konstant vhodnější použití modelu sigmoidální kinetiky ($R^2 = 0,8010, 0,9188, 0,9626$ proti $R^2 = 0,7405, 0,9091, 0,9480$). Souvisí to také s povahou experimentu, kdy byla použita celá mikrosomální frakce a lze proto předpokládat spolupráci různých enzymových systémů, které se navzájem ovlivňují. Pohled na získaná data a kinetické křivky (Obrázek 20) potvrzuje předchozí domněnku o afinitě DOX a ADOX k vazebným místům enzymů, přičemž ADOX je ve výsledku přeměňován více než třikrát rychleji než mateřská látka DOX.



Obrázek 20 – Kinetika redukce DOX a ADOX A – dle Michaelis-Mentenové, B – sigmoidální. DOX – doxorubicin, DOXOL – doxorubicinol, ADOXOL – aglykon doxorubicinolu, celkem – celková redukční aktivita.

Při nahlédnutí do dostupné literatury bylo zjištěno, že přeměna DOX na DOXOL byla detailněji zkoumána pouze v prsní nádorové buněčné linii MCF-7, avšak vliv mikrosomální frakce byl posouzen jako nepatrný (Gavelova et al. 2008).

Tabulka 31 – Porovnání kinetických konstant redukce DOX v mikrosomální a cytosolické frakci.

Frakce	K_{mm}/K_{ms} [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Literatura
Mikrosomy	248	0,248±0,025	0,001	Skarka et al. (2011)
Cytosol	163±21	0,337±0,061	0,002	Kassner et al. (2008)
Cytosol	275±70	0,167±0,018	0,00061	Loveless et al. (1978)

Konstanta K_{mm} a K_{ms} jsou ekvivalentem Michaelisovy konstanty K_m pro jednotlivý enzym.

Srovnání kinetiky s hodnotami u jaterního cytosolu (Tabulka 31) oproti očekávání neukazuje příliš velký rozdíl mezi oběma subcelulárními frakcemi. Lze se proto domnívat, že mikrosomy hrají v metabolismu DOX mnohem větší roli, než se původně předpokládalo.

4.3.1.3. Souhrn

Redukce DOX na DOXOL v jaterní mikrosomální frakci se ukázala jako velmi významná. Vzhledem k tomu, že aktivita NCR se v tomto případě neprojevila a účast HSD11B1 na této redukci doposud nebyla prokázána, je do budoucna vhodné provést další experimenty objasňující, které enzymy jsou v mikrosomech zodpovědné za redukci karbonylové skupiny u ANT.

Aktivní alternativní cesta biotransformace v mikrosomech, kterou je hydrolyza na ADOX a jeho následná redukce na ADOXOL, také není zanedbatelná. Předchozí výzkum prokázal, že tyto hydrolyzované metabolity jsou nositeli slabšího cytostatického účinku (Dessypris et al. 1988; Soldan et al. 1996), a proto mohou hrát důležitou roli při léčbě nádorových onemocnění a následně vznikající rezistenci.

4.3.2. Daunorubicin

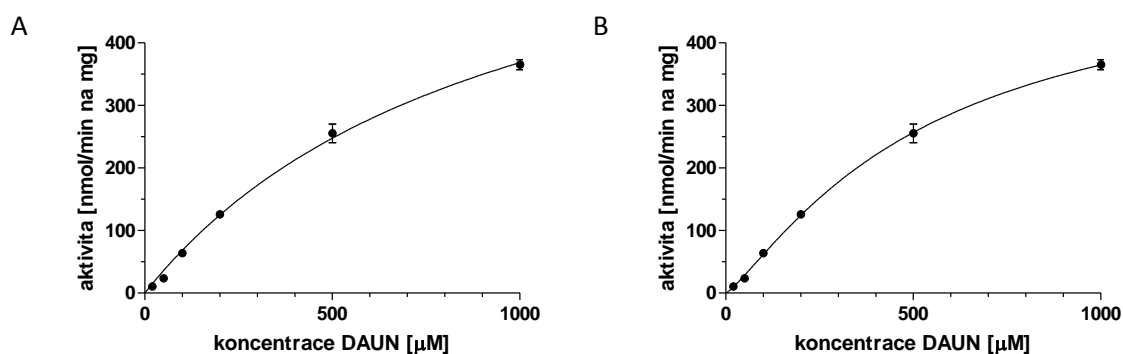
4.3.2.1. Neznámá karbonylreduktasa (NCR)

Enzymová kinetika byla zkoumána v rozsahu koncentrací DAUN mezi 20 a 1000 μM . Hodnoty byly proloženy křivkou dle Michaelis-Mentenové a křivkou sigmoidální kinetiky. Ačkoliv je druhé uvedené proložení vhodnější ($R^2=0,9933$ proti $R^2=0,9910$), hodnota Hillova koeficientu blízká se jedné naznačuje přítomnost pouze jednoho aktivního místa a proto byla kinetika považována za klasickou dle Michaelis-Mentenové (Tabulka 32, Obrázek 21).

Tabulka 32 – Kinetické konstanty pro purifikovanou reduktasu a redukci DAUN na DAUNOL.

Substrát	K_m/K_{ms} [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Hillův koeficient
Kinetika dle Michaelis-Mentenové				
DAUN	954±129	720±27	0,75	-
Sigmoidální kinetika				
DAUN	531	533±56	1,00	1,22±0,10

Konstanta K_{ms} pro sigmoidální kinetiku je vyjádřena z rovnice $K_{prime} = K_{ms}^h$, kde K_{prime} a h byly vypočítány programem GraphPad Prism 5. Konstanta CL_{int} vyjadřuje efektivitu enzymatické přeměny a je definována jako poměr V_{max}/K_{ms} , respektive V_{max}/K_{ms} .



Obrázek 21 – Kinetika redukce DAUN na DAUNOL A – dle Michaelis-Mentenové, B – sigmoidální.

Kinetické parametry pro mikrosomální reduktasy (např. HSD11B1) nejsou známy a proto byly hodnoty vypočítané pro NCR porovnány s cytosolickými karbonylredukcujícími enzymy (Tabulka 33). Ačkoliv je NCR aktivnější než CBR3, její vliv na celkovou redukci DAUN na DAUNOL bude zřejmě velmi malý.

Tabulka 33 – Porovnání kinetických konstant pro karbonylreduktasy účastnící se redukce DAUN.

Enzym	K_m [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Literatura
NCR	954±129	720±27	0,76	Skarka et al. (2011)
CBR1	51±13	3430±241	67,25	Bains et al. (2009)
CBR3	461±25	166±5	0,36	Bains et al. (2010b)
AKR1A1	1200±300	4400±500	3,67	Bains et al. (2008)

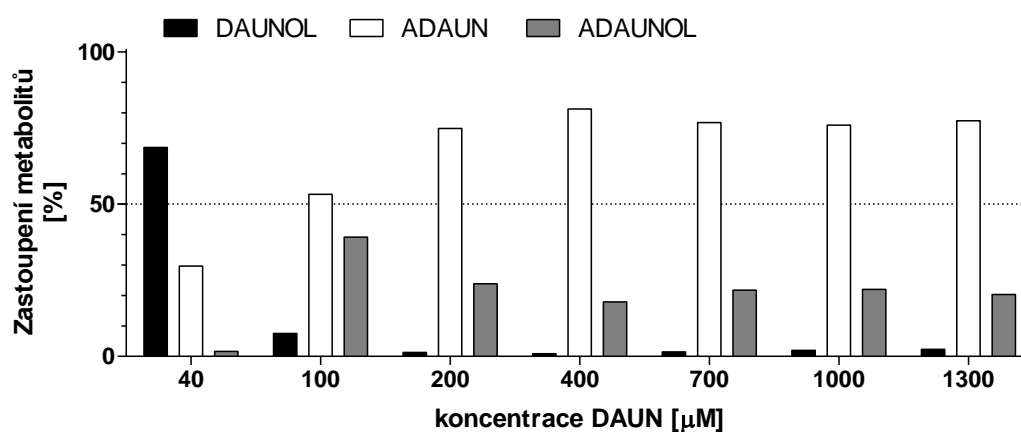
NCR – neznámá mikrosomální karbonylreduktasa

Selektivita enzymu je důležitá vlastnost, při které i malá změna molekuly substrátu může vyústit ve zcela odlišný metabolismus. Přesně tento případ nastává u DAUN, který se od DOX liší pouze nepřítomností hydroxylové skupiny na uhlíku C-14 (Obrázek 18). Právě nepřítomnost

této funkční skupiny má za následek schopnost DAUN navázat se na aktivní místo neznámé karbonylreduktasy. Podobně tomu je také u výše zmíněné karbonylreduktasy AKR1A1, která rovněž nemetabolizuje DOX (Bains et al. 2008).

4.3.2.2. Mikrosomy

Analýzou metabolitů vznikajících při inkubaci mikrosomální frakce s DAUN dochází k podobné situaci, jako v případě DOX. Při použití koncentrace 100 μ M DAUN se hlavní drahou přeměny stává hydrolýza a vzniká aglykon daunorubicinu (ADAUN). Rozdíl je ovšem v mnohem snadnější redukci obou látek DAUN a ADAUN (Obrázek 22), což odpovídá již dlouho známým výsledkům (Loveless et al. 1978). Hydrolýza daunorubicinolu (DAUNOL) na aglykon daunorubicinolu (ADAUNOL) byla stejně jako u DOX vyloučena inkubací DAUNOL s mikrosomální frakcí.



Obrázek 22 – Procentuální poměr metabolitů vzniklých enzymatickou přeměnou DAUN. DAUN – daunorubicin, DAUNOL – daunorubicinolu, ADAUN – aglykon daunorubicinu, ADAUNOL – aglykon daunorubicinolu.

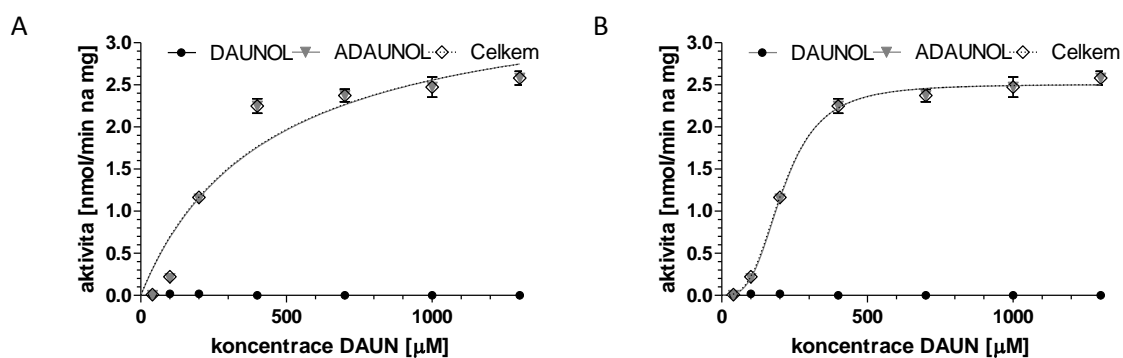
Kinetika redukčních přeměn byla zkoumána stejným způsobem jako u DOX, tzn. redukce DAUN na DAUNOL a redukce ADAUN na ADAUNOL. Získané výsledky ukázaly téměř stoprocentní preferenci jednoho substrátu při vazbě na redukční enzymy, kterým byl ADAUN (Tabulka 34, Obrázek 23).

Tabulka 34 – Kinetické parametry pro redukci DAUN v mikrosomech.

Substrát	K_{mm}/K_{ms} [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Hillův koeficient
Kinetika dle Michaelis-Mentenové				
DAUN	Kinetické konstanty nelze vypočítat			
ADAUN	435 \pm 122	3,668 \pm 0,402	0,0084	-
DAUN+ADAUN	425 \pm 117	3,643 \pm 0,386	0,0086	-
Sigmoidální kinetika				
DAUN	Kinetické konstanty nelze vypočítat			
ADAUN	211	2,507 \pm 0,045	0,0119	3,24 \pm 0,36
DAUN+ADAUN	209	2,510 \pm 0,046	0,0120	3,16 \pm 0,35

Konstanta K_{mm} a K_{ms} jsou ekvivalentem Michaelisovy konstanty K_m pro jednotlivý enzym. Konstanta K_{ms} pro sigmoidální kinetiku je vyjádřena z rovnice $K_{prime} = K_{ms}^h$, kde K_{prime} a h byly vypočítány programem GraphPad Prism 5. Konstanta CL_{int} vyjadřuje efektivitu enzymatické přeměny a je definována jako poměr V_{max}/K_{mm} , respektive V_{max}/K_{ms} .

Pohledem na průběh kinetiky redukce DAUN na DAUNOL lze předpokládat, že tato přeměna je téměř bezvýznamná. I z tohoto důvodu nebylo možné vypočítat kinetické konstanty reakce, a proto jsou v níže uvedené tabulce uvedeny pouze kinetické konstanty pro redukci ADAUN na ADAUNOL. Vzhledem k hodnotám spolehlivosti R^2 je jednoznačně vhodnější použití sigmoidálního proložení ($R^2 = \times, 0,9886$ a $0,9885$) namísto klasického proložení dle Michaelis-Mentenové ($R^2 = \times, 0,9083, 0,9104$). Získaná hodnota Hillova koeficientu převyšující číslo 3,2 naznačuje velmi silné vzájemné ovlivnění mikrosomálních enzymových systémů.



Obrázek 23 – Kinetické křivky pro redukci DOX a ADOX, A – kinetika dle Michaelis-Mentenové, B – sigmoidální kinetika. DAUN – daunorubicin, DAUNOL – daunorubicinol, ADAUNOL – aglykon daunorubicinolu.

Znalosti o kinetice DAUN v lidských tkáních je v dnešní době minimální. Pouze jediná publikace ze 70. let uvádí kinetické hodnoty redukce DAUN v lidském jaterním cytosolu (Loveless et al. 1978). Význam jaterních buněk v metabolismu DAUN u potkanů byl prokázán při experimentu, ve kterém byla uměle navozena porucha jaterní tkáně. V tomto případě došlo ke zpomalení

degradace DAUN v mikrosomech na méně než polovinu původní rychlosti (Choi et al. 2007). I přesto, že nebylo možné získat konstanty pouze pro redukci DAUN a porovnat proto kinetiku mikrosomů a cytosolu, z hodnot celkové redukční aktivity (přeměna DAUN na DAUNOL a ADAUN na ADAUNOL) mikrosomální frakce lze předpokládat její větší důležitost (Tabulka 35).

Tabulka 35 – Porovnání kinetiky redukce DAUN v jaterních mikrosomech a cytosolu.

Frakce	K_m [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Literatura
Mikrosomy	Nebylo možné zjistit			Skarka et al. (2011)
Mikrosomy*	209	2,510 \pm 0,046	0,0120	Skarka et al. (2011)
Cytosol	307 \pm 29	5,070 \pm 0,186	0,017	Loveless et al. (1978)

*– celková redukční aktivita přeměn DAUN a ADAUN v mikrosomech.

4.3.2.3. Souhrn

DAUN se na rozdíl od DOX ukázal jako substrát, který je redukován NCR. Tato reakce však v porovnání s kinetikami u cytosolických karbonylredukcujících enzymů není příliš významná, i když získané parametry mohou v budoucím výzkumu, zaměřeném na další membránové karbonylreduktasy nabyt na důležitosti. Hlavním enzymem redukce DAUN ale pravděpodobně stále zůstane cytosolická CBR1.

Situace v mikrosomální frakci je o poznání složitější. Pokud by byla zjišťována pouze redukce DAUN na DAUNOL, jednoznačně by se dalo usoudit, že vliv této frakce je stejně jako v případě NCR minimální. Celkový pohled na vztahy mezi metabolity ale tento závěr zcela ruší. I při relativně nižších koncentracích DAUN se ukazuje velmi podstatný vliv hydrolas, jejichž zapojením vzniká menší molekula ADAUN. Afinita této látky k vazebným místům redukcujících enzymů řádově přesahuje afinitu mateřského DAUN. Lze se domnívat, že podobná situace může nastat i v organismu. DAUN jako cytostatikum není tak hojně užíván při léčbě a i proto téměř nejsou známy informace o jednotlivých metabolitech a jejich nežádoucích účincích. Pokud by se však potvrdila výše popsaná domněnka, pravděpodobně by zcela narušila nynější předpoklad, že DAUNOL je hlavním metabolitem přeměny DAUN.

4.3.3. Idarubicin

Molekula IDA je oproti DOX změněna v jiné části struktury, která je vzdálenější od karbonylové skupiny na uhlíku C-13 (Obrázek 18). Proto nebyly předpokládány výsledky významně se lišící od výsledků pro DOX.

4.3.3.1. Neznámá karbonylreduktasa (NCR)

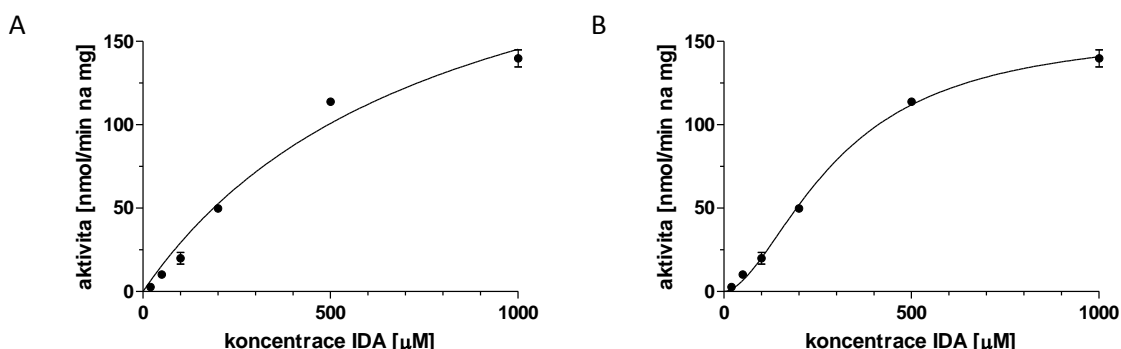
Měření metabolitů vznikajících během inkubace vzorků byla zjištěna přítomnost redukováného IDAOL. Kinetické parametry a průběh uvádí Tabulka 36 a Obrázek 24.

Tabulka 36 – Hodnoty kinetických konstant pro redukci IDA na IDAOL.

Substrát	K_m/K_{ms} [μM]	V_{max} [nmol/min na mg]	CL_{int} [ml/min na mg]	Hillův koeficient
Kinetika dle Michaelis-Mentenové				
IDA	791 \pm 168	260 \pm 30	0,33	-
Sigmoidální kinetika				
IDA	301	158 \pm 7	0,52	1,75 \pm 0,14

Konstanta K_{ms} pro sigmoidální kinetiku je vyjádřena z rovnice $K_{prime} = K_{ms}^h$, kde K_{prime} a h byly vypočítány programem GraphPad Prism 5. Konstanta CL_{int} vyjadřuje efektivitu enzymatické přeměny a je definována jako poměr V_{max}/K_{ms} , respektive V_{max}/K_{ms} .

Je zřejmé, že použití sigmoidální kinetiky je vhodnější než klasické proložení dle Michaelis-Mentenové ($R^2 = 0,9933$ proti $R^2 = 0,9748$). Hodnota Hillova koeficientu blížící se dvěma může vzhledem k úrovni purifikace znamenat, že neznámá karbonylreduktasa je enzym s více doménami.



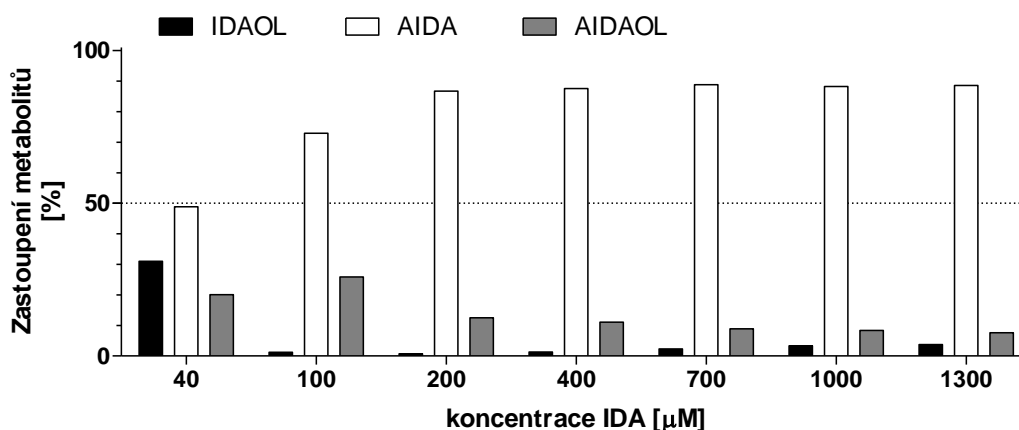
Obrázek 24 – Průběh kinetiky s proložením A – dle Michaelis-Mentenové, B – sigmoidálním. IDA – idarubicinol.

Bohužel získané hodnoty nelze porovnat s jinými, byť i cytosolickými karbonylreduktasami, protože tyto informace doposud nejsou známy.

4.3.3.2. Jaterní mikrosomy

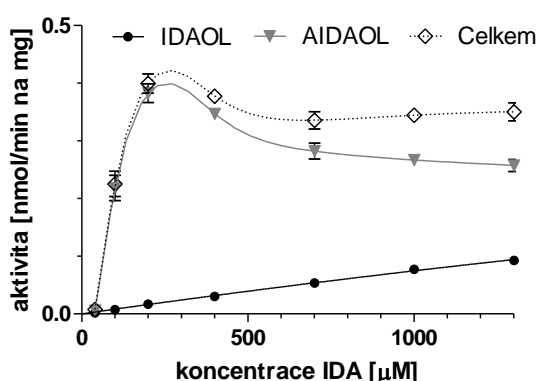
Analýzou metabolitů vzniklých inkubací IDA s mikrosomy byla také prokázána aktivita hydrolas. Na rozdíl od předchozích dvou antracyklinů DOX a DAUN bylo množství vzniklého aglykonu AIDA největší i v případě nejnižší použité koncentrace IDA (Obrázek 25). Přesto, že hydrolyza je v mikrosomech zřejmě hlavní drahou biotransformace IDA, redukční reakce nelze přehlédnout, protože celkový rozsah redukce IDA na idarubicinol (IDAOL) a aglykonu idarubicinu (AIDA) na

aglykon idarubicinolu (AIDAOL) je u nejnižší koncentrace srovnatelně významný jako samotná hydrolýza.



Obrázek 25 – Poměr metabolitů vzniklých inkubací IDA s mikrosomy. IDA – idarubicin, IDAOL – idarubicinol, AIDA – aglykon idarubicinu, AIDAOL – aglykon idarubicinolu.

Stejně jako u předchozích antracyklinů byla zjištěna kinetika redukčních reakcí. Její neobvyklý průběh ukazuje Obrázek 26. Pro redukci IDA na IDAOL nebylo i přes vysokou koncentraci IDA v inkubační směsi dosaženo plné saturace enzymů. Pro redukci AIDA na AIDAOL měla křivka atypický průběh nezapadající do žádného modelu, což znemožnilo výpočet kinetických parametrů. Počátek křivky sice naznačuje sigmoidální kinetiku, avšak při vzrůstající koncentraci dochází k poklesu tvorby AIDAOL. Toto je pravděpodobně způsobeno kombinací různých mechanismů, kterými mohou být například inhibice substrátem nebo produktem. Hydrolýza IDAOL na AIDAOL byla vyloučena inkubací IDAOL s mikrosomální frakcí.



Obrázek 26 – Průběh kinetiky u redukce IDA a AIDA v mikrosomech. IDA – idarubicin, IDAOL – idarubicinol, AIDAOL – aglykon idarubicinolu.

4.3.3.3. Souhrn

NCR je první karbonylredukujícími enzymem, u něž je popsán kinetický profil pro redukci IDA na IDAOL. Jeho roli v biotransformaci IDA však lze zatím pouze odhadovat.

Celkové povědomí o vlastnostech metabolitů IDA a jejich vlivu na lidský organismus je velmi omezené. Proto nebylo možné provést jakékoliv porovnání se získanými výsledky. Některé publikace uvádějí, že tvorba IDAOL nemá žádný vliv na buněčnou toxicitu (Crivellari et al. 2004) a proto mohou reakce redukující karbonylovou skupinu pozbývat svého významu. Nicméně vzhledem k tomu, že není téměř nic známo o metabolitech AIDA a jeho redukované formě AIDAOL, byla by diskuze vedoucí k těmto závěrům čistě spekulativní.

4.3.4. Vliv purifikované karbonylreduktasy a mikrosomálních enzymů na metabolismus antracyklinů

Role NCR v metabolismu antracyklinů zřejmě nebude příliš významná. Avšak je to první mikrosomální karbonylreduktasa, u které je nyní popsán vliv na metabolismus DOX, DAUN a IDA a zjištěny kinetické konstanty pro redukci DAUN na DAUNOL.

Výsledky experimentu zabývajícího se metabolismem antracyklinů v lidské jaterní mikrosomální frakci naznačují dvě možné cesty biotransformace. První z nich je přímá redukce a druhá hydrolýza na aglykon s následnou redukcí. Hydrolýza již redukovaných antracyklinů byla experimentálně zcela vyloučena. Používané koncentrace se sice na první pohled mohou zdát velmi vysoké, ale jak již bylo zmíněno, tyto koncentrace bývají u některých typů nádorových buněk zcela běžně přítomny (Bogason et al. 2009).

Mikrosomální hydrolasy a jejich aktivita vnáší nové světlo do metabolismu antracyklinů. Tím, že vznikající aglykony podstupují redukci karbonylové skupiny a to ochotněji než mateřská látka, lze předpokládat významné ovlivnění koncentrace jednotlivých látek a následný průběh cytostatické léčby a na ni vznikající rezistenci.

5. Závěr

Úvodní část disertační práce měla za úkol přiblížit důležitost membránových enzymů v metabolismu xenobiotických substrátů, mezi něž patří například léčiva, či látky znečišťující životní prostředí, se zaměřením na mikrosomální enzymy redukující karbonylovou skupinu.

Náplní výsledkové a diskusní části této práce jsou tři navzájem související a navazující cíle. Podařilo se prokázat, že vlastnost zvaná stereospecifita je unikátní pro každý pár enzym-substrát a že jí lze využít pro objevování nových nepopsaných enzymů. Pracovní skupina, ve které byl výzkum prováděn, se zabývá membránově vázanými karbonylreduktasami, přičemž využívá potenciální protinádorovou látku oracin jako substrát, pomocí kterého lze porovnat redukční aktivity jednotlivých enzymů. Bylo tedy využito znalosti hodnot stereospecifity pro pár oracin-mikrosomy (40 % (+)-DHO) a oracin-HSD11B1 (24 % (+)-DHO), kdy zjištěné odlišnosti vedly k předpokladu, že se v jaterní mikrosomální frakci musí nacházet ještě další karbonylreduktasa nebo karbonylreduktasy tvořící převážně (+)-DHO.

V další fázi se podařilo získat výrazně purifikovanou neznámou mikrosomální karbonylreduktasu s poměrem tvorby (+)-DHO/(-)-DHO 88:12. Tato hodnota je v souladu s původním předpokladem, že musí existovat další karbonylreduktasa s preferenční tvorbou (+)-DHO, a je zcela odlišná od hodnoty pro HSD11B1 (24:76). Specifická aktivita této reduktasy je zároveň mnohem vyšší než u HSD11B1 a proto se dá předpokládat vyšší význam v metabolismu karbonylových sloučenin. Optimalizací všech kroků, což byly a) výběr vhodného detergentu použitého pro solubilizaci mikrosomů, b) snížení ztrát aktivního enzymu sloučením metody odsolující solubilizované mikrosomy s následnou okamžitou purifikací využitím iontově-výměnné chromatografie na koloně Q sepharose a tím vyloučením koncentrování vzorku a c) výběrem vhodné kolony druhého purifikačního kroku, kterou byla kolona Fenyl HP sepharose bylo získáno přiměřené množství purifikovaného enzymu s vysokou redukční aktivitou. Avšak i přes výraznou aktivitu bylo množství enzymu extrémně nízké a proto nebylo možné provést úspěšnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

Třetím cílem bylo zjistit, zdali má neznámá karbonylreduktasa a celá jaterní mikrosomální frakce vliv na metabolismus antracyklinových protinádorových léčiv doxorubicinu, daunorubicinu a idarubicinu. Aktivita neznámé karbonylreduktasy byla prokázána pouze v případě daunorubicinu a idarubicinu. Kinetické parametry pro daunorubicin byly porovnány vůči hodnotám u vybraných cytosolických enzymů. Hodnoty pro idarubicin nemohly být posouzeny, protože kinetické konstanty pro jiné karbonylreduktasy nebyly známy. Získaná data naznačují, že role neznámé karbonylreduktasy v metabolismu antracyklinů zřejmě není příliš

významná, avšak jedná se o první karbonylredukující enzym, u kterého byla popsána role v metabolismu anthracyklinových antineoplastik včetně příslušných kinetických konstant. V případě mikrosomů bylo zjištěno, že při vyšších koncentracích výchozí látky byla hlavní cestou biotransformace hydrolýza. Vznikající aglykon pak soutěžil s výchozí látkou o vazebná místa karbonylreduktas a ovlivňoval výslednou kinetiku reakce. Jaterní mikrosomální frakce tedy může být významným prvkem ovlivňujícím metabolismus antracyklinů.

6. Seznam zkratek

- ABZSO – albendazolsulfoxid
- ADAUN – aglykon danorubicinu
- ADAUNOL – aglykon danorubicinolu
- ADH – alkoholdehydrogenasy
- ADOX – aglykon doxorubicinu
- ADOXOL – aglykon doxorubicinolu
- AIDA – aglykon idarubicinu
- AIDAOL – aglykon idarubicinolu
- AC – afinitní chromatografie
- AKR – aldo–ketoreduktasy
- AMK – aminokyseliny
- ANT – anthracykliny
- CBR1 – karbonylreduktasa 1
- CL_{int} – vnitřní clearance
- CYP450 – cytochromy P450
- DAUN – danorubicin
- DAUNOL – daunorubicinol
- DHF – dihydroflobufen
- DHO – dihydrooracin
- DHRS – dehydrogenasy/reduktasy nadrodiny SDR
- DOX – doxorubicin
- DOXOL – doxorubicinol
- GABA – gamaaminomáselná kyselina
- GF – gelová filtrace
- FMO – flavinové monooxygenasy
- HIC – hydrofobně–interakční chromatografie
- HSD3B – 3 β -hydroxysteroiddehydrogenasy

-
- HSD11B – 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy
- HSD17B – 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy
- HMM – „*hidden Markov*“ model
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- IDA – idarubicin
- IDAOL – idarubicinol
- IEX – iontově-výměnná chromatografie
- K_m – Michaelisova konstanta enzymové reakce
- MAO – monoaminoxxygenasy
- MDR – dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
- NAD(H) – (redukovaný) nikotinamidadenindinukleotid
- NADP(H) – (redukovaný) nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- NCR – neznámá karbonylreduktasa
- NNAL – 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
- NNK – 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
- OFZ – oxfendazolsulfoxid
- PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky
- PCB, PBB – polychlorované, polybromované bifenyly
- RDH – retinoldehydrogenasy
- SDR – dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
- SDS – dodecylsulfát sodný
- V_{max} – maximální rychlost enzymové reakce

7. Literatura

1. Albiston, A.L., Obeyesekere, V.R., Smith, R.E., Krozowski, Z.S., 1994. Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molecular and cellular endocrinology* 105, R11-17.
2. Amersham-biosciences, 2004. *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing - Principles and Methods*.
3. 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; the fate of foreign compounds in biological systems* 30, 755-769.
4. Atanasov, A.G., Odermatt, A., 2007. Readjusting the glucocorticoid balance: an opportunity for modulators of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity? *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 7, 125-140.
5. Bachur, N.R., 1976. Cytoplasmic aldo-keto reductases: a class of drug metabolizing enzymes. *Science* 193, 595-597.
6. Bains, O.S., Grigliatti, T.A., Reid, R.E., Riggs, K.W., 2010a. Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 335, 533-545.
7. Bains, O.S., Karkling, M.J., Grigliatti, T.A., Reid, R.E., Riggs, K.W., 2009. Two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of human carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 37, 1107-1114.
8. Bains, O.S., Karkling, M.J., Lubieniecka, J.M., Grigliatti, T.A., Reid, R.E., Riggs, K.W., 2010b. Naturally occurring variants of human CBR3 alter anthracycline in vitro metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 332, 755-763.
9. Bains, O.S., Takahashi, R.H., Pfeifer, T.A., Grigliatti, T.A., Reid, R.E., Riggs, K.W., 2008. Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36, 904-910.

10. Bajpai, M., Roskos, L.K., Shen, D.D., Levy, R.H., 1996. Roles of cytochrome P4502C9 and cytochrome P4502C19 in the stereoselective metabolism of phenytoin to its major metabolite. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 24, 1401-1403.
11. 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. *American journal of physiology. Renal physiology* 289, F200-207.
12. 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 letters* 531, 489-493.
13. Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Jez, J.M., Penning, T.M., Lewis, M., 1996. Structure of 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase complexed with NADP+. *Biochemistry* 35, 10702-10711.
14. Biswas, M.G., Russell, D.W., 1997. Expression cloning and characterization of oxidative 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *The Journal of biological chemistry* 272, 15959-15966.
15. Bogason, A., Bhuiyan, H., Masquelier, M., Paul, C., Gruber, A., Vitols, S., 2009. Uptake of anthracyclines in vitro and in vivo in acute myeloid leukemia cells in relation to apoptosis and clinical response. *European journal of clinical pharmacology* 65, 1179-1186.
16. Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology* 13, 135-160.
17. Brereton, P., Suzuki, T., Sasano, H., Li, K., Duarte, C., Obeyesekere, V., Haeseleer, F., Palczewski, K., Smith, I., Komesaroff, P., Krozowski, Z., 2001. Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Molecular and cellular endocrinology* 171, 111-117.
18. Bresson, E., Boucher-Kovalik, S., Chapdelaine, P., Madore, E., Harvey, N., Laberge, P.Y., Leboeuf, M., Fortier, M.A., 2011. The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, 210-219.
19. 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 metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32, 915-922.

20. Breyer-Pfaff, U., Nill, K., 1999. Stereoselective high-affinity reduction of ketonic nortriptyline metabolites and of ketotifen by aldo-keto reductases from human liver. *Advances in experimental medicine and biology* 463, 473-480.
21. Breyer-Pfaff, U., Nill, K., 2004. Carbonyl reduction of naltrexone and dolasetron by oxidoreductases isolated from human liver cytosol. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 56, 1601-1606.
22. Carr, I.M., Markham, A.F., 1995. Molecular genetic analysis of the human sorbitol dehydrogenase gene. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 6, 645-652.
23. Cashman, J.R., Park, S.B., Yang, Z.C., Washington, C.B., Gomez, D.Y., Giacomini, K.M., Brett, C.M., 1993. Chemical, enzymatic, and human enantioselective S-oxygenation of cimetidine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 21, 587-597.
24. Cerignoli, F., Guo, X., Cardinali, B., Rinaldi, C., Casaletto, J., Frati, L., Screpanti, I., Gudas, L.J., Gulino, A., Thiele, C.J., Giannini, G., 2002. retSDR1, a short-chain retinol dehydrogenase/reductase, is retinoic acid-inducible and frequently deleted in human neuroblastoma cell lines. *Cancer research* 62, 1196-1204.
25. Coleman, M.D., 2010. *Human Drug Metabolism, An Introduction, Second Edition*, John Wiley & Sons, Ltd.
26. Crivellari, D., Lombardi, D., Spazzapan, S., Veronesi, A., Toffoli, G., 2004. New oral drugs in older patients: a review of idarubicin in elderly patients. *Critical reviews in oncology/hematology* 49, 153-163.
27. Das, A.K., Uhler, M.D., Hajra, A.K., 2000. Molecular cloning and expression of mammalian peroxisomal trans-2-enoyl-coenzyme A reductase cDNAs. *The Journal of biological chemistry* 275, 24333-24340.
28. De Nys, K., Meyhi, E., Mannaerts, G.P., Fransen, M., Van Veldhoven, P.P., 2001. Characterisation of human peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Biochimica et biophysica acta* 1533, 66-72.
29. Deisenroth, C., Itahana, Y., Tollini, L., Jin, A., Zhang, Y., 2011. p53-Inducible DHRS3 is an endoplasmic reticulum protein associated with lipid droplet accumulation. *The Journal of biological chemistry* 286, 28343-28356.

- 30.** Dessypris, E.N., Brenner, D.E., Baer, M.R., Hande, K.R., 1988. Uptake and intracellular distribution of doxorubicin metabolites in B-lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research* 48, 503-506.
- 31.** Driessen, C.A., Winkens, H.J., Hoffmann, K., Kuhlmann, L.D., Janssen, B.P., Van Vugt, A.H., Van Hooser, J.P., Wieringa, B.E., Deutman, A.F., Palczewski, K., Ruether, K., Janssen, J.J., 2000. Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinols and cis-retinyl esters. *Molecular and cellular biology* 20, 4275-4287.
- 32.** El-Kabbani, O., Darmanin, C., Chung, R.P., 2004. Sorbitol dehydrogenase: structure, function and ligand design. *Current medicinal chemistry* 11, 465-476.
- 33.** El-Kabbani, O., Dhagat, U., Soda, M., Endo, S., Matsunaga, T., Hara, A., 2011. Probing the inhibitor selectivity pocket of human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) with X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21, 2564-2567.
- 34.** 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. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 1326-1330.
- 35.** Eyles, D.W., Pond, S.M., 1992. Stereospecific reduction of haloperidol in human tissues. *Biochemical pharmacology* 44, 867-871.
- 36.** Farjo, K.M., Moiseyev, G., Nikolaeva, O., Sandell, L.L., Trainor, P.A., Ma, J.X., 2011. RDH10 is the primary enzyme responsible for the first step of embryonic Vitamin A metabolism and retinoic acid synthesis. *Developmental biology* 357, 347-355.
- 37.** Fernandez, M.R., Porte, S., Crosas, E., Barbera, N., Farres, J., Biosca, J.A., Pares, X., 2007. Human and yeast zeta-crystallins bind AU-rich elements in RNA. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 1419-1427.
- 38.** Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jornvall, H., Oppermann, U., 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *The Journal of biological chemistry* 277, 25677-25684.
- 39.** Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P.L., Loda, M., 2010. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol* 6, 551-562.

40. Flesch, G., Czendlik, C., Renard, D., Lloyd, P., 2011. Pharmacokinetics of the monohydroxy derivative of oxcarbazepine and its enantiomers after a single intravenous dose given as racemate compared with a single oral dose of oxcarbazepine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39, 1103-1110.
41. Flockhart, D.A., *Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table.*, <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.aspx>, Accessed: 23.12.2011
42. Forrest, G.L., Gonzalez, B., Tseng, W., Li, X., Mann, J., 2000. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer research* 60, 5158-5164.
43. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1776-1785.
44. 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. *Chemico-biological interactions* 176, 9-18.
45. GE-Healthcare, 2006. *Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography - Principles and Methods.*
46. GE-Healthcare, 2010. *Strategies for protein purification - handbook*, GE Healthcare.
47. Geissler, W.M., Davis, D.L., Wu, L., Bradshaw, K.D., Patel, S., Mendonca, B.B., Elliston, K.O., Wilson, J.D., Russell, D.W., Andersson, S., 1994. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature genetics* 7, 34-39.
48. 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. *Analytical and bioanalytical chemistry* 391, 391-403.
49. Gibbons, B.J., Hurley, T.D., 2004. Structure of three class I human alcohol dehydrogenases complexed with isoenzyme specific formamide inhibitors. *Biochemistry* 43, 12555-12562.

50. Gibson, G.G., Skett, P., 2001. *Introduction to Drug Metabolism, 3rd edition*, Nelson Thornes Publishers.
51. Gough, W.H., VanOoteghem, S., Sint, T., Kedishvili, N.Y., 1998. cDNA cloning and characterization of a new human microsomal NAD⁺-dependent dehydrogenase that oxidizes all-trans-retinol and 3 α -hydroxysteroids. *The Journal of biological chemistry* 273, 19778-19785.
52. Grant, S.M., Faulds, D., 1992. Oxcarbazepine. A review of its pharmacology and therapeutic potential in epilepsy, trigeminal neuralgia and affective disorders. *Drugs* 43, 873-888.
53. Guengerich, F.P., 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology* 21, 70-83.
54. Guengerich, F.P., Cai, H., McMahon, M., Hayes, J.D., Sutter, T.R., Groopman, J.D., Deng, Z., Harris, T.M., 2001. Reduction of aflatoxin B1 dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. *Chemical research in toxicology* 14, 727-737.
55. Gupta, S.D., Gable, K., Han, G., Borovitskaya, A., Selby, L., Dunn, T.M., Harmon, J.M., 2009. Tsc10p and FVT1: topologically distinct short-chain reductases required for long-chain base synthesis in yeast and mammals. *Journal of lipid research* 50, 1630-1640.
56. Haeseleer, F., Huang, J., Lebioda, L., Saari, J.C., Palczewski, K., 1998. Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *The Journal of biological chemistry* 273, 21790-21799.
57. 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. *The Journal of biological chemistry* 277, 45537-45546.
58. Haining, R.L., Hunter, A.P., Veronese, M.E., Trager, W.F., Rettie, A.E., 1996. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Archives of biochemistry and biophysics* 333, 447-458.
59. Hayess, K., Kraft, R., Sachsinger, J., Janke, J., Beckmann, G., Rohde, K., Jandrig, B., Benndorf, R., 1998. Mammalian protein homologous to VAT-1 of *Torpedo californica*: isolation from Ehrlich ascites tumor cells, biochemical characterization, and organization of its gene. *Journal of cellular biochemistry* 69, 304-315.

60. Hedlund, J., Jornvall, H., Persson, B., 2010. Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC bioinformatics* 11, 534.
61. HGNC, *HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute*, <http://www.genenames.org/genefamily/akr.php>, Accessed: 9.11.2011
62. Holzmann, J., Frank, P., Loffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C., Rossmanith, W., 2008. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135, 462-474.
63. Hosfield, D.J., Wu, Y., Skene, R.J., Hilgers, M., Jennings, A., Snell, G.P., Aertgeerts, K., 2005. Conformational flexibility in crystal structures of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I provide insights into glucocorticoid interconversion and enzyme regulation. *The Journal of biological chemistry* 280, 4639-4648.
64. Huang, X.F., Luu-The, V., 2000. Molecular characterization of a first human 3(alpha-->beta)-hydroxysteroid epimerase. *The Journal of biological chemistry* 275, 29452-29457.
65. 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. *Chemico-biological interactions* 130-132, 805-814.
66. Chai, Z., Brereton, P., Suzuki, T., Sasano, H., Obeyesekere, V., Escher, G., Saffery, R., Fuller, P., Enriquez, C., Krozowski, Z., 2003. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology* 144, 2084-2091.
67. Chen, M., Drury, J.E., Penning, T.M., 2011. Substrate specificity and inhibitor analyses of human steroid 5beta-reductase (AKR1D1). *Steroids* 76, 484-490.
68. Chen, Z., Kastaniotis, A.J., Miinalainen, I.J., Rajaram, V., Wierenga, R.K., Hiltunen, J.K., 2009. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8 and carbonyl reductase type 4 assemble as a ketoacyl reductase of human mitochondrial FAS. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3682-3691.
69. Cheng, J.B., Russell, D.W., 2004. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *The Journal of biological chemistry* 279, 37789-37797.

- 70.** Chetyrkin, S.V., Belyaeva, O.V., Gough, W.H., Kedishvili, N.Y., 2001a. Characterization of a novel type of human microsomal 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: unique tissue distribution and catalytic properties. *The Journal of biological chemistry* 276, 22278-22286.
- 71.** Chetyrkin, S.V., Hu, J., Gough, W.H., Dumauval, N., Kedishvili, N.Y., 2001b. Further characterization of human microsomal 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics* 386, 1-10.
- 72.** Chevallet, M., Luche, S., Diemer, H., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Rabilloud, T., 2008. Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics* 8, 4853-4861.
- 73.** Choi, M.K., Song, I.S., Kim, D.D., Chung, S.J., Shim, C.K., 2007. Altered pharmacokinetics of daunorubicin in rats with CCl₄-induced hepatic injury. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 10, 443-454.
- 74.** Chung, S., LaMendola, J., 1989. Cloning and sequence determination of human placental aldose reductase gene. *The Journal of biological chemistry* 264, 14775-14777.
- 75.** Iino, T., Tabata, M., Takikawa, S., Sawada, H., Shintaku, H., Ishikura, S., Hara, A., 2003. Tetrahydrobiopterin is synthesized from 6-pyruvoyl-tetrahydropterin by the human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Archives of biochemistry and biophysics* 416, 180-187.
- 76.** Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M., Penning, T.M., 1997a. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical journal* 326 (Pt 3), 625-636.
- 77.** Jez, J.M., Flynn, T.G., Penning, T.M., 1997b. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical pharmacology* 54, 639-647.
- 78.** Jiang, L.L., Miyazawa, S., Souri, M., Hashimoto, T., 1997. Structure of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *Journal of biochemistry* 121, 364-369.
- 79.** Jones, R.J., Dickerson, S., Bhende, P.M., Delecluse, H.J., Kenney, S.C., 2007. Epstein-Barr virus lytic infection induces retinoic acid-responsive genes through induction of a retinol-metabolizing enzyme, DHRS9. *The Journal of biological chemistry* 282, 8317-8324.

- 80.** Jornvall, H., Hoog, J.O., Persson, B., 1999. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS letters* 445, 261-264.
- 81.** Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D., 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34, 6003-6013.
- 82.** Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H., Persson, B., 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 4409-4417.
- 83.** Kallberg, Y., Oppermann, U., Persson, B., 2010. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *The FEBS journal* 277, 2375-2386.
- 84.** 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 metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36, 2113-2120.
- 85.** 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). *The Journal of biological chemistry* 277, 28909-28915.
- 86.** 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. *The Biochemical journal* 366, 847-861.
- 87.** Kenneke, J.F., Mazur, C.S., Ritger, S.E., Sack, T.J., 2008. Mechanistic investigation of the noncytochrome P450-mediated metabolism of triadimefon to triadimenol in hepatic microsomes. *Chemical research in toxicology* 21, 1997-2004.
- 88.** Kihara, A., Igarashi, Y., 2004. FVT-1 is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry* 279, 49243-49250.
- 89.** Kinoshita, J.H., 1990. A thirty year journey in the polyol pathway. *Experimental eye research* 50, 567-573.

- 90.** Koivuranta, K.T., Hakkola, E.H., Hiltunen, J.K., 1994. Isolation and characterization of cDNA for human 120 kDa mitochondrial 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase. *The Biochemical journal* 304 (Pt 3), 787-792.
- 91.** Kucera, R., Nobilis, M., Skalova, L., Szotakova, B., Cisar, P., Jira, T., Klimes, J., Wsol, V., 2005. Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[c]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 37, 1049-1057.
- 92.** Kvasnickova, E., Szotakova, B., Wsol, V., Trejtnar, F., Skalova, L., Hais, I.M., Kuchar, M., Poppova, M., 1999. Metabolic pathways of flobufen-a new antirheumatic and antiarthritic drug. Interspecies comparison. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 51, 352-356.
- 93.** Lachance, Y., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Dumont, M., de Launoit, Y., Guerin, S., Leblanc, G., Labrie, F., 1990. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 265, 20469-20475.
- 94.** Lapshina, E.A., Belyaeva, O.V., Chumakova, O.V., Kedishvili, N.Y., 2003. Differential recognition of the free versus bound retinol by human microsomal retinol/sterol dehydrogenases: characterization of the holo-CRBP dehydrogenase activity of RoDH-4. *Biochemistry* 42, 776-784.
- 95.** Lee, K.W., Ko, B.C., Jiang, Z., Cao, D., Chung, S.S., 2001. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anti-cancer drugs* 12, 129-132.
- 96.** Lee, S.A., Belyaeva, O.V., Kedishvili, N.Y., 2009. Biochemical characterization of human epidermal retinol dehydrogenase 2. *Chemico-biological interactions* 178, 182-187.
- 97.** Lee, S.A., Belyaeva, O.V., Wu, L., Kedishvili, N.Y., 2011a. Retinol dehydrogenase 10 but not retinol/sterol dehydrogenase(s) regulates the expression of retinoic acid-responsive genes in human transgenic skin raft culture. *The Journal of biological chemistry* 286, 13550-13560.
- 98.** Lee, S.L., Shih, H.T., Chi, Y.C., Li, Y.P., Yin, S.J., 2011b. Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole. *Chemico-biological interactions* 191, 26-31.

- 99.** Lemonde, H.A., Custard, E.J., Bouquet, J., Duran, M., Overmars, H., Scambler, P.J., Clayton, P.T., 2003. Mutations in SRD5B1 (AKR1D1), the gene encoding delta(4)-3-oxosteroid 5beta-reductase, in hepatitis and liver failure in infancy. *Gut* 52, 1494-1499.
- 100.** Lenski, C., Kooy, R.F., Reyniers, E., Loessner, D., Wanders, R.J., Winnepeninckx, B., Hellebrand, H., Engert, S., Schwartz, C.E., Meindl, A., Ramser, J., 2007. The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. *American journal of human genetics* 80, 372-377.
- 101.** Li, K.X., Smith, R.E., Krozowski, Z.S., 1998. Cloning and expression of a novel tissue specific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrine research* 24, 663-667.
- 102.** Li, Y., Um, S.Y., McDonald, T.V., 2006. Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 12, 199-210.
- 103.** Licata, S., Saponiero, A., Mordente, A., Minotti, G., 2000. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chemical research in toxicology* 13, 414-420.
- 104.** 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 research* 61, 1611-1618.
- 105.** Loveless, H., Arena, E., Felsted, R.L., Bachur, N.R., 1978. Comparative mammalian metabolism of adriamycin and daunorubicin. *Cancer research* 38, 593-598.
- 106.** Luu-The, V., Takahashi, M., Labrie, F., 1990. Purification of Microsomal and Mitochondrial 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta-5-Delta-4 Isomerase from Human Placenta. *Annals of the New York Academy of Sciences* 595, 386-388.
- 107.** 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, 437-443.
- 108.** 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. *The Journal of biological chemistry* 282, 25986-25992.

- 109.** Maeda, A., Maeda, T., Imanishi, Y., Sun, W., Jastrzebska, B., Hatala, D.A., Winkens, H.J., Hofmann, K.P., Janssen, J.J., Baehr, W., Driessen, C.A., Palczewski, K., 2006. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *The Journal of biological chemistry* 281, 37697-37704.
- 110.** 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 metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34, 464-470.
- 111.** Maser, E., 1989. Characterization of microsomal and cytoplasmic metyrapone reducing enzymes from mouse liver. *Archives of toxicology. Supplement. = Archiv fur Toxikologie. Supplement* 13, 271-274.
- 112.** Maser, E., Friebertshauer, J., Volker, B., 2003. Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen. *Chemico-biological interactions* 143-144, 435-448.
- 113.** Matsuzaka, Y., Okamoto, K., Tsuji, H., Mabuchi, T., Ozawa, A., Tamiya, G., Inoko, H., 2002. Identification of the hRDH-E2 gene, a novel member of the SDR family, and its increased expression in psoriatic lesion. *Biochemical and biophysical research communications* 297, 1171-1180.
- 114.** Maudens, K.E., Stove, C.P., Lambert, W.E., 2008. Optimization of a liquid chromatographic separation for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites. *Journal of separation science* 31, 1042-1049.
- 115.** McCormack, T., McCormack, K., 1994. Shaker K⁺ channel beta subunits belong to an NAD(P)H-dependent oxidoreductase superfamily. *Cell* 79, 1133-1135.
- 116.** MDR, *MDR (Medium-chain Dehydrogenases/Reductases)*, <http://www.mdr-enzymes.org/>, Accessed: 18.11.2011
- 117.** Medvedev, A., Igosheva, N., Crumeyrolle-Arias, M., Glover, V., 2005. Isatin: role in stress and anxiety. *Stress* 8, 175-183.
- 118.** Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Ortega, F.J., Fernandez-Real, J.M., 2009. Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. *Clinical chemistry* 55, 425-438.

- 119.** Miinalainen, I.J., Chen, Z.J., Torkko, J.M., Pirila, P.L., Sormunen, R.T., Bergmann, U., Qin, Y.M., Hiltunen, J.K., 2003. Characterization of 2-enoyl thioester reductase from mammals. An ortholog of YBR026p/MRF1'p of the yeast mitochondrial fatty acid synthesis type II. *The Journal of biological chemistry* 278, 20154-20161.
- 120.** Miko, M., Krepelka, J., Melka, M., 1991. Effects of benfluron and its two metabolites on respiratory processes in P388 murine leukemia and Ehrlich ascites cells. *Biochemical pharmacology* 42 Suppl, S214-216.
- 121.** Mitchell, S.C., 2008. Flavin mono-oxygenase (FMO)--the 'other' oxidase. *Current drug metabolism* 9, 280-284.
- 122.** Moeller, G., Adamski, J., 2009. Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and cellular endocrinology* 301, 7-19.
- 123.** Mohler, J.L., Titus, M.A., Bai, S., Kennerley, B.J., Lih, F.B., Tomer, K.B., Wilson, E.M., 2011. Activation of the androgen receptor by intratumoral bioconversion of androstanediol to dihydrotestosterone in prostate cancer. *Cancer research* 71, 1486-1496.
- 124.** Moon, Y.A., Horton, J.D., 2003. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *The Journal of biological chemistry* 278, 7335-7343.
- 125.** Moroni, P., Buronfosse, T., Longin-Sauvageon, C., Delatour, P., Benoit, E., 1995. Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 23, 160-165.
- 126.** Muller, C., Chatelut, E., Gualano, V., De Forni, M., Huguet, F., Attal, M., Canal, P., Laurent, G., 1993. Cellular pharmacokinetics of doxorubicin in patients with chronic lymphocytic leukemia: comparison of bolus administration and continuous infusion. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 32, 379-384.
- 127.** Nakamura, Y., Suzuki, T., Arai, Y., Sasano, H., 2009. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11 (Pan1b) expression in human prostate cancer. *Neoplasma* 56, 317-320.
- 128.** Narimatsu, S., Takemi, C., Kuramoto, S., Tsuzuki, D., Hichiya, H., Tamagake, K., Yamamoto, S., 2003. Stereoselectivity in the oxidation of bufuralol, a chiral substrate, by human cytochrome P450s. *Chirality* 15, 333-339.

- 129.** Narimatsu, S., Takemi, C., Tsuzuki, D., Kataoka, H., Yamamoto, S., Shimada, N., Suzuki, S., Satoh, T., Meyer, U.A., Gonzalez, F.J., 2002. Stereoselective metabolism of bufuralol racemate and enantiomers in human liver microsomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 303, 172-178.
- 130.** Nishinaka, T., Azuma, Y., Ushijima, S., Miki, T., Yabe-Nishimura, C., 2003. Human testis specific protein: a new member of aldo-keto reductase superfamily. *Chemico-biological interactions* 143-144, 299-305.
- 131.** Nobilis, M., Kvasnickova, E., Sroler, A., Hais, I.M., 1991. Elimination of benfluron and its metabolites in the faeces and urine of rats. *Drug metabolism and drug interactions* 9, 225-240.
- 132.** Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., Maser, E., 2008. Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology letters* 181, 1-6.
- 133.** Odermatt, A., Nashev, L.G., 2010. The glucocorticoid-activating enzyme 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 119, 1-13.
- 134.** 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. *Biochemical pharmacology* 50, 221-227.
- 135.** Ohno, S., Nishikawa, K., Honda, Y., Nakajin, S., 2008. Expression in E. coli and tissue distribution of the human homologue of the mouse Ke 6 gene, 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8. *Molecular and cellular biochemistry* 309, 209-215.
- 136.** Olson, L.E., Bedja, D., Alvey, S.J., Cardounel, A.J., Gabrielson, K.L., Reeves, R.H., 2003. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer research* 63, 6602-6606.
- 137.** Olson, R.D., Mushlin, P.S., Brenner, D.E., Fleischer, S., Cusack, B.J., Chang, B.K., Boucek, R.J., Jr., 1988. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3585-3589.
- 138.** Oppermann, U.C., Filling, C., Jornvall, H., 2001. Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-biological interactions* 130-132, 699-705.

- 139.** Palackal, N.T., Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M., 2001. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chemico-biological interactions* 130-132, 815-824.
- 140.** Palackal, N.T., Lee, S.H., Harvey, R.G., Blair, I.A., Penning, T.M., 2002. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 24799-24808.
- 141.** Palermo, M., Marazzi, M.G., Hughes, B.A., Stewart, P.M., Clayton, P.T., Shackleton, C.H., 2008. Human Delta4-3-oxosteroid 5beta-reductase (AKR1D1) deficiency and steroid metabolism. *Steroids* 73, 417-423.
- 142.** Parker, R.O., Crouch, R.K., 2010. Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Experimental eye research* 91, 788-792.
- 143.** 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 3alpha-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. *The Biochemical journal* 351, 67-77.
- 144.** Penning, T.M., Drury, J.E., 2007. Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of biochemistry and biophysics* 464, 241-250.
- 145.** Peri, R., Wible, B.A., Brown, A.M., 2001. Mutations in the Kv beta 2 binding site for NADPH and their effects on Kv1.4. *The Journal of biological chemistry* 276, 738-741.
- 146.** Persson, B., Hedlund, J., Jornvall, H., 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 3879-3894.
- 147.** 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. *Chemico-biological interactions* 178, 94-98.

- 148.** Pfam 25.0, *The Pfam protein families database*, <http://pfam.sanger.ac.uk>, Accessed: 24.11.2011
- 149.** Pilka, E.S., Hozjan, V., Ugochukwu, E., von Delft, F., Sundstrom, M., Arrowsmith, C.H., Weigelt, J., Edwards, A., Oppermann, U., *Crystal structure of human SDR family member 1.*, <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2QQ5>, Accessed: 22.5.2012
- 150.** Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- 151.** Quinn, A.M., Harvey, R.G., Penning, T.M., 2008. Oxidation of PAH trans-dihydrodiols by human aldo-keto reductase AKR1B10. *Chemical research in toxicology* 21, 2207-2215.
- 152.** Ramana, K.V., 2011. ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme. *Biomolecular concepts* 2, 103-114.
- 153.** Rawden, H.C., Kokwaro, G.O., Ward, S.A., Edwards, G., 2000. Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British journal of clinical pharmacology* 49, 313-322.
- 154.** Rettie, A.E., Lawton, M.P., Sadeque, A.J., Meier, G.P., Philpot, R.M., 1994. Prochiral sulfoxidation as a probe for multiple forms of the microsomal flavin-containing monooxygenase: studies with rabbit FMO1, FMO2, FMO3, and FMO5 expressed in *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics* 311, 369-377.
- 155.** Rettie, A.E., Meier, G.P., Sadeque, A.J., 1995. Prochiral sulfides as in vitro probes for multiple forms of the flavin-containing monooxygenase. *Chemico-biological interactions* 96, 3-15.
- 156.** Rheume, E., Lachance, Y., Zhao, H.F., Breton, N., Dumont, M., de Launoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J., Labrie, F., 1991. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 5, 1147-1157.
- 157.** Ris, M.M., von Wartburg, J.P., 1973. Heterogeneity of NADPH-dependent aldehyde reductase from human and rat brain. *European journal of biochemistry / FEBS* 37, 69-77.

- 158.** Romanuik, T.L., Wang, G., Morozova, O., Delaney, A., Marra, M.A., Sadar, M.D., 2010. LNCaP Atlas: gene expression associated with in vivo progression to castration-recurrent prostate cancer. *BMC medical genomics* 3, 43.
- 159.** Saari, J.C., Garwin, G.G., Haeseleer, F., Jang, G.F., Palczewski, K., 2000. Phase partition and high-performance liquid chromatography assays of retinoid dehydrogenases. *Methods in enzymology* 316, 359-371.
- 160.** Sakurai, N., Miki, Y., Suzuki, T., Watanabe, K., Narita, T., Ando, K., Yung, T.M., Aoki, D., Sasano, H., Handa, H., 2006. Systemic distribution and tissue localizations of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 99, 174-181.
- 161.** Salabei, J.K., Li, X.P., Petrash, J.M., Bhatnagar, A., Barski, O.A., 2011. Functional expression of novel human and murine AKR1B genes. *Chemico-biological interactions* 191, 177-184.
- 162.** Saloniemi, T., Jokela, H., Strauss, L., Pakarinen, P., Poutanen, M., 2012. The diversity of sex steroid action: novel functions of hydroxysteroid (17beta) dehydrogenases as revealed by genetically modified mouse models. *The Journal of endocrinology* 212, 27-40.
- 163.** Scott, I., Webster, B.R., Li, J.H., Sack, M.N., 2012. Identification of a molecular component of the mitochondrial acetyltransferase programme: a novel role for GCN5L1. *The Biochemical journal* 443, 655-661.
- 164.** SDR enzymes, *SDR (short-chain dehydrogenases/reductases)*, <http://www.sdr-enzymes.org/>, Accessed: 24.11.2011
- 165.** Schlegel, B.P., Jez, J.M., Penning, T.M., 1998. Mutagenesis of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase reveals a "push-pull" mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases. *Biochemistry* 37, 3538-3548.
- 166.** Schwarz, M., Wright, A.C., Davis, D.L., Nazer, H., Bjorkhem, I., Russell, D.W., 2000. The bile acid synthetic gene 3beta-hydroxy-Delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis. *The Journal of clinical investigation* 106, 1175-1184.
- 167.** Simard, J., Ricketts, M.L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F.A., Melner, M.H., 2005. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocrine reviews* 26, 525-582.

- 168.** Simon, A., Lagercrantz, J., Bajalica-Lagercrantz, S., Eriksson, U., 1996. Primary structure of human 11-cis retinol dehydrogenase and organization and chromosomal localization of the corresponding gene. *Genomics* 36, 424-430.
- 169.** Skalova, L., Kral, R., Szotakova, B., Babu, Y.N., Pichard-Garcia, L., Wsol, V., 2003. Chiral aspects of metabolism of antiinflammatory drug flobufen in human hepatocytes. *Chirality* 15, 433-440.
- 170.** 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. *Biochemical pharmacology* 64, 297-305.
- 171.** Skarka, A., Skarydova, L., Stambergova, H., Wsol, V., 2011. Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chemico-biological interactions* 191, 66-74.
- 172.** 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, 52-60.
- 173.** Soldan, M., Netter, K.J., Maser, E., 1996. Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 51, 117-123.
- 174.** Steckelbroeck, S., Oyesanmi, B., Jin, Y., Lee, S.H., Kloosterboer, H.J., Penning, T.M., 2006. Tibolone metabolism in human liver is catalyzed by 3alpha/3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four isoforms of the aldo-keto reductase (AKR)1C subfamily. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316, 1300-1309.
- 175.** 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 letters* 462, 335-340.
- 176.** Tanaka, M., Bateman, R., Rauh, D., Vaisberg, E., Ramachandani, S., Zhang, C., Hansen, K.C., Burlingame, A.L., Trautman, J.K., Shokat, K.M., Adams, C.L., 2005. An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules. *PLoS biology* 3, e128.
- 177.** The UniProt Consortium, *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*, <http://www.uniprot.org>, search string 1: 'organism:"homo sapiens" AND

family:"cytochrome P450" AND reviewed:yes', search string 2: 'organism:"homo sapiens" AND family:"aldo-keto reductase"', search string 3: 'organism:"homo sapiens" AND family:"Zinc-containing alcohol dehydrogenase family"', search string 4: 'organism:"homo sapiens" AND family:"NADP-dependent oxidoreductase L4BD family"', search string 5: 'family:"Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) family"', search string 6: 'organism:"homo sapiens" AND family:"short-chain dehydrogenases/reductases" AND reviewed:yes', search string 7: 'organism:"homo sapiens" AND family:"Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) family"',
Accessed: 14.5.2012

178. Trushin, N., Leder, G., El-Bayoumy, K., Hoffmann, D., Beger, H.G., Henne-Bruns, D., Ramadani, M., Prokopczyk, B., 2008. The tobacco carcinogen NNK is stereoselectively reduced by human pancreatic microsomes and cytosols. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 393, 571-579.

179. Uetrecht, P.J., Trager, W., 2007. *Drug Metabolism - Chemical and Enzymatic Aspects, textbook edition*, Informa Healthcare USA, Inc.

180. 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, 1233-1238.

181. Upadhyaya, P., Kenney, P.M., Hochalter, J.B., Wang, M., Hecht, S.S., 1999. Tumorigenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol enantiomers and metabolites in the A/J mouse. *Carcinogenesis* 20, 1577-1582.

182. Velik, J., Baliharova, V., Skalova, L., Szotakova, B., Wsol, V., Lamka, J., 2005. Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild breeds. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 28, 377-384.

183. Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Pis, A., Lanusse, C., 2004. Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32, 536-544.

184. Wang, J., Chai, X., Eriksson, U., Napoli, J.L., 1999. Activity of human 11-cis-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue. *The Biochemical journal* 338 (Pt 1), 23-27.

185. Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Maurel, P., Schuetz, E.G., Mendez-Picon, G., Parker, G.A., Guzelian, P.S., 1985. Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 6310-6314.

186. Wei, L., Liu, J., Le, X.C., Han, Y., Tong, Y., Lau, A.S., Rong, J., 2011. Pharmacological induction of leukotriene B₄-12-hydroxydehydrogenase suppresses the oncogenic transformation of human hepatoma HepG2 cells. *International journal of oncology* 39, 735-745.

187. Wermuth, B., 1981. Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *The Journal of biological chemistry* 256, 1206-1213.

188. Wermuth, B., Platts, K.L., Seidel, A., Oesch, F., 1986. Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochemical pharmacology* 35, 1277-1282.

189. Wirth, H., Wermuth, B., 1992. Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 40, 1857-1863.

190. 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. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications* 681, 169-175.

191. 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, 505-509.

192. 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, 111-118.

193. Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., Maser, E., 2003. Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chemico-biological interactions* 143-144, 459-468.

194. 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, 253-261.

- 195.** Wu, B.X., Chen, Y., Fan, J., Rohrer, B., Crouch, R.K., Ma, J.X., 2002. Cloning and characterization of a novel all-trans retinol short-chain dehydrogenase/reductase from the RPE. *Investigative ophthalmology & visual science* 43, 3365-3372.
- 196.** Wu, L., Einstein, M., Geissler, W.M., Chan, H.K., Elliston, K.O., Andersson, S., 1993. Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *The Journal of biological chemistry* 268, 12964-12969.
- 197.** Wu, Q., Xu, M., Cheng, C., Zhou, Z., Huang, Y., Zhao, W., Zeng, L., Xu, J., Fu, X., Ying, K., Xie, Y., Mao, Y., 2001. Molecular cloning and characterization of a novel Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 gene from human fetal brain. *Molecular biology reports* 28, 193-198.
- 198.** Xie, Z., Barski, O.A., Cai, J., Bhatnagar, A., Tipparaju, S.M., 2011. Catalytic reduction of carbonyl groups in oxidized PAPC by Kvbeta2 (AKR6). *Chemico-biological interactions* 191, 255-260.
- 199.** Yasumori, T., Chen, L.S., Li, Q.H., Ueda, M., Tsuzuki, T., Goldstein, J.A., Kato, R., Yamazoe, Y., 1999. Human CYP2C-mediated stereoselective phenytoin hydroxylation in Japanese: difference in chiral preference of CYP2C9 and CYP2C19. *Biochemical pharmacology* 57, 1297-1303.
- 200.** Yokomizo, T., Ogawa, Y., Uozumi, N., Kume, K., Izumi, T., Shimizu, T., 1996. cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase. *The Journal of biological chemistry* 271, 2844-2850.
- 201.** Zhong, L., Shen, H., Huang, C., Jing, H., Cao, D., 2011. AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicology and applied pharmacology* 255, 40-47.

8. Přílohy

8.1. Publikace a prezentace

8.1.1. Publikace vztahující se k tématu disertační práce

1. 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, 52-60.
2. Skarydova, L., Skarka, A., Solich, P., Wsol, V., 2010. Enzyme stereospecificity as a powerful tool in searching for new enzymes. *Current drug metabolism* 11, 547-559.
3. Skarka, A., Skarydova, L., Stambergova, H., Wsol, V., 2011. Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chemico-biological interactions* 191, 66-74.

8.1.2. Další publikace

1. Kisiela, M., Skarka, A., Ebert, B., Maser, E., 2011. Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria - A bioinformatic perspective. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.

8.1.3. Prezentace vztahující se k tématu disertační práce

1. Skarydova, L., Skarka, A., Wsol, 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.
2. Wsol, V., Skarydova, L., Skarka, A., Solich, P. 2009. Enzyme stereospecificity as a tool for searching of new enzymes, *Chirality*, Breckenridge, USA.
3. Wsol, V., Skarydova, 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.
4. Skarydová, L., Skarka, A., Wsol, V. 2009. New microsomal carbonyl reductase in metabolism of oracin, XXV. *Xenobiochemické symposium*, Mikulov.
5. Skarka, A., Skarydova, L., Wsol, V. 2009. Hydrophobic interaction chromatography – significant step in purification of enzymes, XXV. *Xenobiochemické symposium*, Mikulov.

- 6.** Skarka, A., Skarydova, L., Stambergova, H., Wsol, V. 2010. Anthracyclines, their metabolism in human liver microsomes and participation of the new microsomal carbonyl reductase, 15th International Meeting of Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Lexington, Kentucky, USA.

- 7.** Skarka, A., Skarydova, L., Wsol, V. 2011. Different approaches in discovering of new proteins, XXVI. Xenobiochemické sympozium, Trenčianské Teplice, Slovensko.

Publikace č. 1

Publikace č. 2

Publikace č. 3