

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Klonování a exprese lidské

AKR1A1

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Kořínková Petra

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.“

datum

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. Ing. Wsólovi Ph.D., Mgr. Haně Štambergové a Mgr. Tereze Lundové za trpělivost a odbornou pomoc během vypracování této diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Petra Kořínková

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

Název diplomové práce: Klonování a exprese lidské AKR1A1

Aldo–ketoreduktasa 1A1 (AKR1A1) je monomerní cytosolický enzym patřící do skupiny karbonyl redukujících enzymů, nadrodiny aldo–ketoreduktas. Rodina aldo–ketoreduktas se významně podílí na redukčních reakcích endogenních substrátů i první fáze biotransformace xenobiotik. V lidském organismu se nachází 15 zástupců této velké rodiny, které lze nalézt v různých tkáních. Největší zastoupení mají v hepatocytech a renálních buňkách.

AKR1A1 katalyzuje reakce aromatických i alifatických aldehydů na jejich odpovídající alkoholy. Z endogenních látek je jeho substrátem mevalonát. Jeho významnými substráty jsou i některá léčiva ze skupiny antracyklinových antibiotik – doxorubicin a daunorubicin. Dále se podílí na biotransformaci sorbitolu a rozvoji diabetických komplikací.

Příprava rekombinantního enzymu byla provedena v *E. coli* za pomoci expresního vektoru pET28b(+). Izolovaná cDNA byla namnožena polymerasovou řetězovou reakcí, katalyzována Phusion Hot Start II polymerasou za přítomnosti specifických primerů, obsahujících restrikční místa pro endonukleasy *NdeI* a *XhoI*, kterými byly naštěpeny purifikované produkty PCR i plasmid. Takto naštěpené produkty byly pomocí DNA-ligasy zaligovány a transformovány do kompetentních buněk *E. coli* kmen HB101 metodou tepelného šoku. K expresi proteinu byly využity buňky *E. coli* kmen BL21. Indukce byla provedena pomocí isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu. Koncentrace enzymu byla stanovena metodou dle Bradforda a enzym byl purifikován na purifikátoru Äcta. Ověření aktivity proběhlo inkubací s *p*-nitrobenzaldehydem.

klíčová slova: AKR1A1, karbonyl redukující enzymy, rekombinantní enzym

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Petra Kořínková

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

Title of diploma thesis: Cloning and expression of human AKR1A1

The aldo-keto reductase 1A1 (AKR1A1) is monomeric cytosolic enzyme from aldo-keto reductase superfamily (AKR) with carbonyl reducing activity. The members of AKR superfamily have an important role in reductive reactions in metabolism of some endogenous substrates and in the first phase of biotransformation of xenobiotics. Fifteen members of this large family have been found in the human body. These proteins are expressed in different tissues within all our organism. The highest concentrations of proteins have been detected in the hepatocytes and in the renal cells.

The function of AKR1A1 is to catalyse reductive reactions of aromatic and aliphatic aldehydes to the respective alcohols. Among its important substrates belong mevalonate (endogenous substance) and some drugs like anthracycline antibiotics – doxorubicin and daunorubicin. AKR1A1 also participates in biotransformations of sorbitol and in the development of diabetes complications.

Preparation of recombinant protein was performed in *E. coli* with using of pET28b(+) as an expression vector. Isolated cDNA was reproduced by polymerase chain reaction (PCR) catalysed by Phusion Hot Start II polymerase with specific forward and reverse primers, with restriction sites for endonuclease *NdeI* and *XhoI*. Those ones were used for induction of the purified products of PCR into the treated vector. The products were ligated by DNALigase and transformed into competent cells by the heat shock method. In order to express the protein a strain of *E. coli* BL21 was used and reaction was induced by isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranoside. Concentration of protein was determined by Bradford method and protein was purified on Äcta purifier. Verification of the protein activity was made by incubation with 4-nitrobenzaldehyde.

key words: AKR1A1, carbonyl-reducing enzymes, recombinant enzymes

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	6
1. Teoretická část.....	9
1.1 Biotransformace v organismu	9
1.2 Biotransformační enzymy	9
1.2.1 První fáze biotransformace	10
1.2.2 Druhá fáze biotransformace.....	14
1.3 Karbonyl redukující enzymy	16
1.3.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	17
1.3.1.1 Lidské karbonylreduktasy	18
1.3.2 Nadrodina aldo-ketoreduktas (AKR).....	19
1.3.2.1 Lidské aldo-ketoreduktasy	19
1.3.3 Aldo-ketoreduktasa 1A1 (AKR1A1).....	21
1.3.3.1 Charakteristika AKR1A1	22
1.3.3.2 Funkce AKR1A1	23
1.3.3.3 Polymorfismus AKR1A1	24
2 Cíl Práce.....	25
3 Praktická část	26
3.1 Použitý materiál	26
3.1.1 Přístroje.....	26
3.1.2 Pomůcky	27
3.1.3 Chemikálie	27
3.1.4 Biologický materiál.....	28
3.1.5 Enzymy	29
3.1.6 Markery.....	29
3.1.7 Kity	29
3.1.8 Pufry a zásobní roztoky	29
3.1.8.1 Zásobní roztoky.....	29
3.1.8.2 Složení pufřů	29
3.1.8.3 Složení roztoků pro SDS elektroforézu proteinů.....	30

3.1.9 Živná média	31
3.1.9.1 <i>Luria – Bertani médium</i>	31
3.1.9.2 <i>Luria – Bertani médium s agarem</i>	31
3.2 Pracovní postupy	31
3.2.1 Namnožení plasmidové DNA	31
3.2.1.1 <i>Namnožení E coli DH10B s plasmidem pDNR-LIB</i>	31
3.2.1.2 <i>Příprava plasmidu pET28b(+)</i>	32
3.2.2 Izolace plasmidové DNA	32
3.2.2.1 <i>Velká purifikace plasmidu pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit</i>	32
3.2.2.2 <i>Mini purifikace pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit</i>	33
3.2.3 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	33
3.2.4 Analýza DNA	35
3.2.4.1 <i>Horizontální elektroforéza</i>	35
3.2.4.2 <i>Stanovení koncentrace DNA</i>	36
3.2.5 Vložení sekvence cDNA AKR1A1 do vektoru	36
3.2.5.1 <i>Purifikace insertu cDNA s AKR1A1</i>	37
3.2.5.2 <i>Restrikce plasmidu pET-28b(+)</i> a kódové sekvence AKR1A1	38
3.2.5.3 <i>Ligace kódové sekvence AKR1A1 s pET-28b(+)</i>	39
3.2.6 Transformace kódové sekvence do buněk <i>E. coli</i> HB101	39
3.2.6.1 <i>Příprava kompetentních buněk E coli</i>	39
3.2.6.2 <i>Vlastní transformace vektorem</i>	40
3.2.6.3 <i>Kultivace E. coli HB101 na agaru</i>	40
3.2.7 Sekvenace	40
3.2.8 Exprese proteinu	41
3.2.8.1 <i>Příprava buněčné kultury pro expresi</i>	41
3.2.8.2 <i>Exprese proteinu AKR1A1</i>	41
3.2.9 Purifikace proteinu	42
3.2.9.1 <i>Příprava buněčného lyzátu</i>	42
3.2.9.2 <i>Purifikace na purifikátoru Äkta</i>	42
3.2.10 Vertikální elektroforéza bílkovin	42
3.2.10.1 <i>Příprava gelů a vzorků</i>	42
3.2.10.2 <i>Elektroforéza vzorků</i>	43
3.2.10.3 <i>Detekce proteinů v gelu</i>	43
3.2.11 Uchování proteinu	44

3.2.12 Měření koncentrace proteinu podle Bradforda	44
3.2.13 Měření aktivity připraveného enzymu	45
4 Výsledky	47
4.1 Příprava enzymu	47
4.2 Měření aktivity enzymu	54
5 Závěr	57
Seznam zkratk	58
Seznam použité literatury	60

1. Teoretická část

1.1 Biotransformace v organismu

Lidský organismus přichází denně do kontaktu s celou řadou exogenních sloučenin. Xenobiotika (z řeckého *xenos* = cizí) se do těla dostávají ze vzduchu, vody i potravy. Mezi záměrně přijímaná xenobiotika patří léčiva, ale i běžné látky, př. kofein z kávy. Nezáměrně se do těla dostávají nejčastěji průmyslové chemikálie, například pesticidy, zbytky hnojiv, detergenty a barviva všeho druhu. Značné množství xenobiotik je přírodního původu, jako třeba alkaloidy a jiné sekundární metabolity rostlin, toxiny plísní, rostlin i živočichů. Mnoho z těchto látek je toxických a mohou působit i jako karcinogeny nebo mutageny. Aby nedošlo k poškození organismu, vyvinulo se několik mechanismů k vyloučení xenobiotik z těla.

Biotransformace je jedním z mechanismů eliminace těchto škodlivin. Nejčastěji probíhá v játrech, plicích, kůži, ledvinách a GITu omezeně pak i v dalších tkáních. Lipofilita je jednou ze základních vlastností xenobiotik, která významným způsobem ovlivňuje vstřebávání i eliminaci. Během metabolismu lipofilních látek dochází k jejich přeměně na polárnější produkty, které mají omezenou možnost interakce s organismem a je možné je snáze vyloučit z organismu (Skálová a kol., 2011).

Při metabolické přeměně xenobiotik dochází k jejich deaktivaci, detoxikaci, aktivaci a někdy i ke zvýšení jejich toxicity. K vyloučení všech exogenních látek nevede jen jedna cesta. Jen minimum xenobiotik je vyloučeno v nezměněné podobě. Všechny ostatní prochází fázemi biotransformace. Právě podle vlastností jednotlivých substrátů probíhají biotransformační reakce v různém pořadí (Lincová a kol., 2007).

1.2 Biotransformační enzymy

Na biotransformačních reakcích se podílí celá řada enzymů. Některé biotransformační enzymy jsou uvedeny v tabulce 1. Některé jsou specifické právě pro biotransformaci xenobiotik, jiné se uplatňují i v metabolismu endogenních látek, například u bilirubinu, steroidních hormonů, acetonu, eikosanoidů, vitamínu A, mastných a žlučových kyselin. Enzymy pro endogenní substráty mají vysokou specifitu. Často přeměňují pouze jedinou látku, k níž mají vysokou afinitu. Tyto enzymy lze také nalézt pouze ve tkáních, kde se vyskytují jejich substráty. Naproti tomu enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik se nacházejí v celé řadě tkání a mají

široké spektrum substrátů. Tyto enzymy mají proto méně specifické vazebné místo a jeden enzym může katalyzovat přeměnu i desítek substrátů. Většina těchto enzymů je také ve tkáních přítomna neustále a jejich syntéza není závislá na přítomnosti a množství jejich substrátů (Kvasničková, 1995).

Tabulka 1: Příklady enzymů obou fází biotransformace

Fáze I		
oxidace	redukce	hydrolýza
cytochromy P450 flavinmonooxidasy alkoholdehydrogenasy aldehyddehydrogenasy aldehydoxidasy xanthinoxidasy mono/diaminoxidasy peroxidasy	karbonyl redukující enzymy – aldo-ketoreduktasy – dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) – dehydrogenasy/reduktasy se středním řetězcem (MDR) cytochromy P450 chinonoxidoreduktasy	esterasy peptidasy, amidasy epoxidhydrolasy
Fáze II - konjugace		
UDP–glukuronyltransferasy glutathion–S–transferasy sulfonyltransferasy N–acetyltransferasy N– , O– a S– methyltransferasy aminoacyltransferasy thiotransferasy		

1.2.1 První fáze biotransformace

V první fázi biotransformace dochází k přeměně xenobiotika na polárnější metabolit. K tomu je využívána řada chemických reakcí – oxidace, redukce, hydrolýza nebo hydratace (Skálová a kol., 2011).

Nejčastější reakcí první fáze je **oxidace**. Mezi oxidační reakce se řadí hydroxylace, dealkylace, oxidační deaminace, oxidační dehalogenace, N– a S– oxidace, oxidace alkoholů a aldehydů. Oxidace probíhá především v endoplasmatickém retikulu

(někdy i v cytosolu) a nejčastěji je katalyzována monooxidasami, z nichž nejvýznamnější skupinou jsou cytochromy P450 a flavinové monoxygenasy (Skálová a kol., 2011).

Cytochromy P450 (CYP) jsou mikrosomální hemoproteiny s nejširším spektrem substrátů. Nacházejí se téměř ve všech tkáních, nejvíce v hepatocytech. Jejich název je odvozen od spektrálního maxima při absorpci světla, tj. při 450 nm. Obecně katalyzují reakci začlenění jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu. Jejich prostetickou skupinou je Fe-protoporfyrin IX. CYP jsou často indukovány nebo inhibovány interakcemi s léčivy nebo jinými látkami. Hrají důležitou roli v délce a intenzitě účinku u řady léčiv a klíčovou roli v detoxikaci xenobiotik (Kvasničková 1995). Z endogenních látek jsou jejich substráty například lipofilní vitamíny, mastné kyseliny, cholesterol, steroidní hormony, žlučové kyseliny a eikosanoidy. Enzymy, které metabolizují endogenní látky, většinou nemají substráty mezi xenobiotiky (mimo strukturně velmi podobných látek) a naopak. Příklady některých xenobiotických substrátů jsou uvedeny v tabulce 2 (Skálová a kol., 2011).

U halogenových sloučenin existují tři cesty biotransformace: redukční dehalogenace, oxidační dehalogenace a odstranění dvou sousedních halogenů za vzniku dvojné vazby mezi uhlíky. Redukční dehalogenace spočívá v nahrazení halogenu vodíkem. Produktem oxidační dehalogenace je aldehyd nebo keton. Všechny tři cesty dehalogenace jsou katalyzovány cytochromem P450 (Parkinson a kol., 2001).

Tabulka 2: Příklady substrátů izoform CYP

1A1	Polycyklické nenasycené uhlovodíky (PAH)	2C9	ibuprofen warfarin sartany valproát	2E1	acetaminofen ethanol isofluran chloroform
1A2	theofylin kofein tamoxifen warfarin	2C19	diazepam omeprazol	3A4	dexamethason amiodaron indinavir lidokain lovastatin verapamil
2B6	cyklofosfamid ifosfamid propofol	2D6	kodein lidokain fluoxetin metoprolol		

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou mikrosomální enzymy přítomné nejvíce v játrech, ledvinách a plicích. Jejich koenzymem je flavin adenin dinukleotid (FAD). V lidském těle je 5 zástupců FMO. Až na výjimky jsou reakce katalyzované FMO detoxikační (Kvasničková, 1995). Oxidují nukleofilní atomy síry, dusíku, selenu a fosforu u řady xenobiotik, například kokain, nikotin, metamfetamin, benzimidazoly a tyramin. Z léčiv jsou jejich substráty například klozapin, guanetidin, imipramin, olanzapin, chlorpromazin, metamizol, tamoxifen a cimetidin (Skálová a kol., 2011).

Mezi oxidační reakce patří také metabolismus ethanolu a dalších alkoholů za vzniku odpovídajících aldehydů. Přeměna je katalyzována alkoholdehydrogenasami a aldehyddehydrogenasami. Alkoholdehydrogenasy jsou cytosolické dimerní proteiny nacházející se ve všech tkáních organismu. Aktivita jednotlivých zástupců se liší vzhledem k velikosti molekuly substrátu. Aldehyddehydrogenasy oxidují aldehydy na příslušnou karboxylovou kyselinu a mají široké spektrum substrátů (Parkinson a kol., 2001).

Aldehydoxidasa i xanthinoxidasa jsou cytosolické flavoproteinové enzymy složené ze dvou identických podjednotek. Xanthinoxidasa se nachází v mnoha tkáních ve velkém množství. Aldehydoxidasa je obsažena prakticky pouze v hepatocytech. Substráty těchto oxidas jsou nejčastěji dusíkaté heterocyklické sloučeniny, například puriny, pyrimidiny a kyselina močová. Významně se uplatňují v efektu prvního průchodu játry (first-pass efekt) u léčiva 6-merkaptopurinu nebo u aktivace acykloviru a mytomycinu C. Obecně lze říci, že dobré substráty pro xanthinoxidasu a aldehydoxidasa jsou špatnými substráty pro cytochrom P450. Za určitých podmínek mohou tyto enzymy katalyzovat také redukce azo-, nitro- sloučenin a některých dalších látek (Parkinson a kol., 2001).

Monoaminoxidasy (MAO), diaminoxidasy (DAO) a polyaminoxidasy (PAO) jsou flavoproteiny, katalyzující oxidaci primárních, sekundárních a terciárních aminů. Nacházejí se v mozku, játrech, ledvinách, střevě a krevních destičkách, DAO navíc i v srdci. Jejich substráty jsou endogenní aminy (histamin a katecholaminy) i exogenní látky, například propranolol, primachin, haloperidol, tyramin, sumatriptan a další (Parkinson a kol., 2001).

Peroxidasy jsou různé hemoproteiny nacházející se v mnoha tkáních organismu nejvíce v erytrocytech, leukocytech a trombocytech. Jejich substráty mohou být fenoly, aromatické aminy, thioly, hydrochinony a polycyklické uhlovodíky. Peroxidasy se uplatňují u syntézy prostaglandinů z kyseliny arachidonové, ale i u zvýšení toxicity

benzo[a]pyrenu a aflatoxinu B jejich konverzí na příslušné epoxidy (Skálová a kol., 2011).

Redukční reakce se týkají celé řady substrátů obsahujících dvojnou vazbu, karbonylovou, disulfidovou, sulfoxidovou, chinonovou, peroxidovou, aminoxidovou, hydroxylaminovou, azo–, nitro– a nitroso– skupinu. U některých substrátů záleží na enzymu, který je transformuje, jestli podlehnou oxidaci nebo redukci (Skálová a kol., 2011).

Redukce sloučenin obsahujících azo– a nitro– skupiny probíhají převážně ve střevě a v hepatocytech. K redukci těchto sloučenin významně přispívá činnost střevní mikroflóry. Tyto reakce umožňují dvě skupiny enzymů: CYP a chinonoxidoreduktasy.

Biotransformace chinonových sloučenin v dnešní době přitahuje zvýšený zájem, jelikož jedna z cest jejich biotransformace katalyzovaná NADPH–cytochrom P450 reduktasou končí vznikem reaktivních forem kyslíku, odpovědných za oxidační stres organismu. Chinonové sloučeniny jsou postupně redukovány na semichinonové sloučeniny a dále na hydrochinony nebo zpětně převedeny na chinony. V této reakci je potřebný vzdušný kyslík a vznikají zde reaktivní formy kyslíku (Oppermann a kol., 2000). Chinonoxidoreduktasy jsou NAD(P)H dependentní flavoproteiny nacházející se v cytosolu. Katalyzují redukci chinonů i konjugovaných chinonů s glutathionem na hydrochinony bez vzniku nežádoucích semichinonů, čímž nedochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku (Parkinson a kol., 2001).

Redukční reakce zprostředkované cytochromem P450 probíhají v anaerobním prostředí. Reduktasovou aktivitu mají nejvíce enzymy z rodin 2B a 2E. Tato reakce je často aktivační, například u historického proléčiva prontosilu, který je touto cestou přeměněn na účinný sulfanilamid a některých protinádorových léčiv (například mytomicin C) v terapii tumorů vytvářejících hypoxické prostředí (Parkinson a kol., 2001) nebo také zvyšuje toxicitu substrátů (Skálová a kol., 2011).

Některé disulfidy jsou redukovány na thiolové sloučeniny nebo na dithiokarbamáty. Příkladem této reakce je disulfiramový efekt, které mají některá léčiva jako farmakologický účinek nebo nežádoucí účinek.

Původně se redukční reakce zprostředkované karbonyl redukujícími enzymy pokládaly za méně významnou součást biotransformace. V současnosti se výzkum zaměřuje právě na tyto enzymy, které mají v organismu také významnou roli.

Hydrolyze podléhají nejčastěji funkční deriváty různých karboxylových kyselin, například estery, amidy, thioestery, epoxidy, glykosidy, anhydridy, peptidy, bílkoviny

a nukleové kyseliny. Hydrolasy fungují bez kofaktorů i prostetických skupin a mohou hydrolyzovat i konjugáty z druhé fáze biotransformace (Skálová a kol., 2011).

Esterasy se nacházejí v krvi a dalších tkáních. Rozdělují se na tři skupiny: cholinesterasy, karboxyesterasy a paraoxonasy. Mezi nejtoxičtější substráty esterasy patří organofosfáty, které se kovalentně váží na acetylcholinesterasu. Esterasy hydrolyzují také některé endogenní sloučeniny, například diacylglycerol, palmitoyl-CoA, destičky aktivující faktor a další esterifikované lipidy. I další enzymy mohou mít esterasovou aktivitu, například aldehyddehydrogenasa. Esterasy působí často problémy při aplikaci léčiv esterové struktury, jelikož jsou tato léčiva rychle odbourávána (Skálová a kol., 2011).

Peptidasy se nacházejí v cytosolu i mikrosomech a hydrolyzují peptidovou vazbu mezi jednotlivými aminokyselinami. Jejich substráty jsou především endogenní. Rozdělují se na tři podskupiny. Aminopeptidasy hydrolyzují peptidovou vazbu na N-konci, karboxypeptidasy na C-konci a na specifických vnitřních místech štěpí peptidy endopeptidasy. Peptidasy se nejvíce nacházejí v krvi, méně pak ve tkáních (Parkinson a kol., 2001; Skálová a kol., 2011).

Epoxidhydrolasy mají schopnost vnést molekulu vody do epoxidů, čímž vznikají *trans*-dihydrodioly. Epoxidhydrolasy nemohou hydrolyzovat epoxidy, které jsou stericky bráněné objemnými substituenty, což je případ polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), konkrétně benzo[a]pyrenu, 7,8-dihydrodiol-9,10-oxidu, který je kancerogenní. Toxické nebo mutagenní účinky epoxidů jsou dány schopností vytvářet kovalentní vazby s proteiny a nukleovými kyselinami (Parkinson a kol., 2001).

1.2.2 Druhá fáze biotransformace

Během druhé fáze biotransformace, konjugační, dochází zpravidla k vytvoření polárnějších produktů, které se snáze eliminují z těla. Reakcí s endogenní látkou vznikají větší molekuly, konjugáty. Nejčastějšími enzymy, které katalyzují tyto reakce, jsou různé transferasy. Během konjugace musí dojít k aktivaci konjugačního činidla, což vyžaduje dodání energie. Konjugáty jsou zpravidla vylučovány močí, případně žlučí do stolice (Ledvina a kol., 2009). Xenobiotika nemusí nutně projít oběma fázemi biotransformace, například morfin je rovnou konjugován s kyselinou glukuronovou, avšak jeho deriváty jsou nejprve převedeny na morfin a pak teprve konjugovány (Parkinson a kol., 2001).

Nejčastější konjugační reakce u savců (kromě koček) je konjugace s kyselinou glukuronovou. Tato reakce je katalyzována UDP-glukuronyltransferasami. Jsou to mikrosomální enzymy, na rozdíl od ostatních enzymů 2. fáze biotransformace, které jsou cytosolické. Nachází se v různých tkáních, například játrech, ledvinách, mozku, kůži, slezině a nosní sliznici. Jejich substráty jsou sloučeniny obsahující hydroxylové, aminové, amidové, thiolové nebo karboxylové skupiny. Až 35 % konjugačních reakcí xenobiotik je katalyzováno těmito enzymy a tak dochází ke kompetici mezi substráty. Jen u některých léčiv ze skupiny aromatických aminů, dochází ke zvýšení jejich toxicity po glukuronidaci. Tyto konjugáty se vylučují do moči, v jejímž kyselém pH se mohou hydrolyzovat a uvolnit tak toxické produkty, které mohou způsobit karcinom močového měchýře (Skálová a kol., 2011).

Glutathiontransferasy jsou dimerní enzymy, katalyzující konjugaci elektrofilních substrátů s tripeptidem glutathionem. Glutathion se skládá z glycinu, cysteinu a glutamátu. Enzymy jsou přítomné ve většině tkání, nejvíce v játrech, střevech, ledvinách, varlatech, nadledvinách a plicích. Konjugace s glutathionem je významná detoxikační reakce, jelikož elektrofilní jsou reaktivní a mohou se vázat na bílkoviny a nukleové kyseliny (Parkinson a kol., 2001). Jejich substráty jsou epoxidy, α , β -nenasycené ketony, alkyl a arylhalogenidy, isokyanáty a další látky.

Sulfonyltransferasy katalyzují konjugaci substrátu se sulfonem za vzniku esterů. Donorem sulfonové skupiny je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS). Nacházejí se v mnoha tkáních, především v játrech, ledvinách, plicích, střevě, krevních destičkách a v mozku. Substrátem těchto enzymů jsou alkoholy, fenoly a některé aromatické aminy (např. anilín). Karboxylové kyseliny nejsou substrátem pro sulfonylaci, ale mohou kompetitivně inhibovat sulfonyltransferasu. Produkty reakce jsou nejčastěji vylučovány močí, některé se mohou vyloučit i žlučí a prodělat enterohepatální cirkulaci (Parkinson a kol., 2001).

Konjugace s aminokyselinami se dělí na dvě cesty. Substráty s karboxylovou skupinou jsou konjugovány s aminoskupinou glycinu, glutaminu nebo taurinu. S karboxylovou skupinou serinu nebo prolinu jsou konjugovány substráty obsahující aromatickou hydroxylaminovou skupinu. Mimo vyjmenovaných aminokyselin jsou do biotransformace zapojeny ornithin, arginin, histidin, aspartát a další. Enzymy katalyzující tyto reakce jsou aminoacyltransferasy. Jejich substráty jsou žlučové kyseliny a další karboxylové kyseliny (Parkinson a kol., 2001).

Aromatické aminy a hydraziny jsou nejčastěji konjugovány s acetátem pomocí enzymu N-acetyltransferasa. Reakce vyžaduje přítomnost acetyl-koenzymu A. Produkty reakcí bývají stejně jako u methylace lipofilnější než substráty a jsou eliminovány žlučí. Enzymy se nacházejí nejvíce v hepatocytech, méně pak v dalších tkáních. Aktivity N-acetyltransferas jsou významným způsobem ovlivňovány genetickým polymorfismem. Na základě těchto rozdílů lze lidskou populaci rozdělit na pomalé, rychlé a ultrarychlé metabolizátory, což je důležité zohlednit při podání některých léčiv, například u isoniazidu (Parkinson a kol., 2001).

Methylace je méně častým příkladem konjugace. Enzymy této reakce jsou methyltransferasy s kofaktorem S-adenosylmethioninem. Substráty podléhající methylaci jsou nejčastěji endogenní fenoly, alifatické i aromatické aminy, catecholaminy a dusíkaté heterocykly. Vzácnou C-methylací je konverze benzo[a]pyrenu na 6-methylbenzo[a]pyren. Produkty této reakce jsou lipofilnější než substráty, které do reakce vstupují (Parkinson a kol., 2001; Skálová a kol., 2011).

1.3 Karbonyl redukující enzymy

Karbonylová skupina je součástí řady přírodních i syntetických sloučenin, u kterých významným způsobem ovlivňuje jejich biologickou aktivitu. Karbonylové sloučeniny vznikají i během první fáze biotransformace a metabolismu endogenních látek, například při peroxidaci lipidů vzniká akrolein, 4-hydroxynonenal, 4-oxononenal a malondialdehyd. Karbonylové sloučeniny mohou představovat hrozbu pro organismus, jelikož mají schopnost vazby s makromolekulami v buňkách. Kovalentní vazbou se mohou navázat na sekundární aminové a thiolové skupiny aminokyselin. Kromě toho jsou některé aldehydy mutagenní, schopné interakce s DNA, hlavně přes N-1 atom a C-2 aminoskupinu guaninu (O'Connor a kol., 1999).

Aldehydová skupina bývá oxidována nejčastěji na příslušnou kyselinu pomocí aldehyddehydrogenas, nebo redukována na příslušný primární alkohol pomocí aldehydreduktas z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR) nebo dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Ketonová skupina je méně reaktivní než skupina aldehydová. Bývá redukována ketonreduktasami nebo alkoholdehydrogenasami na příslušné sekundární alkoholy (Oppermann a kol., 2000).

Většinu karbonyl redukujících enzymů lze zařadit do jedné ze dvou nadrodin, a to aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem. Mnoho enzymů z obou nadrodin má společně některé substráty. Jedna z nejdůležitějších funkcí karbonyl

redukujících enzymů spočívá v ochraně organismu před akumulací toxických karbonylových sloučenin, například aflatoxinu B, chinonových sloučenin, aldofosfamidů, tripeptidylaldehydů a produktů vznikajících spalováním tabáku (Oppermann a kol., 2000). Z léčiv jsou těmito enzymy biotransformovány například warfarin, haloperidol, pentoxifylin, menadion, doxorubicin a daunorubicin při jejich eliminaci. Na druhou stranu některá léčiva jsou pomocí karbonylredukujících enzymů aktivována z proléčiv na aktivní formy, například pentoxifylin, chloralhydrát, propranolol a dolasetron (Hoffmann a Maser, 2007).

Zástupci z obou nadrodin se také podílejí na metabolické dráze syntézy tetrahydrobiopterinu, který je důležitým kofaktorem syntézy katecholaminů a produkce oxidu dusnatého. Výzkumy na jiných živočišných druzích ukazují, že karbonylredukující enzymy se velkou měrou uplatňují u detoxikace produktů lipoperoxidace, zvláště v nervovém systému. Hromadění těchto toxických produktů je jednou z příčin některých neurodegenerativních poruch, například Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Hoffmann a Maser, 2007).

Významnými inhibitory karbonylredukujících enzymů jsou rostlinné flavonoidy (Hoffmann a Maser, 2007).

1.3.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

SDR je široká nadrodina enzymů podílejících se mimo jiné na redukcii karbonylových sloučenin. V současné době se do ní řadí asi 163 tisíc enzymů, nacházejících se v eukaryotních i prokaryotních organismech. Enzymy této nadrodiny jsou tvořeny v průměru 250 až 350 aminokyselinami. Často se vyskytují ve formě homodimerů nebo homotetramerů. Některé jsou membránově vázané, jiné jsou cytosolické. Původně se SDR enzymy rozdělovaly do dvou rodin, na „classical“ s délkou okolo 250 aminokyselin a „extended“ s 350 aminokyselinami. Později byly přidány další tři rodiny: „complex“, „intermediate“ a „divergent“ (Hoffmann a Maser, 2007). Dnes se nadrodina SDR člení na 7 rodin: „classical, extended, atypical, intermediate, divergent, complex a unassigned“ (údaj z roku 2013). České ekvivalenty názvů nebyly dosud přijaty, proto jsou v diplomové práci ponechány v původní anglické verzi.

Všechny SDR enzymy obsahují typický tzv. Rossmannův záhyb s centrálními 6 až 7 β -listy, obklopenými z obou stran třemi α -šroubovicemi. Kofaktor se váže na N-terminální část, která je bohatá na glycin. Jako kofaktor využívají NAD(H) nebo

NADP(H). Celkově se jednotlivé enzymy shodují pouze v 15 – 30 % aminokyselinové sekvence. Obecně mají SDR enzymy aktivní místo tvořené katalytickou tetradou Tyr, Lys, Ser, Asn ve střední části. Jednotlivé rodiny SDR se liší ve vzdálenostech mezi třemi glycinovými zbytky na N – konci (Persson a Kallberg, 2013).

Podílejí se na metabolismu steroidů, sacharidů, aromatických uhlovodíků, prostaglandinů, přeměny signálních molekul a dalších sloučenin (Hoffmann a Maser, 2007).

1.3.1.1 Lidské karbonylreduktasy

Jedním z prvních popsaných enzymů této nadrodiny byla **lidská karbonylreduktasa 1** (CBR1). Je to cytosolický monomerní enzym, který je široce distribuován v organismu. Byla nalezena v buňkách jater, ledvin, žaludku, tenkého střeva, kůže, hladké svaloviny, také v nervových buňkách a gliových buňkách centrálního nervového systému (CNS). Menší množství enzymu byla nalezena také v dutině ústní, jícnu, v buňkách kosterního svalstva a mozečku. Poprvé byl tento enzym izolován z mozku. CBR1 má širokou substrátovou specifitu, která odkazovala spíše na její zařazení k nadrodině AKR (Hoffmann a Maser, 2007). Struktura ale odhalila významnější podobnost s SDR. Mezi její významné substráty patří chinonové sloučeniny, například menadion, ubichinon a fenantrenchinon. Dále redukuje aromatické aldehydy, obsahující elektron akceptorovou skupinu (např. methylglyoxal, *p*-nitrobenzaldehyd), ketoaldehydy (např. fenylglyoxal) a některé biogenní aminy. V lidském organismu se může vyskytovat ve třech isoformách, lišících se modifikací na jednom z lysinových zbytků. U jiných savců nebyly tyto modifikace pozorovány. Inhibitorem CBR1 jsou například některé flavonoidy (kvercetin, rutin), indometacin, furosemid, dikumarol (Hoffmann a Maser, 2007).

Lidská karbonylreduktasa 3 (CBR3) je monomerní cytosolická NADPH dependentní oxidoreduktasa. Nachází se v celé řadě tkání, nejvíce v buňkách vaječníků, slinivky břišní, plic a střeva (Ebert a kol., 2010). Její biologická funkce není dosud plně objasněna, nicméně se ukazuje, že exprese se zvyšuje v zánětem poškozené tkáni, což naznačuje její možné zapojení do tohoto procesu. Enzym se také podílí na biotransformaci antracyklinových antibiotik. CBR3 vykazuje polymorfismus mezi některými etnickými skupinami. U černošské populace je jeho hladina v jaterní tkáni vyšší než u bělošské, což může souviset s kardiotoxicitou antracyklinů, pro kterou je černošský původ rizikovější (Zhang a Blanco, 2009).

Lidská kabonylreduktasa 4 (CBR4) je mitochondriální NADPH dependentní reduktasa. Jejími substráty jsou *ortho*- a *para*-chinonové sloučeniny, ale prakticky se neúčastní redukce jiných karbonylových skupin. Enzym se nachází v hepatocytech a ledvinných buňkách (Endo a kol., 2008).

1.3.2 Nadrodina aldo-ketoreduktas (AKR)

Zástupci nadrodiny aldo-ketoreduktas se podílejí na biotransformaci jak endogenních, tak exogenních sloučenin. V současnosti je do AKR nadrodiny zařazeno více než sto padesát enzymů. Podle sekvenční identity se nadrodina AKR rozděluje na 15 rodin. Lidské AKR jsou v rodinách 1, 6 a 7. Do této nadrodiny jsou zařazeny aldosoreduktasy, aldehydreduktasy, dihydrodioldehydrogenasy a také některé relativně nově objevené reduktasy (Mindnich a Penning, 2009). Enzymy nadrodiny AKR jsou NAD(P)(H) dependentní a vyznačují se společným 3D uspořádáním $(\alpha/\beta)_8$ soudku, který je tvořen osmi α -šroubovicemi a β -listem z osmi řad a je obklopen třemi vysoce pružnými smyčkami. Aktivní místo je lokalizované na C-terminálním konci proteinu a skládá se z katalytické tetrády aminokyselin Tyr, Lys, Asp, His (Penning a Drury, 2007). Většina členů se vyskytuje ve formě monomerů, pouze někteří zástupci z rodin 2, 6 a 7 se formují do multimerů. Není dosud jasné, zda je kvarterní struktura nezbytná pro jejich aktivitu. Enzymy mají velmi široké spektrum substrátů. Zahrnuje monosacharidy, kortikosteroidy, aldehydy, ketony, prostaglandiny, prekuzory žlučových kyselin, některé karcinogeny včetně jejich metabolitů, například *trans*-dihydrodioly, metabolity nikotinu, dialdehydy aflatoxinů. Mnohé enzymy mají shodné některé substráty (O'Connor a kol., 1999).

Enzymy AKR rodiny se vyznačují širokou druhovou specifitou, od prokaryotických organismů, přes houby, rostliny a obratlovce. U savců se nacházejí především zástupci z rodin AKR1 a AKR7. V lidském organismu se pak nacházejí tyto zástupci: 1A1, 1B1, 1B10, 1B15, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1D1, 1E2, 6A3, 6A5, 6A9, 7A2 a 7A3. U alkoholdehydrogenasy, byla jako u prvního enzymu této rodiny, zjištěna kompletní primární sekvence aminokyselin (Mindnich a Penning, 2009).

1.3.2.1 Lidské aldo-ketoreduktasy

Experimentálně byla prokázána přítomnost všech patnácti lidských AKR v buňkách ledvin a varlat. V jaterní tkáni chyběla jen 1B1. Ve všech ostatních tkáních

se nacházely jen některé enzymy. V mozkové tkáni byla vysoká hladina 1A1, 1B1 a 7A2, naopak 1C1 a 1C4 tam nebyla nalezena vůbec (O'Connor a kol., 1999).

AKR1B1, známá také pod názvem aldoreduktasa, redukuje přednostně aldopentózy a aldohexózy, ale i řadu dalších substrátů, za přítomnosti NADPH. Ve srovnání s 1A1 má 1B1 u řady substrátů nižší aktivitu, některé ale metabolizuje stejně efektivně jako 1A1 (například akrolein, daunorubicin, chlorbenzaldehyd). V nejvyšší koncentraci se nachází v buňkách varlat a kosterních svalů a nalezena byla i ve všech ostatních orgánech, kromě jater. Výjimku tvoří játra vystavená dlouhodobému působení ethanolu, kde se nacházela 1B1 ve zvýšeném množství, oproti 1A1, která byla naopak v množství nižším (O'Connor a kol., 1999).

AKR1B10 je nejvíce exprimována v nádorové tkáni, konkrétně u karcinomu prsu, plic a kolorektálního karcinomu, u nichž se 1B10 řadí mezi nádorové markery. Jejím inhibítorem jsou prostaglandiny, které mohou mít potenciál inhibovat 1B10 v nádorové tkáni a tím eliminovat její vliv na rozvoj rezistence na léčbu (Pérez-Sala a kol., 2011). Mezi její substráty se řadí retinalaldehyd, glycerinaldehyd, antracykliny a další (Ruiz a kol., 2011).

AKR1B15 byla nalezena v buňkách oka a varlat. Její funkce ani substráty nejsou dosud známy (Salabei a kol., 2011).

AKR1C1-4 jsou dihydrodioldehydrogenasy, které převážně katalyzují oxidaci *trans*-dihydrodiolů polycyklických aromatických uhlovodíků. Zásadní roli mají v metabolismu androgenů a estrogenů a podílí se na vzniku hormon dependentních onemocnění. 1C4 zasahuje také do metabolismu žlučových kyselin, a podílí se i na metabolismu antagonisty opiátů, naltrexonu. K ostatním karbonylovým sloučeninám mají jen velmi malou afinitu. Přítomnost 1C1 se omezuje na játra, varlata a ledviny, 1C2 a 1C3 jsou nejvíce ve tkáních prsů a prostaty a 1C4 se nalézá pouze v jaterní tkáni (O'Connor a kol., 1999; Skálová a kol., 2011).

AKR1D1 je označována jako Δ 3,4-ketosteroid-5 β -reduktasa a hraje zásadní úlohu v syntéze žlučových kyselin, u kterých je důležitá 5 β konfigurace pro jejich emulgační vlastnosti. Obecně lze charakterizovat funkci 1D1 jako stereospecifickou redukci dvojně vazby v ketosterolech. Nejvíce se tento enzym vyskytuje v hepatocytech (Mindnich a kol., 2011).

AKR1E2 byla nalezena pouze v buňkách varlat. Vykazuje velmi nízkou nebo žádnou aktivitu u substrátů typických pro AKR (glycerinaldehyd, *p*-nitrobenzaldehyd, steroidy). Její funkce ani substráty nejsou dosud objasněny (Barski a kol., 2008a).

Do rodiny AKR6 se řadí tři lidské enzymy: **AKR6A3**, **AKR6A5** a **AKR6A9**. Tyto enzymy jsou β podjednotkami napět'ově řízeného draslíkového kanálu a modulují otevření kanálu. Velmi silně se váží s kofaktorem NADPH a mají velice slabou katalytickou aktivitu s typickými substráty AKR (Barski a kol., 2008b).

AKR7A2 je jeden z nejrozšířenějších enzymů z této nadrodiny. Vysoké hladiny se nacházejí v ledvinách, mozku, játrech, varlatech a v tenkém střevě. Nižší hladiny byly nalezeny v srdci, kosterních svalech, prostatě a slezině, nízké hladiny pak v plicní tkáni a pankreatu. Enzym má vysokou afinitu k 2-chlorbenzaldehydu, také k objemnějším diketonovým sloučeninám a bicyklickým strukturám, zvláště pokud mají karbonylovou skupinu na některém z kruhů, například u 1,2-naftochinonu, 9,10-fenantrenchinonu a 16-ketoestronu. Naopak nevykazuje žádnou aktivitu u substrátů majících hydroxylovou skupinu na steroidním jádře a u relativně malých diketonů, například u 1,2-cyklohexandionu. Při porovnání mezi jednotlivými lidskými zástupci AKR se ukázalo, že 7A2 má vyšší aktivitu u substrátů s karboxy-, nitro- nebo chlor-skupinami navázanými v poloze *ortho* na benzenovém jádře. Na rozdíl od 1A1, která má vyšší aktivitu u substrátů se substituenty v polohách *para* nebo *meta*. Tato rozdílná aktivita byla pozorována na chlorbenzaldehydu, nitrobenzaldehydu a pyridinaldehydu, což naznačuje možnost existence vzájemné kooperace mezi oběma enzymy (O'Connor a kol., 1999).

AKR7A3 je enzym nacházející se v buňkách žaludku, ledvin, jater a slinivky. Spolu s AKR7A2 se podílí na redukci aflatoxinu B₁, i když aktivita 7A3 je zde mnohem vyšší (Barski a kol., 2009).

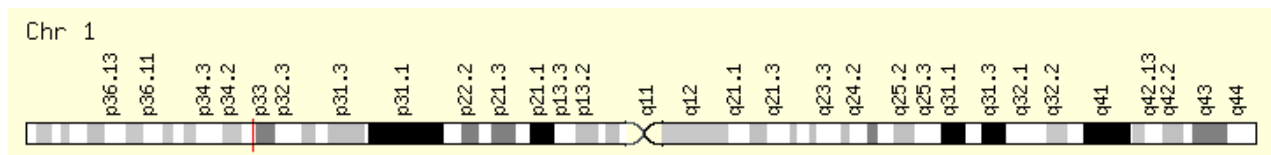
1.3.3 Aldo-ketoreduktasa 1A1 (AKR1A1)

AKR1A1 je enzym, známý také pod názvem alkoholdehydrogenasa, aldehydoreduktasa a dihydrodiolreduktasa 3. Jeho systematický název je alkohol NADP⁺ reduktasa. V enzymové nomenklatuře mu patří zařazení EC1.1.1.2, podle kterého enzym patří do třídy oxidoreduktas (EC1), podtřídy enzymů účinkujících na skupinu CH-OH (EC1.1), jejichž akceptorem je NAD⁺ nebo NADP⁺ (EC1.1.1). Obecná reakce katalyzovaná tímto enzymem je: aldehyd + NADPH + H⁺ → alkohol + NADP⁺. Reakce je závislá na přítomnosti zinku. V lidském organismu má nejvyšší koncentraci AKR1A1 v hepatocytech a ledvinných buňkách. Nižší hladina byla nalezena v mozku, varlatech a v buňkách tenkého střeva. V nižších koncentracích se také nachází v buňkách plic,

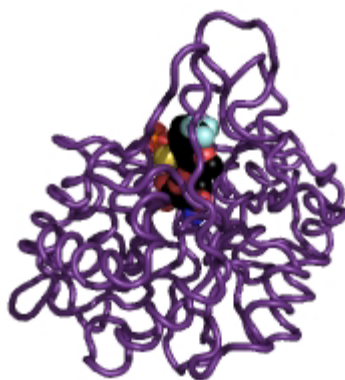
prostaty, sleziny, placenty a prsní žlázy. Enzym nebyl prakticky nalezen v srdci ani v kosterních svalech (databáze NCBI, 2013).

1.3.3.1 Charakteristika AKR1A1

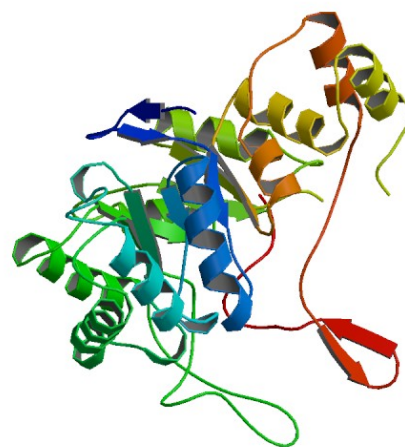
AKR1A1 je monomerní cytosolický enzym jehož mRNA obsahuje 1140 nukleotidů. V genu, který je lokalizován na prvním chromozomu, je kódováno 325 aminokyselin (Bohren a kol., 1989). Ve vzdálenosti 287 párů bazí od startovacího tripletu se nachází tzv. CAAT box, na místo obvyklejšího TATA boxu. V genové sekvenci je přítomno 8 exonů a obsahuje přibližně 20 kilobází (kb) genomové DNA. V některých zdrojích bylo uváděno 9 exonů. Tento rozpor patrně vznikl tím, že někteří autoři rozdělují první exon na 1A a 1B. Mezi nimi se nalézá intron o délce 1,3 kb. Nejdelší intron tohoto genu se nachází před druhým exonem a dosahuje délky 9,4 kb. Poslední exon obsahuje stop kodon a také polyadenylační signál. Délky exonů se pohybují mezi 73 až 328 párů bazí, introny pak od 180 párů bazí po již zmíněných 9,4 kb. Posttranskripčním sestřihem mohou vzniknout dvě různé molekuly mRNA, které kódují stejný protein. Rozdíl mezi nimi spočívá v exonu 1B, který obsahuje pouze jedna z molekul. U druhé molekuly na exon 1A navazuje rovnou exon 2. Exon 1B se skládá ze 128 párů bazí. Nebyla zjištěna rozdílnost distribuce obou mRNA mezi jednotlivými tkáněmi (Barski a kol., 1999).



Obrázek 1: Lokace genu pro AKR1A1 (červená čárka) (Gene Cards databáze, 2013)



Obrázek 2: Komplex enzymu, kofaktoru a inhibitoru (Trust Genome, 2013)



Obrázek 3: Sekundární struktura AKR1A1 (Protein data bank, 1999)

1.3.3.2 *Funkce AKR1A1*

Úkolem AKR1A1 je katalyzovat NADPH dependentní reakci aromatických i alifatických aldehydů na jejich odpovídající alkoholy. AKR1A1 má široké spektrum substrátů, převážně sloučeniny obsahující ve své molekule karbonylovou skupinu tj. u značného množství xenobiotik, endogenních látek a také léčiv. Obecně jsou jejími substráty sacharidy, glukuronidy a různé aldehydy vzniklé při metabolismu biogenních aminů a steroidních hormonů. Jejími endogenními substráty jsou například mevalonát, γ -hydroxybutyrát a glyceraldehyd, který redukuje na glycerol (Barski a kol., 1999).

Velmi vysokou enzymovou aktivitu vykazuje AKR1A1 u sukcinát-semialdehydu, 4-karboxybenzaldehydu, 3-karboxybenzaldehydu, 4-nitrobenzaldehydu, 3-nitrobenzaldehydu, pyridin-3-aldehydu, pyridin-4-aldehydu, 4-hydroxynonenalu, fenyglyoxalu, methylglyoxalu, hexan-2,3-dionu, 1,2-naftochinonu, 16-ketoestronu a D-glukuronové kyseliny. Z léčiv patří mezi jeho substráty například antracyklinová chemoterapeutika doxorubicin a daunorubicin (Barski a kol., 1999).

Spolu s aldosareduktasou se podílí na rozvoji diabetických komplikací, přeměnou glukosy na sorbitol. Také hraje určitou roli při aktivaci polycyklických aromatických uhlovodíků *trans*-dihydrodiolů, případně i dalších prokarcinogenů (O'Connor a kol., 1999).

Studie Abedirovy vědecké skupiny (2012) naopak naznačuje, že zvýšená exprese tohoto enzymu chrání plicní tkáň před účinky polycyklických aromatických uhlovodíků. Bylo zjištěno, že buňky, které produkují enzym ve větší míře, jsou odolnější vůči působení některých PAH, jelikož je konvertují na méně toxické *ortho*-chinony. Testy proběhly na lidských bronchiálních epiteliálních buňkách a na buňkách lidského plicního adenokarcinomu. Bronchiální epiteliální buňky mají nízkou bazální sekreci tohoto enzymu. Testovala se doba jejich přežití při vystavení vysoké koncentraci PAH. Pro kontrolu byly použity opět bronchiální epiteliální buňky upravené tak, aby produkovaly enzym ve větší míře než při normální činnosti. Tyto modifikované buňky byly schopné přeměňovat PAH na *ortho*-chinony mnohem úspěšněji a dokázaly přežít. Jejich životnost byla srovnatelná s buňkami adenokarcinomu, které jsou schopné produkovat enzym ve větší míře přirozeně. Pro ověření výsledků byl použit specifický inhibitor enzymu AKR1A1, po jehož použití se úmrtnost buněk s vyšší produkcí enzymu zvýšila na úroveň buněk s normální produkcí. Tato studie naznačuje, že AKR1A1 podporuje vyšší odolnost buněk adenokarcinomů plic vůči působení PAH (Abedir a kol., 2012).

Mnoho substrátů AKR1A1 je společných i pro dalšího člena podrodiny AKR1A, a to konkrétně AKR1A2, byť vykazuje u některých substrátů nižší aktivitu než AKR1A1 (Barski a kol., 1999).

1.3.3.3 Polymorfismus AKR1A1

Jednotlivé jednonukleotidové polymorfismy AKR1A1 vykazují odlišnou aktivitu. Konkrétně byla tato vlastnost zkoumána v souvislosti s kardiotoxicitou doxorubicinu a daunorubicinu. AKR1A1 metabolizuje obě cytostatika na jejich příslušné alkoholy (doxorubicinol a daunorubicinol). Právě tyto alkoholy jsou odpovědné za kardiotoxické účinky obou cytostatik. Byly zkoumány vlastnosti dvou alelických variant enzymu ve srovnání s přirozenou variantou. Obě modifikované varianty enzymu vykazují nižší afinitu k substrátu (doxorubicin) oproti divokému typu. Je tedy možné, že polymorfismus enzymu AKR1A1 může být jedním z genetických markerů pro rozvoj kardiotoxicity po podání antracyklinových cytostatik (Riggs a kol., 2008).

2 Cíl Práce

Cílem mé práce byla příprava rekombinantní formy lidské AKR1A1. Toho bylo dosaženo pomocí následujících dílčích částí:

- Izolace cDNA z plasmidu pDNR-LIB, vloženého *E. coli* DH10B
- Namnožení kódové sekvence enzymu pomocí polymerasové řetězové reakce se specifickými primery
- Ošetření konců templátu restrikcčními endonukleasami a ligace do vektoru pET28b(+) s následnou transformací do *E. coli*, kmen HB101
- Ověření sekvenací a exprese v *E. coli* BL21
- Purifikace získaného enzymu AKR1A1
- Stanovení koncentrace AKR1A1
- Ověření substrátové specifity a aktivity získaného enzymu

3 Praktická část

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Přístroje

ÄKTApurifier		Amershan Biosciences
Analytické váhy	Scaltec SBC22	Sartorius
Autokláv		Vaposteri
Box s laminárním prouděním	Faster TWO 30	
Centrifuga	BiofugeStratos	Heraeus
Centrifuga	Minispin	Eppendorf
Hlubokomrazicí box	Herafreeze	Heraeus
Horizontální elektroforéza	Easycast B1	ThermoScientific
Horkovzdušný sterilizátor	BD 400	Binder
Inkubátor s třepací jednotkou	NB-205	n-Biotek
Inkubátor	INB 200	Memmert
Kahan		
Mikrovlnná trouba		Zanussi
Personal Thermal Cycler	MJ Mini	Bio-Rad
pH metr	Orion 410A	Thermo
Předvažovací váhy	PT310	Sartorius
Spektrofotometr	ND-1000	Nano Drop
Spektrofotometr	Infinite M200	Tecan
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultradestilační přístroj	Milli-Q	Millipore
Vertikální elektroforéza	Mini Protean 3	Bio-Rad
Vodní lázeň s termostatem	P5 + DC10	Thermo Haake
Výrobník ledové tříště	GB 1555	Brema
UV transluminátor s kamerou	GelDoc XR	Bio-Rad
Zdroj pro elektroforézu	PowerPac universal	Bio-Rad

3.1.2 Pomůcky

Laboratorní sklo: Erlenmayerovy baňky, kádinky různého objemu, odměrné válce různého objemu, zkumavky, odměrné baňky, lahve se šroubovacím víkem na média a pufry

Sterilní plastové pomůcky: Sterilní očkovací nástroj, Petriho misky, zkumavky se šroubovacím víčkem, titrační mikrodestičky

Amicon Ultra-4, Ultracel-10	Milipore
Automatické pipety + špičky (0,5 µl až 5 ml)	Eppendorf
Mikrozkumavky (0,5 ml a 1,5 ml)	Eppendorf
PCR mikrozkumavky (0,2 ml)	Eppendorf

3.1.3 Chemikálie

2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Agarosa pro DNA analýzu	Serva (Heidelberg, Německo [D])
Akrylamid, f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
APS (persíran amonný), f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Bacto Agar	Bacton (Le Pont de Claix, Francie)
Bacto Tryptone	Bacton (Le Pont de Claix, Francie)
Bacto Yaest extract	Bacton (Le Pont de Claix, Francie)
Bradford reagent	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Bromfenolová modř, sodná sůl	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
BSA (100x)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
BSA ≥ 99,9%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
BugBuster Protein Extraxtion Reagent	Novagen (Darmstadt, Německo)
Coomassie brilliant blue G-250	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a	Penta (ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, p.a	Penta (ČR)
dNTP Mix	Finnzymes (Espoo, Finsko)
EDTA ≥ 99% (m/m)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Ethanol 99% (v/v)	Dr. Kulich (Hradec Králové, ČR)

Glycerol 85% (v/v)	Dr. Kulich (Hradec Králové, ČR)
Hydrogenfosforečnan didraselný dihydrát, p.a	Penta (ČR)
Hydroxid sodný, p.a	Penta (ČR)
Chlorid hořečnatý (50 mM)	Finnzymes (Espoo, Finsko)
Chlorid sodný, p.a	Penta (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát, p.a	Penta (ČR)
IPTG	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Isopropanol ≥ 99%, pro molekulární biologii	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kyselina boritá, p.a	Penta (ČR)
Kyselina chlorovodíková 36% (v/v)	Penta (ČR)
NE Buffer 4 (10x)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
N,N'-Methylenbis(akrylamid), f.e. ≥99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Phusion HF Reaction Buffer (5x)	Finnzymes (Espoo, Finsko)
T4 DNA Ligase Buffer (5x)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Tris (hydroxymethyl)aminomethan, p.a	Penta (ČR)
TEMED, f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Ultra-pure LMP Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)

3.1.4 Biologický materiál

Reverse primer (5'-CCG TGT CTC GAG TCA GTA CGG GTC-3')	GeneriBiotech (Hradec Králové, ČR)
Forward primer (5'-GCA CAC CAT ATG GCG GCT TCC TGT-3')	GeneriBiotech (Hradec Králové, ČR)
pET 28b(+) vektor	Novagen (Darmstadt, D)
E coli HB101 (F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (strr), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>)	Promega (Madison, USA)
E coli BL21 (F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysS, Cmr)	Promega (Madison, USA)

3.1.5 Enzymy

Phusion Hot Start II Hight-Fidelity DNA polymerasa (100 U)	Finnzymes (Espoo, Finsko)
Restrikční edonukleasa <i>NdeI</i> (20 000 U/μl)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Restrikční endonukleasa <i>XhoI</i> (20 000 U/μl)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
T4 DNA Ligasa (400 U/μl)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
T4 DNA Ligasa (2 000 000 U/μl)	New England Biolabs (Frankfurt, D)

3.1.6 Markery

2 – log DNA molekulový marker	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Loading Dye Solution (6x)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Precision Plus Protein Standard All Blue	Bio-Rad (Hercules, USA)

3.1.7 Kity

QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
PCR Clean - up	

3.1.8 Pufry a zásobní roztoky

3.1.8.1 Zásobní roztoky

- EDTA 0,5M, pH = 8,0
- Ethanol 70%
- Glycerol 85% - sterilizace v autoklávu
- IPTG 1M (skladování při -20°C)
- Kanamycin 10 mg/ml (skladování při -20°C)

3.1.8.2 Složení pufřů

Draselno–fosfátový pufr (0,1M): 0,1M KH₂PO₄, 0,1M K₂HPO₄.3H₂O

TBE pufr (5x): 45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 10mM EDTA, pH = 8,3

TE pufr: 10mM Tris, 1mM EDTA, pH = 8,0

Tris pufr: 10mM Tris, pH = 8,5

Pufry na afinitní chromatografii:

- Promývací pufr: 20mM Tris + 30mM imidazol, pH = 7,4
- Eluční pufr: 20mM Tris + 500mM imidazol, pH = 7,4

3.1.8.3 Složení roztoků pro SDS elektroforézu proteinů

- 30% akrylamid (AA) + 0,8% bisakrylamid (bis-AA)
- 1,5M Tris-HCl pufr (pH 8,8)
- 0,5M Tris-HCl pufr (pH 6,8)
- 10% dodecylsulfát sodný (SDS)
- 10% persíran amonný (APS) (vždy čerstvě připravený)
- 0,5% Bromfenolová modř

- Elektrodový pufr (5x konc.): 125mM Trisu, 1M glycinu, 0,5% SDS, pH 8,3
- Vzorkový pufr: 50mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,04% bromfenolová modř, 0,05% 2-merkптоethanol
- Barvicí roztok: 0,25% Coomassie Brilliant Blue G250 v 10% kyselině octové
- Odbarvovací roztok: 10% kyselina octová

Separáčnı gel (12,5%)

- 6,4 ml H₂O
- 5,0 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
- 0,2 ml 10% SDS
- 8,4 ml 30% AA + 0,8% bis-AA
- k iniciaci polymerace: 116 μ l 10% APS a 8 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED)

Zaostřovací gel (4%)

- 6,25 ml H₂O
- 2,5 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
- 0,1 ml 30% SDS
- 1 ml 30% AA + 0,8% bis-AA
- k iniciaci polymerace: 60 μ l 10% APS a 5 μ l TEMEDu

3.1.9 Živná média

3.1.9.1 *Luria – Bertani médium*

Luria – Bertani médium, zkráceně LB médium, je nejčastěji používané živné médium pro kultivaci *E. coli*. Připravuje se z kvasničného extraktu, tryptonu, chloridu sodného a ultračisté vody. Poměry jednotlivých složek jsou popsány v tabulce 3. Před použitím bylo upraveno pH na 7,0 a médium vysterilizováno v autoklávu.

Tabulka 3: Složení LB média

složky	množství na 100 ml média
chlorid sodný	1 g
kvasničný extrakt (Bacto yeast)	0,5 g
trypton (Bacto tryptone)	1 g
ultračistá voda	100 ml

3.1.9.2 *Luria – Bertani médium s agarem*

Živná půda, byla připravena stejně jako LB médium s přídavkem 2 g agaru (Bacto agar) na 100 ml média. Následovala sterilizace v autoklávu a po zchladnutí na cca 50°C bylo přidáno antibiotikum kanamycin (50 µg/ml) a médium nalito na Petriho misky.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Namnožení plasmidové DNA

3.2.1.1 *Namnožení E coli DH10B s plasmidem pDNR-LIB*

Do 1 ml LB média byly sterilní špičkou přeneseny buňky z kolonie na agaru. Bakterie byly inkubovány 2 hodiny při 37°C a 220 rpm. Poté byla kultura přenesena do Erlenmayerovy baňky se 40 ml LB média a chloramfenikolem (25 µg/ml média). Inkubace probíhala přes noc při 37°C a 200 rpm.

3.2.1.2 Příprava plasmidu pET28b(+)

Vektor pET-28b(+) nese gen kódující rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu, které bylo za účelem selekce klonů přidáváno do média v koncentraci 50 µg/ml.

Buňky *E. coli* kmen HB101 byly sterilní špičkou přeneseny do 2 ml LB média s kanamycinem a inkubovány 4 hodiny při 37°C a 180 rpm. Kultura byla rozdělena do dvou mikrozkuvek. Jedna zkuvka byla uschována, druhá byla purifikována kitem QIAGEN Plasmid Midi. Postup viz 3.2.2.2.

Namnožení *E. coli* s plasmidovou DNA pro velkou purifikaci

Buňky *E. coli* HB101 nebo BL21 byly po transformaci plasmidem pET28b(+) (viz postup 3.2.6) a preinkubaci převedeny do 20 ml (nebo 40 ml) LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a inkubovány při 37°C a 200 rpm v třepacím inkubátoru přes noc.

3.2.2 Izolace plasmidové DNA

V tomto postupu dochází k lýze buněk, odstranění proteinů (pomocí SDS) a RNA (RNAsou) a získání uvolněné DNA v roztoku. Alkalickou denaturací lineárních fragmentů DNA je pak oddělena plasmidová DNA od chromozomální. Požadovaný plasmid je ve superspiralizované formě a proto není denaturován. (Brown, 2007).

3.2.2.1 Velká purifikace plasmidu pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit

Kultura o objemu 20 – 40 ml byla převedena do zkuvky Nalgene a 10 minut centrifugována při 4 000 x g. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována 4 ml P1 pufru s RNAsou. Dále byly přidány 4 ml P2 pufru (lyzační) a suspenze byla 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Nakonec byly přidány 4 ml zchlazeného P3 pufru. Po promíchání byla směs 15 minut inkubována na ledu a následně 30 minut centrifugována při 20 000 x g a 4°C.

Mezitím byla aktivována kolonka QIAGEN–tip 100 4 ml pufru QBT. Na aktivovanou kolonku byl nanesen supernatant obsahující plasmidovou DNA. Kolonka byla 2 x promyta 10 ml QC pufru. K eluci bylo použito 5 ml QF pufru, eluát byl jímán do sterilní zkuvky, plasmidová DNA byla precipitována pomocí 3,5 ml isopropanolu. Po precipitaci byla zkuvka centrifugována 30 minut při 15 000 x g a 4°C. Po odstranění supernatantu byla peleta promyta 2 ml 70% ethanolu a opět centrifugována

10 minut při 15 000 x g a 4°C. Poté byla peleta obsahující plasmid vysušena, rozpuštěna v TE pufru (pH 8,0) a přenesena do sterilní mikrozkušavky.

3.2.2.2 Mini purifikace pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit

Tento postup byl používán pro malé kultury o objemu 2 ml. Kultura *E. coli* kmen HB101 byla rozdělena na dvě poloviny (½ byla uschována v lednici). Polovina kultury byla stočena při 13 000 x g 5 minut a odstraněn supernatant. Peleta byla resuspendována v 200 µl P1 pufru. Následně bylo přidáno 200 µl P2 pufru a směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 200 µl P3 pufru, inkubace probíhala 15 minut na ledu. Po 15 minutové centrifugaci při 13 000 x g, byl odebrán supernatant a obsažená DNA byla precipitována přidáním 600 µl isopropanolu, směs byla promíchána a inkubována 5 minut na ledu. Po centrifugaci byla peleta promyta 500 µl 70% ethanolu. Následovala 10 minutová centrifugace při 13 000 x g. Supernatant byl odstraněn, peleta byla vysušena a nakonec rozpuštěna ve 20 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8,5). Takto vyizolovaná DNA byla uchována v lednici.

3.2.3 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

PCR neboli polymerasová řetězová reakce je metoda využívaná k namnožení specifického úseku DNA pomocí termostabilní polymerasy, v tomto případě vysoce přesné Phusion Hot Start II HF DNA polymerasy a specifických primerů. V této práci byla použita metoda „touchdown“, kdy se teplota nasedání primerů postupně snižuje, aby se docílilo vyšší specifity celého procesu.

K syntéze požadovaného úseku DNA byly navrženy specifické primery uvedené v tabulce 4. Pomocí těchto oligonukleotidů byla na konce insertu vložena restriční místa pro enzymy *NdeI* a *XhoI*.

Tabulka 4: Navržené primery pro PCR amplifikaci sekvence AKR1A1

primer	Sekvence oligonukleotidu	restriční endonukleasa
forward	5'- GCA CAC CAT ATG GCG GCT TCC TGT-3'	NdeI
reverse	5'- CCG TGT CTC GAG TCA GTA CGG GTC-3'	XhoI

Reakční směs byla připravována v celkovém objemu 20 µl. V tabulce 5 jsou uvedeny složky reakce včetně jejich koncentrací.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR

složka	konc. zásobního roztoku	finální koncentrace	v 1 μ l (μ l)	ad 20 μ l (μ l)
voda				11,4
HF-pufr	5 x	1 x	0,2	4
dNTPs	10 mM	200 μ M	0,02	0,4
F primer	10 μ M	0,2 μ M	0,02	1
R primer	10 μ M	0,2 μ M	0,02	1
templátová DNA			0,02	1
polymerasa			0,01	0,2
MgCl ₂	50 mM	2 mM	0,02	0,4
DMSO			0,03	0,6

Reakce proběhla dle nastaveného programu „touchdown“ v termocykleru (tabulka 6).

Tabulka 6: Nastavení termocykleru

fáze	teplota [°C]	čas	počet cyklů
úvodní denaturace	98	30 s	1
denaturace	98	10 s	5
nasedání primerů	72	30 s	
prodloužení	72	30 s	
denaturace	98	10 s	5
nasedání primerů	60	30 s	
prodloužení	72	30 s	
denaturace	98	10 s	5
nasedání primerů	55	30 s	
prodloužení	72	30 s	
denaturace	98	10 s	20
nasedání primerů	50	30 s	
prodloužení	72	30 s	
závěrečné prodloužení	72	10 min	1

3.2.4 Analýza DNA

3.2.4.1 Horizontální elektroforéza

Horizontální elektroforéza je velice užitečnou metodou určování velikosti DNA. Je založena na různé pohyblivosti fragmentů DNA v gelu a dokáže ve vzorku určit velikosti jednotlivých fragmentů v něm obsažených.

Příprava gelu a vlastní elektroforéza

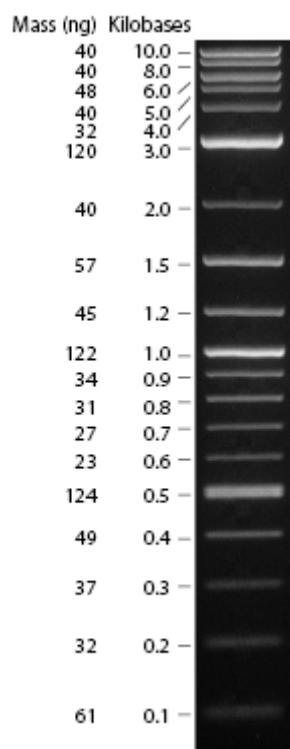
Pro horizontální elektroforézu byl používán 0,8% agarosový gel s barvivem SYBR Safe v poměru 1:1000. Tato koncentrace agaru je vhodná pro analýzu fragmentů velikostí 0,5 až 10 kb, což potřebám experimentu plně postačuje.

Agarosový gel byl připraven rozpuštěním agarosy v TBE pufru za tepla v objemu 30 ml. Gel byl nalit do vaničky, ve které se s nasazeným hřebínkem nechal zhruba 1 hodinu ztuhnout. Po ztuhnutí gelu a vyjmutí hřebínku, byla vanička s gelem přesunuta do elektroforetické vany a zalita elektroforetickým TBE pufrem, tak aby byly jamky celé ponořené. Nejčastěji se nanášel 1 μ l vzorku s 1 μ l barviva a 4 μ l vody. Po nanesení vzorků do jamek byla vana připojena ke zdroji napětí. U jamek musí vždy být záporný pól a na konci gelu kladný pól, jelikož DNA je záporně nabitá a putuje ke kladnému pólu. Separace DNA probíhala přibližně 45 minut při konstantním napětí 90 V.

Vizualizace DNA

Separace jednotlivých fragmentů na gelu byla zobrazena systémem GelDocXR. Agarosový gel se SYBR Safe barvivem byl ozářen ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm. Zobrazení a fotografie gelu byla provedena prostřednictvím programu Quantity One.

K určení velikosti získaných fragmentů byl používán komerčně dodaný molekulový marker 2-log DNA ladder, který má fragmenty DNA o známé velikosti, viz Obrázek 4.



Obrázek 4: Molekulový marker 2-log DNA (NEB, 2013)

3.2.4.2 Stanovení koncentrace DNA

Před zahájením ligace bylo nezbytné stanovit přesnou koncentraci DNA ve vzorcích, pomocí UV spektroskopie. Bylo použito UV záření o vlnové délce 260 nm. Z naměřené absorbance ve vzorku byla vypočítána hmotnostní koncentrace. Poměrem absorbancí při 260 nm a 280 nm byla zjištěna čistota vzorku. Tento poměr je u čistých vzorků v rozmezí 1,8 – 2,0. K měření byl použit 1 μ l vzorku, měření bylo opakováno třikrát a na slepý vzorek byl použit Tris-HCl pufr, ve kterém byly vzorky rozpuštěny.

3.2.5 Vložení sekvence cDNA AKR1A1 do vektoru

Insert s cDNA pro AKR1A1 i vektor pET28b(+) byly ošetřeny restričními endonukleasami, které vytvořily kohezivní konce DNA, které snadněji podléhají ligaci.

V této práci byl jako vektor používán plasmid pET-28b, který má ve svém klonovacím místě sekvenci, kterou rozpoznávají restriční endonukleasy *XhoI* a *NdeI*. O tyto rozpoznávané sekvence byla prodloužena kódová sekvence AKR1A1, za pomoci primerů a PCR.

3.2.5.1 Purifikace insertu cDNA s AKRIA1

Izolace fragmentu DNA z agarosového gelu

Při PCR mohou vzniknout i jiné fragmenty s různou velikostí. Cílový PCR produkt byl separován od nežádoucích vedlejších produktů reakce. Separace z agarosového gelu pomocí elektroforézy je jedním z nejjednodušších postupů.

K přípravě agarosového gelu byla použita speciální ultra čistá agarosa s nízkým bodem tání. Gel byl připraven ve stejné koncentraci v objemu 50 ml. Taktéž bylo použito barvivo SYBR Safe v poměru 1:1000. Neneseno bylo 20 μ l vzorku spolu s 1 μ l vzorkovaného pufru. Elektroforéza probíhala za standardních podmínek při konstantním napětí 90 V přibližně 1 hodinu.

Po separaci vzorku byl příslušný fragment vyříznut skalpelem z gelu v podsvícení UV zářením. Vzorek byl přemístěn do mikrozkuhavky a zvážen. Samotná extrakce byla provedena pomocí kitu QIAEX II Gel Extraction Kit. K fragmentu v mikrozkuhavce bylo přidáno potřebné množství pufru QXI. Na každých 100 mg gelu se přidávalo 100 – 200 μ l QXI pufru. V případě potřeby bylo upraveno pH směsi 3M roztokem acetátu sodného. Poté bylo přidáno 10 μ l resuspendovaného QIAEX II (silikagelové částice v pufru) a vzorek byl při 50°C inkubován 10 minut, přičemž byl každé 2 minuty promíchán, aby bylo zabráněno sedimentaci QIAEX II. Po inkubaci byla směs zcentrifugována, po odstranění supernatantu bylo k peletě přidáno 500 μ l QXI pufru, směs byla promíchána a opět zcentrifugována. Peleta byla dvakrát promyta 500 μ l PE pufru, v němž byla vždy resuspendována a posléze zcentrifugována. Po posledním promytí byla peleta vysušena. K eluci byl použit Tris-Cl s pH 8,5 o objemu 20 μ l. Následovala pětiminutová inkubace za laboratorní teploty a cetrifugace. Supernatant s extrahovanou DNA byl přenesen do čisté mikrozkuhavky. Jednotlivé centrifugace probíhaly 30 s při 13 000 x g.

Purifikace produktu PCR

PCR produkty byly purifikovány kitem Nucleospin. K PCR produktu bylo přidáno dvojnásobné množství objemu NT pufru a směs byla přenesena do kolonky, ve které byla zcentrifugována 1 minutu při 11 000 x g. Kolonka, na které se zachytila DNA, byla promyta 600 μ l NT3 pufru. Opět byla zcentrifugována za stejných podmínek, po vylití supernatantu byla kolonka znovu promyta 200 μ l NT3 pufru a opět zcentrifugována. Po vylití supernatantu byla kolonka centrifugována 2 minuty při

11 000 x g. Do kolonky bylo přidáno 30 μ l NE elučního pufru a byla zcentrifugována za stejných podmínek do čisté mikrozkuavky.

3.2.5.2 Restrikce plasmidu pET-28b(+) a kódové sekvence AKRIA1

Restrikce byla prováděna v mikrozkuavkách, za sterilních podmínek v celkovém objemu 20 μ l. Jednotlivé složky směsi jsou uvedeny v tabulce 7. Vzorky byly inkubovány v termomixeru, za použití programu Interval mix – třepání 500 rpm po dobu 10 vteřin každých 10 minut. Restrikce probíhala při teplotě 37°C 90 minut u PCR produktů a zhruba 2,5 hodiny u plasmidu pET28b(+). Po uplynutí příslušného časového intervalu byly restrikční endonukleasy inaktivovány zahřátím směsi na 65°C po dobu 20 minut.

Pro vyšší úspěšnost následné ligační reakce bylo provedeno přečištění restrikčních produktů. K přečištění směsi od případných proteinů a solí byl opět použit QIAEX II Gel Extraction Kit. K restrikční směsi (20 μ l) byl přidán trojnásobný objem (60 μ l) QXI pufru. Po upravení pH na optimální hodnotu přidáním 10 μ l 3M octanu sodného byla směs 30 sekund promíchávána. Následně byl přidán QIAEX II v objemu 10 μ l na 5 μ l DNA, směs byla promíchána a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě, přičemž byla každé 2 minuty promíchána, aby QIAEX II zůstal v suspenzi. Po zcentrifugování vzorku byl odstraněn supernatant a peleta byla dvakrát promyta 500 μ l PE pufru. Po promytí byla peleta vysušena do bílé barvy a resuspendována ve 20 μ l Tris-HCl (pH 8,5). Po 5 minutové inkubaci při laboratorní teplotě byl vzorek zcentrifugován a supernatant převeden do čisté mikrozkuavky. Všechny centrifugace probíhaly 30 vteřin při 13 000 x g.

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro restrikci

složka	ad 20 μ l
voda	9 μ l
NEB4 pufr	2 μ l
BSA (10x)	2 μ l
templát DNA	5 μ l
<i>NdeI</i>	1 μ l
<i>XhoI</i>	1 μ l

3.2.5.3 Ligace kódové sekvence AKR1A1 s pET-28b(+)

V ligační směsi bylo použito 50 až 100 ng plasmidu, ke kterému bylo přidáno trojnásobné množství insertu. Výpočet byl proveden dle Rovnice 1. Ligační směs dále obsahovala 1 μl pufru pro T4 DNA ligasu, 0,5 μl T4 DNA ligasy a vodu, kterou byla směs doplněna na množství 10 μl. Jako poslední byla do směsi přidána ligasa. Samotná ligace probíhala při 16°C přes noc. Nakonec byla směs zahřátá na 65°C po dobu 10 minut, aby došlo k inaktivaci enzymu.

Rovnice 1: Výpočet množství sekvence použitého k ligaci (M = molekulová hmotnost, m = hmotnost)

$$M_{\text{pET28b}(+)} = 5,369 \text{ kb}$$

$$M_{\text{AKR1A1}} = 0,97 \text{ kb}$$

$$m_{\text{AKR1A1}} = \frac{3 \cdot M_{\text{AKR1A1}} \cdot m_{\text{pET28b}(+)}}{M_{\text{pET28b}(+)}} \rightarrow m_{\text{AKR1A1}} = 0,5420 \cdot m_{\text{pET28b}(+)}$$

3.2.6 Transformace kódové sekvence do buněk *E. coli* HB101

Plasmid s cílovou sekvencí AKR1A1 byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* HB101. K přípravě kompetentních buněk byl použit roztok CaCl₂, který pozměňuje vlastnosti buněčné stěny. Takto byla umožněna adheze DNA k buněčnému povrchu. Následoval tzv. Heat shock, krátké zvýšení teploty (používalo bylo 90 sekund) na 42°C, při kterém dochází k průniku DNA do buněk.

3.2.6.1 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* jsou upravené tak, aby byly schopné přijmout DNA. Komerčně dostupné buňky uchovávané při – 80°C, byly rozmrazeny. 100 μl buněk bylo přidáno do 2 ml LB média ve sterilní zkumavce a kultura byla inkubována přes noc při 37°C a 180 rpm a označena jako Stock 1.

Do 3 ml LB média bylo přidáno 500 μl Stock 1, kultura byla inkubována při 37°C a 180 rpm do dosažení optické denzity (OD) v rozmezí 0,4 až 0,6. Kultura byla rozdělena do tří mikrozkuvek a označena Stock 2. Stock 2 byl zcentrifugován 30 s při 13 000 x g. Po slití supernatantu byl k peletě přidán 1 ml ledově vychlazeného 0,1M CaCl₂, směs byla promíchávána 30 s a 30 minut inkubována na ledu, pak opět zcentrifugována 30 s při 13 000 x g a nakonec byl supernatant odstraněn. Peleta byla

resuspendována 500 μ l 0,1M CaCl₂. Po 30 minutové inkubaci na ledě byly připraveny kompetentní buňky (Stock 3) k okamžité transformaci vektorem.

Měření optické denzity

150 μ l buněčné suspenze bylo přeneseno do jamky titrační destičky. Do další jamky bylo napipetováno stejné množství LB média. Měření bylo provedeno pomocí spektrofotometru Tecan při vlnové délce 595 nm. Rozdíl mezi absorbancí kultury a média je hodnota OD. Při OD 0,6 se buňky nacházejí v optimální fázi pro transformaci plasmidem.

3.2.6.2 Vlastní transformace vektorem

5 μ l ligační směsi bylo smícháno s 50 μ l kompetentních buněk a inkubováno 30 minut na ledu. Po inkubaci byl proveden tepelný šok 90 s na vodní lázni při 42°C. Ihned poté byla mikrozkušavka vložena na 5 minut na led. K suspenzi bylo přidáno 400 μ l LB média (předehřáté na 37°C) a proběhla preinkubace 1 hodinu při 37°C a 110 rpm.

3.2.6.3 Kultivace *E. coli* HB101 na agaru

Po preinkubaci byly buňky nanесeny na Petriho misky s LB médiem s agarem a kanamycinem (50 μ g/ml) a pomocí sterilního očkovacího nástroje pečlivě rozetřeny do zaschnutí. Misky byly inkubovány přes noc při 37°C dnem vzhůru, aby případná zkondenzovaná tekutina neovlivňovala růst kolonií. Kolonie na miskách narostly přibližně za 12 – 18 hodin. Vybrané kolonie byly přeočkovány do zkumavek s 2 ml LB média s kanamycinem (50 μ g/ml) a inkubovány při 37°C a 180 rpm přes noc.

3.2.7 Sekvenace

Správnost sekvence zabudované v plasmidu byla ověřena sekvenací. Sekvenace byla provedena společností Geneti Biotech, pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzera. Metoda je založena na kapilární elektroforéze s fluorescenční detekcí (Geneti Biotech, sekvenace, 2009). Reakce využívá fluorescenčně označených terminálních dideoxyribonukleotidů (ddNTPs). K reakci byly vybrány primery ohraničující mnohočetné klonovací místo na plasmidu pET28b(+), jak ukazuje tabulka 8.

Tabulka 8: Sekvence primerů použitých k sekvenaci

primer	sekvence
T7-prom	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-term_Inv	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

V programu FinchTV byly zpracovány výsledky (Geospitza) a kódová sekvence byla zkontrolována v programu ClustalW (dostupné z Genome).

3.2.8 Exprese proteinu

Plasmid pET28b(+) obsahuje laktosový operon, proto byl k indukci exprese cílového proteinu použit isopropyl- β -D-galaktopyranosid (IPTG).

3.2.8.1 Příprava buněčné kultury pro expresi

Pro expresi byly použity *E. coli* kmen BL21, které jsou schopny produkovat enzym z transformovaného plasmidu pET28b(+). Byly připraveny kompetentní buňky, dle postupu 3.2.6.1. Do nich byl transformován plasmid obsahující sekvenci pro AKR1A1, podle postupu 3.2.6.2. Po preinkubaci byly buňky přeneseny do 10 ml LB média s kanamycinem (50 μ g/ml) a inkubovány přes noc při teplotě 37°C a 180 rpm.

Noční kultura byla přenesena do 250 ml LB média s kanamycinem (50 μ g/ml) a inkubována při 37°C a 200 rpm do dosažení hodnoty optické denzity 0,6.

3.2.8.2 Exprese proteinu AKR1A1

Exprese byla indukována přidáním 250 μ l 1M IPTG do 250 ml bakteriální kultury. Inkubace probíhala při 37°C a 220 rpm 4 hodiny. Následně byla kultura centrifugována při 6 000 x g 15 minut. Získaná peleta s cílovým proteinem byla uchována při -20°C.

Během tohoto postupu byly průběžně odebírány vzorky (vždy 1 ml) k pozdější analýze. První vzorek byl odebrán před indukcí exprese, byl označen PBI (peleta před indukcí). Po dvou a čtyřech hodinách exprese byly odebrány další vzorky, které byly označeny jako PAI2 a PAI4 (peleta po indukci).

3.2.9 Purifikace proteinu

3.2.9.1 Příprava buněčného lyzátu

Peleta byla resuspendována ve 4 ml BugBuster Protein Extraction Reagent a 20 minut inkubována při laboratorní teplotě. Lyzát byl 20 minut centrifugován při 16 000 x g a 4°C. Supernatant obsahující požadovaný protein byl uchován při 4°C ve sterilní zkumavce. Peleta byla uchována při -20°C pro analytické účely.

3.2.9.2 Purifikace na purifikátoru Äcta

Princip afinitní chromatografie spočívá ve specifické vazbě rekombinantně připraveného enzymu, který má na konci řetězce aminokyselin připojen histidinový ocásek, na Ni²⁺ ionty v pevné fázi. Ostatní proteiny, které tento ocásek nemají, se na stacionární fázi neváží nebo se váží nespecificky s menší pevností a jsou proto snadno odstraněny.

Buněčný lyzát obsahuje kromě požadovaného enzymu i další proteiny a nečistoty, od kterých ho bylo potřeba purifikovat. Lyzát byl nanesen na kolonu s Ni²⁺, na kterou se specificky váže požadovaný enzym s His tagem a nespecificky další proteiny obsažené ve vzorku. Z kolony byly nejprve promývacím pufrům odstraněny nečistoty, které se na kolonu nenašly. Pomocí zvyšující se koncentrace imidazolu v promývacím pufru byly postupně vyplavovány nespecificky vázané proteiny a nakonec i požadovaný protein, což bylo zaznamenáno na chromatogramu.

3.2.10 Vertikální elektroforéza bílkovin

K dělení proteinů na základě jejich velikosti byla využita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného. Proteiny byly denaturovány a obaleny tenzidem SDS (dodecylsulfát sodný) k získání stejného náboje. Byly použity dva polyakrylamidové gely o různé pórovitosti. Molekuly se koncentrují na hranici mezi gely. Horní gel je nazván zaostřovací a spodní separační, jelikož právě na něm dochází k separaci.

3.2.10.1 Příprava gelů a vzorků

Byl připraven gel o tloušťce 1,5 mm. Složení zaostřovacího a separačního gelu je uvedeno v tabulce 9. Nejprve byl namíchán separační gel a nanesen mezi skla asi do ¾ výšky. Byl převrstven isobutanolem, a nechán ztuhnout. Po odstranění isobutanolu

byl gel opláchnut destilovanou vodou, vysušen a převrstven čerstvým zaostřovacím gelem. S nasazeným hřebínkem byl gel ponechán polymerovat (90 minut).

Před analýzou byl protein denaturován pufrům s 2–merkptoethanolem přidávaným v poměru 4 : 1, 3 minuty při 95°C.

Tabulka 9: Složení gelů pro SDS–PAGE elektroforézu

	separační gel 12,5% (ml)	zaostřovací gel 4% (ml)
voda	3,2	3,125
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	2,5	-
Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)	-	1,25
AA 30% + bis-AA 0,8%	4,2	0,5
SDS 10%	100 µl	50 µl
APS 10%	58 µl	30 µl
TEMED	4 µl	2,5 µl

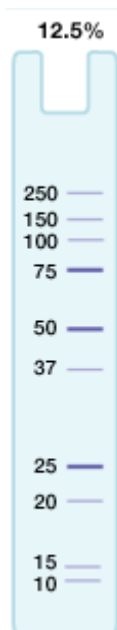
3.2.10.2 Elektroforéza vzorků

Gel byl umístěn do cely a následně do elektroforetické vany s elektrodoým pufrům. Po nanesení vzorků do jamek byl pufr dolit tak, aby v něm byl gel celý ponořen. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí – počáteční napětí bylo 100 V a po průchodu vzorků zaostřovacím gelem (asi po 15 minutách) bylo navýšeno na 200 V asi na 45 minut.

3.2.10.3 Detekce proteinů v gelu

Separační gel byl obarven 0,25% roztokem Coomassie Brilliant Blue G–250 v 10% kyselině octové při 60°C 15 minut. Po obarvení byl gel 3x promyt 10% kyselinou octovou. Po poslední výměně kyseliny byl gel ponechán přes noc v kyselině na třepačce, aby došlo k úplnému odbarvení pozadí, které by jinak rušilo následné vyhodnocení.

Gel byl snímán na bílém pozadí za použití bílého světla systémem GelDocXR. K určení velikosti proteinu byl použit molekulový marker Precision Plus Protein Standard All Blue (10 – 250 kDa).



Obrázek 5: Molekulový marker Precision Plus Protein Standard All Blue (Bio-Rad, 2013)

3.2.11 Uchování proteinu

Po purifikaci byl protein v elučním pufru, obsahujícím imidazol, který snižuje aktivitu enzymu. Protein byl převeden do 0,2M sodno–fosfátového pufru filtrací přes celulosovou membránu. Eluát byl převeden na kolonku Amicon Ultra–4 s filtrem Ultracel–10 a 10 minut centrifugován při 4 000 x g. Poté byla membrána promyta 2 ml 0,2M sodno-fosfátového pufru a centrifugována 20 minut při 4 000 x g, tak aby pufr nebyl zcela přefiltrován. Promytí bylo opakováno 4x. Protein byl resuspendován v nezfiltrovaném pufru a převeden do čisté mikrozkušavky.

Po změření koncentrace (viz 4.11) byl protein v poměru 1:1 rozmíchán v 85% glycerolu, řádně označen a uložen při – 20°C.

3.2.12 Měření koncentrace proteinu podle Bradforda

Základem metody je interakce barviva Coomassie Brilliant Blue G–250 s aromatickými nebo bazickými aminokyselinami v bílkovině. Barvou se odlišuje kationická, nevázaná forma – červená a anionická, vázaná forma – modrá (Rumlová a kol., 2003).

Bovinní sérový albumin (BSA) byl použit jako standard, a to v koncentraci 1 mg/ml (0,1M sodno–fosfátový pufr, pH 7,4). Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny roztoky pro kalibrační řadu dle tabulky 10.

Ke 40 μl 0,1M sodno–fosfátového pufru bylo přidáno 10 μl stanovovaného proteinu. Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno 10 μl vzorku – kalibrační řada, slepý vzorek (samotný pufr) a stanovovaný protein. Každý vzorek byl nanesen třikrát, výsledky byly zprůměrovány. Ke vzorkům bylo přidáno 240 μl Bradfordova činidla a po 10 minutové inkubaci byla změřena absorbance při 592 nm.

Tabulka 10: Kalibrační řada standardů BSA

koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	objem BSA (1 mg/ml) [μl]	objem pufru [μl]
100	50	450
200	100	400
400	200	300
600	300	200
800	400	100
1 000	500	-

3.2.13 Měření aktivity připraveného enzymu

Aktivita enzymu AKR1A1 byla měřena s *p*-nitrobenzaldehydem (NBA) v přítomnosti kofaktoru NADPH na spektrofotometru Tecan.

Byl připraven zásobní roztok 100mM NBA v DMSO. Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích: 0,05mM, 0,2mM, 0,5mM, 1mM a 10mM naředěním pomocí DMSO. V prvním měření byl používán draselno-fosfátový pufr (0,2M). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 11. Reakce byla odstartována přidáním substrátu a okamžitě poté bylo spuštěno měření absorbance. Měření probíhalo oproti slepému vzorku, kde enzym byl nahrazen pufrem, při vlnové délce 340 nm. Absorbance byla zaznamenávána každých cca 10 s po dobu 15 minut.

Pro porovnání aktivit enzymu bylo provedeno druhé měření aktivity za použití sodno–fosfátového pufru (0,2M, pH 7,4). Podmínky reakce byly totožné, složení reakční směsi se lišilo pouze sodno–fosfátovým pufrem v objemu 70 μl na místo draselno–fosfátového pufru a vody.

Tabulka 11: Složení reakční směsi pro měření aktivity

složka	konečná koncentrace	zásobní konc.	použitý objem
NADPH	250 μ M	2,5mM	10 μ l
enzym AKR1A1	2 μ g	0,2 μ g/ μ l	10 μ l
draselno-fosfátový pufr	0,1M	0,2M	50 μ l
voda			20 μ l
sodno-fosfátový pufr	0,1M	0,2M	70 μ l
substrát	0,05, 0,2, 0,5, 1, 10mM		10 μ l

Pokles absorbance odpovídá spotřebě kofaktoru NADPH. Z hodnot absorbance byly zjištěny hodnoty sklonu (slope) – rozdíl absorbance za 1 minutu a vypočítána specifická aktivita enzymu podle rovnice 2. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Grafpad Prism 6.

Rovnice 2: Výpočet specifické aktivity enzymu u substrátu (V = objem, v = specifická aktivita, c = koncentrace, E = doplňkový koeficient, h = výška jamky)

v [μ mol/mg/min]

$E_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ l/mM.cm}$

$V_{\text{AKR1A1}} = 10 \mu\text{l}$

$V_{\text{reakční směsi}} = 100 \mu\text{l}$

$c_{\text{AKR1A1}} = 0,02 \text{ mg/ml}$

$h = 0,45 \text{ cm}$

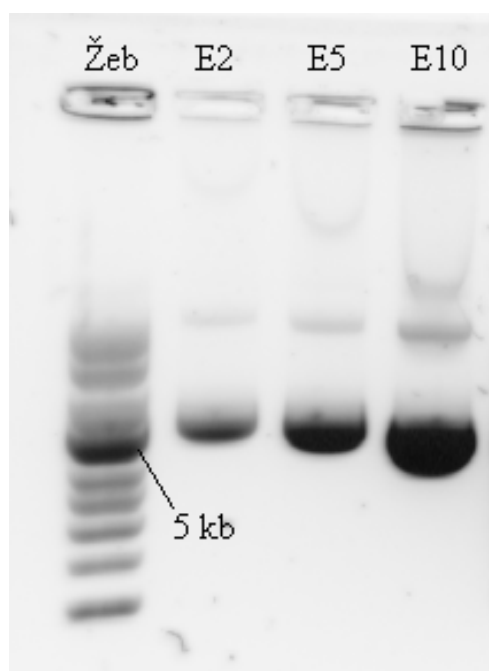
$$v = \frac{\Delta A/\text{min (slope)}}{E_{\text{NADPH}} \cdot \frac{V_{\text{AKR1A1}}}{V_{\text{reakční směsi}}} \cdot c_{\text{AKR1A1}} \cdot h}$$

4 Výsledky a diskuze

Pracovní skupina profesora Wsóla se studiem enzymů redukujících karbonylovou skupinu zabývá dlouhodobě. V centru pozornosti je především jejich zapojení do metabolismu cizorodých látek jak ze skupiny léčiv, tak významných prokarcinogenů. Pro tyto účely bylo zavedeno několik metod jednak z oblasti přípravy rekombinantních forem těchto enzymů, jejich purifikace a základní charakterizace (v případě dosud neznámých enzymů), ale také řada analytických metod, které slouží k hledání a stanovení enzymové aktivity vůči potencionálním substrátům. Připravená rekombinantní forma AKR1A1 bude sloužit k dalšímu studiu, mimo jiné se pro ni budou hledány případné specifické inhibitory ze skupiny flavonoidů.

4.1 Příprava enzymu

Izolovaná cDNA, která byla komerčně dodána v plasmidu pDNR-LIBm s rezistencí na chloramfenikol, sloužila jako templát pro PCR reakci. Použitím specifických primerů byla namnožena kódová sekvence cílového enzymu AKR1A1.



Obrázek 6: Elektroforetická analýza po izolaci cDNA v podmínkách 0,8% agarosový gel, 90V a 45 minut. Žeb – molekulový marker supercoiled, E – izolovaná cDNA nanesená v objemu 2, 5 a 10 µl. Fragmenty u nanesených vzorků mají velikost cca

5,2 kb, což ukazuje, že se podařilo vyizolovat plasmid s kódovou sekvencí pro AKR1A1.

```

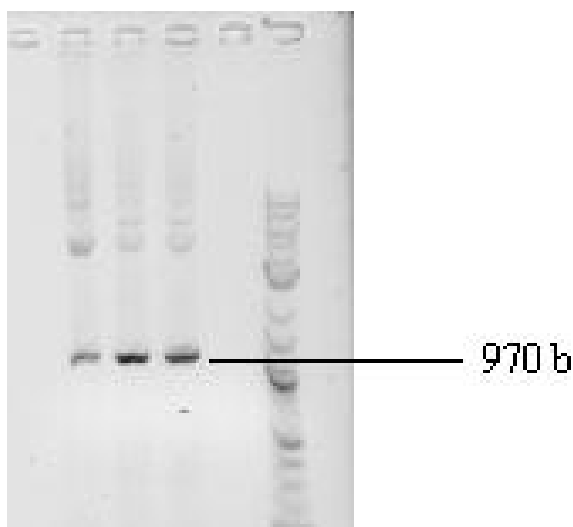
1    AAAAGGCGAG GCTGGCCCCG CCCCTTGAC CGCCACGTG GCCAGCGCCA CCTGCCTCAT
61   TGTGCCCAGG AGTTCTCCAA ACCCGCGCTG CGGAGTGAGT GACCAAGTTC CGGCCAGTTC
121  GACCTCGAGG ATCCAGAGGT GGAGACGGTA CTACCTCCCA GCTCTGTTTT CCATCCCCCTT
181  CAGGTCCTTC CTCGGGAGGC GGCGAAGGCG GTCCACCCTG CGCGTGATCC TTTATGCCCCG
241  GCCCCTGCCC CTCCCTCCGG GTGGAACTTC CCCCTCACCG CCAGACTTAA GCTGAGGATC
301  GTTGATATCT TGGCGGGGTG CAGAAGTGG CCCAGGCCAC AGTACCCTAT TCACGCTCTG
361  TGCTTGTGCC AAGGTTTCAA GTGATCCTCC CGCCTCAGCC TGCCAGGTG CTGAGATTAC
421  ATGTATGAGC CACTGCACCT GGAAAGGAGC CAGAAATGTG AAGTGCTAGC TGAAGGATGA
481  GCAGCAGCTA GCCAGGCAAA GGGGGCAATG GCGGCTTCCT GTGTTCTACT GCACACTGGG
541  CAGAAGATGC CTCTGATTGG TCTGGGTACC TGGAAGAGTG AGCCTGGTCA GGTAAAAGCA
601  GCTGTTAAGT ATGCCCTTAG CGTAGGCTAC CGCCACATTG ATTGTGCTGC TATCTACGGC
661  AATGAGCCTG AGATTGGGGA GGCCCTGAAG GAGGACGTGG GACCAGGCAA GGCGGTGCCT
721  CGGGAGGAGC TGTTTGTGAC ATCCAAGCTG TGGAACACCA AGCACCACCC CGAGGATGTG
781  GAGCCTGCCC TCCGGAAGAC TCTGGCTGAC CTCCAGCTGG AGTATCTGGA CCTGTACCTG
841  ATGCACTGGC CTTATGCCTT TGAGCGGGGA GACAACCCCT TCCCCAAGAA TGCTGATGGG
901  ACTATATGCT ACGACTCCAC CCACTACAAG GAGACTTGGA AGGCTCTGGA GGCCTGGTGG
961  GCTAAGGGGC TGGTGCAGGC GCTGGGCCTG TCCAACCTCA ACAGTCGGCA GATTGATGAC
1021 ATACTCAGTG TGGCCTCCGT GCGTCCAGCT GTCTTGCAAG TGGAATGCCA CCCATACTTG
1081 GCTCAAAATG AGCTAATTGC CCACTGCCAA GCACGTGGCC TGGAGGTAAC TGCTTATAGC
1141 CCTTTGGGCT CCTCTGATCG TGCATGGCGT GATCCTGATG AGCCTGTCTT GCTGGAGGAA
1201 CCAGTAGTCC TGGCATTGGC TGAAAAGTAT GGCCGATCTC CAGCTCAGAT CTTGCTCAGG
1261 TGGCAGGTCC AGCGGAAAGT GATCTGCATC CCCAAAAGTA TCACTCCTTC TCGAATCCTT
1321 CAGAACATCA AGGTGTTTGA CTTACCTTT AGCCCAGAAG AGATGAAGCA GCTAAATGCC
1381 CTGAACAAA ATTGGAGATA TATTGTGCCT ATGCTTACGG TGGATGGGAA GAGAGTCCCA
1441 AGGGATGCAG GGCATCCTCT GTACCCCTTT AATGACCCGT ACTGAGACCA CAGCTTCTTG
1501 GCCTCCCTTC CAGCTCTGCA GCTAATGAGG TCCTGCCACA ACGGAAAGAG GGAGTTAATA
1561 AAGCCATTGG AGCATCCATA AAAAAAAAAA AAAAAAA

```

Obrázek 7: Sekvence nukleotidů enzymu AKR1A1. Oranžově označená část sekvence vymezuje transkripční část genu se zvýrazněným start a stop kodonem.

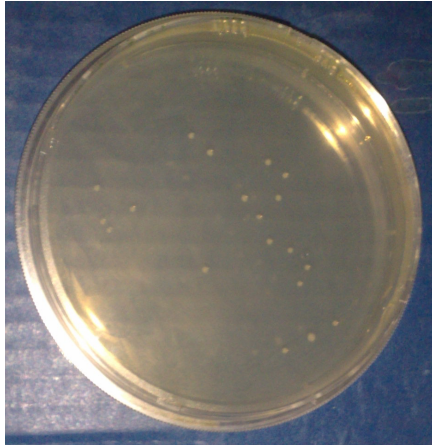
Pro namnožení kódové sekvence pomocí PCR, byla použita směs uvedená v tabulce 5. Při prvním pokusu nebyla reakce úspěšná. Proto byla nutná optimalizace procesu, přidáním hořčnatých iontů a DMSO. Hořčnaté ionty jsou kofaktorem termostabilních polymeras. Jejich přidání do směsi zvyšuje výtěžek požadované reakce. Příliš velká koncentrace hořčnatých iontů ve směsi naopak snižuje specifitu reakce. Přídavek DMSO také zvyšuje specifitu reakce a také snižuje teplotu tání sekvencí s velkým zastoupením CG nukleotidů. Tyto optimalizace jsou v souladu s literaturou. Roux (2009) uvádí přídavek hořčnatých iontů do reakce za stejně důležitý jako zvolenou teplotu reakce. Koncentrace $MgCl_2$ (2mM) použitá v reakci, vzhledem ke koncentraci dNTP (200 μ M) se shoduje s údaji Markoulatose a jeho vědecké skupiny (2002), kteří udávají koncentraci $MgCl_2$ 1,5 – 2mM na 200 μ M dNTP.

Takto upravená směs již zreagovala, což bylo ověřeno horizontální elektroforézou.



Obrázek 8: Elektroforetická analýza po PCR, ověření velikosti vzniklých produktů v podmínkách 0,8% agarosový gel, 90V 45 minut. Z pravé strany: molekulový marker 2-Log DNA, tři vzorky PCR produktů.

Nejobtížnějším krokem přípravy se ukázala ligace do plasmidu pET28b(+). Při prvním pokusu byla provedena ligace s nepřečištěnými produkty po restrikci, v dalších pokusech byly vždy purifikovány (postup viz 3.2.5.2). Po několika neúspěšných pokusech byly produkty PCR izolovány horizontální elektroforézou (viz postup 3.2.5.1), purifikovány, ošetřeny restrikčními endonukleasami a teprve poté byla provedena ligace. V rámci optimalizace byla také prodloužena doba preinkubace po transformaci na více než 2 hodiny. Ani tento postup však nepřinesl žádný pozitivní výsledek. Nakonec byla ligace úspěšná při použití většího množství T4 DNA ligasy. Původně se používala T4 DNA ligasa o koncentraci 400 jednotek na μl . Při úspěšném postupu byla použita T4 DNA ligasa o koncentraci 2 miliony jednotek na μl a doba ligace zůstala stejná – přes noc. Následně byla vzniklá plasmidová DNA transformována do buněk *E. coli* HB101 dle postupů 3.2.5.3 a 3.2.6.



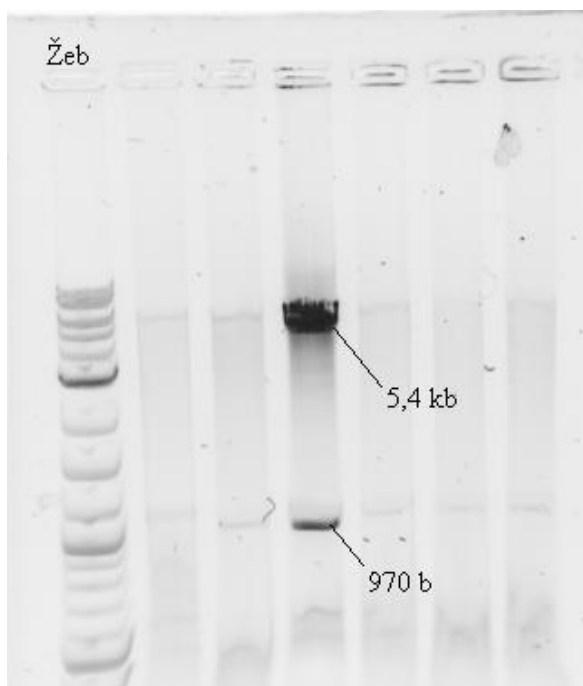
Obrázek 9: Petriho miska s narostlými koloniemi *E. coli* HB101 s vloženým plasmidem pET28b(+), po ligaci. Podmínky LB médium s 2% agarem a antibiotikem, teplota 37°C inkubace přes noc.

Pro ověření, že narostlé *E. coli* HB101 obsahují zaligovaný produkt, a ne pouze prázdný plasmid pET28b(+) byla po namnožení kolonie, izolaci plasmidu a purifikaci (dle postupu 3.2.2.2) provedena horizontální elektroforéza, která určila zaligované produkty.



Obrázek 10: Elektroforetická analýza po ligaci a transformaci v podmínkách 0,8% agarósový gel, 90V 45 minut. Molekulový marker (Žeb) 2-log DNA, pro kontrolu nanesen plasmid pET28b(+) a vzorky. Vzorky 1a – 1d, 2a a 4a – 4c odpovídají velikostí prázdnému plasmidu. Ostatní vzorky (ve vyznačeném obdélníku) jsou větší velikosti a v nich proběhla ligace a transformace úspěšně.

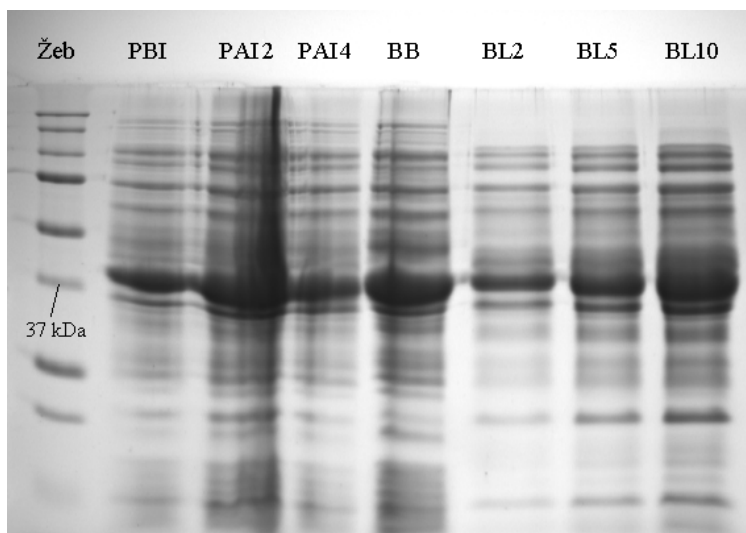
Před odesláním vzorků na sekvenaci byla pro kontrolu provedena tzv. zpětná restrikce (viz postup 3.2.5.2).



Obrázek 11: Kontrolní elektroforéza po zpětné restrikci v podmínkách 0,8% agarosový gel, 90V a 45 minut. Pro porovnání použit molekulový marker 2-log DNA (Žeb). Analýza potvrdila přítomnost plasmidu a kódové sekvence pro AKR1A1.

Vzorky ověřené zpětnou restrikcí byly odeslány na sekvenaci, která v prvním případě odhalila mutaci (delece jednoho páru nukleotidů). U druhého odeslaného vzorku byla potvrzena přítomnost cílové DNA bez nežádoucích změn.

Pro expresi cílového proteinu byly buňky *E. coli* kmen BL21 s transformovaným vektorem pET28b(+) se sekvencí pro AKR1A1 namnoženy ve 250 ml LB média s kanamycinem. Pro indukci exprese byl použit 1mM IPTG. Exprese probíhala 4 hodiny, po skončení byl dle postupu 4.7.1 připraven buněčný lyzát. Ke kontrole byly během postupu odebírány vzorky, první byl označen PBI (peleta před indukcí), další pak PAI (peleta po indukci), která byla odebrána po dvou a po čtyřech hodinách exprese. Všechny tři vzorky byly nanесeny do drah spolu s buněčným lyzátem v objemech 2, 5 a 10 μ l.



Obrázek 12: Analýza exprese enzymu v následujících podmínkách: 12,5 % separační a 4 % zaostřovací polyakrylamidový gel, napětí 200V a čas 40 minut. Molekulový marker (Žeb) Precision Plus Protein Standard All Blue, peleta před indukcí (PBI), peleta po dvou a čtyřhodinové expresi (PBI2, PBI4), peleta po rozbití buněk (BB) a buněčný lyzát v objemech 2, 5 a 10 μ l (BL2, BL5, BL10).

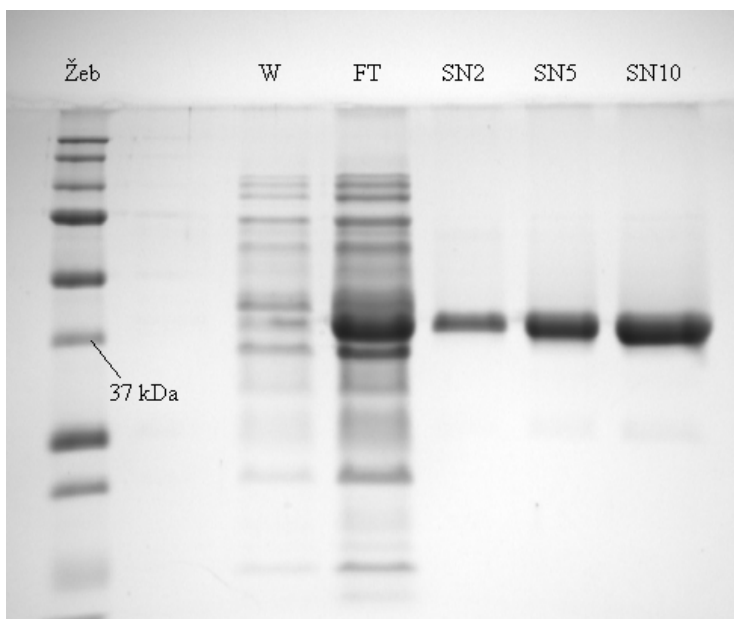
Výsledek analýzy prokázal produkci proteinu o velikosti 36 kDa, což odpovídá enzymu AKR1A1.

```

1   MAASCVLLHT GQKMPLIGLG TWKSEPGQVK AAVKYALSVG YRHIDCAAIY GNEPEIGEAL
61  KEDVGPVKAV PREELFVTSK LWNTKHHPED VEPALRKTLA DLQLEYLDLY LMHWPYAFER
121 GDNPFKKNAD GTICYDSTHY KETWKALEAL VAKGLVQALG LSNFNRSQID DILSVASVRP
181 AVLQVECHPY LAQNELIAHC QARGLEVTAY SPLGSSDRAW RDPDEPVLL EPPVVLALAEK
241 YGRSPAQILL RWQVQRKVIC IPKSITPSRI LQNIKVFDFE FSPEEMKQLN ALNKNWRYIV
301 PMLTVDGKRV PRDAGHPLYP FNDPY

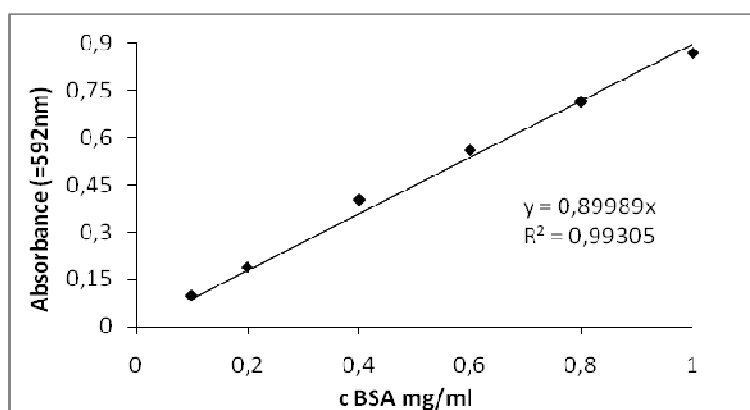
```

Obrázek 13: Primární struktura aminokyselin v enzymu AKR1A1.



Obrázek 14: Analýza po purifikaci enzymu v následujících podmínkách: 12,5% separační a 4% zaostřovací polyakrylamidový gel, napětí 200V a čas 40 minut. Molekulový marker (Žeb) Precision Plus Protein Standard All Blue, promývací frakce (W), supernatant bez enzymu, který se zachytil na koloně (FT) a konečný supernatant s purifikovaným AKR1A1 (SN) v objemech 2, 5 a 10 μ l.

Po purifikaci se enzym nacházel v elučním imidazolovém pufru, který snižuje aktivitu získaného enzymu a proto bylo nutné imidazol odstranit. Enzym byl převeden do draselno–fosfátového pufru (0,2M) (dle postupu 3.2.11) a poté byla změřena jeho koncentrace Bradfordovou metodou (postup 3.2.12). Jako standard k sestavení kalibrační křivky byl použit bovinní sérový albumin.



Obrázek 15: Kalibrační křivka pro měření aktivity enzymu metodou dle Bradforda

Na uložení enzymu byl použit roztok 85% glycerolu v poměru 1 : 1 k objemu použitého pufru. Enzym se uchovává při -20°C . Glycerol použitý k uchování enzymu zabraňuje tvorbě ledových krystalků, které narušují strukturu a funkci enzymu. Konečná koncentrace enzymu AKR1A1 je 1,9 mg/ml.

4.2 Měření aktivity enzymu

Aktivita enzymu byla měřena s *p*-nitrobenzaldehydem, pro který jsou v literatuře k dispozici údaje k porovnání. Reakční směs byla připravena dle postupu 3.2.13. Všechna měření probíhala za konstantní teploty 37°C po dobu 15 minut, kdy byl sledován pokles absorbance při 340 nm úměrný spotřebě kofaktoru NADPH.

První měření probíhalo v draselno-fosfátovém pufru (0,1M, pH 7,4). Pro druhé měření byl v reakční směsi vyměněn pufr za sodno-fosfátový (0,1M, pH 7,4). V tabulce 12 jsou uvedeny hodnoty specifické aktivity enzymu v obou pufrech.

Tabulka 12: Hodnoty specifické aktivity AKR1A1 s *p*-nitrobenzaldehydem v různých koncentracích v draselno-fosfátovém a sodno-fosfátovém pufru

konc. NBA [mM]	specifická aktivita v draselno- fosfátovém pufru [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$]	specifická aktivita v sodno- fosfátovém pufru [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$]
0,05	3,267	2,552
0,2	8,336	8,660
0,5	10,650	9,034
1	12,896	9,885
10	13,883	10,735

Při porovnání hodnot se ukázal K-P pufr vhodnější k uložení enzymu. Poté byly stanoveny kinetické parametry pro enzym AKR1A1 a substrát NBA. K měření bylo použito 5 různých koncentrací substrátu NBA v reakční směsi (0,05mM, 0,2mM, 0,5mM, 1mM a 10mM). Stanovení bylo provedeno v tripletu pro každou koncentraci. Hodnoty specifické aktivity ze třetího měření jsou uvedeny v tabulce 13.

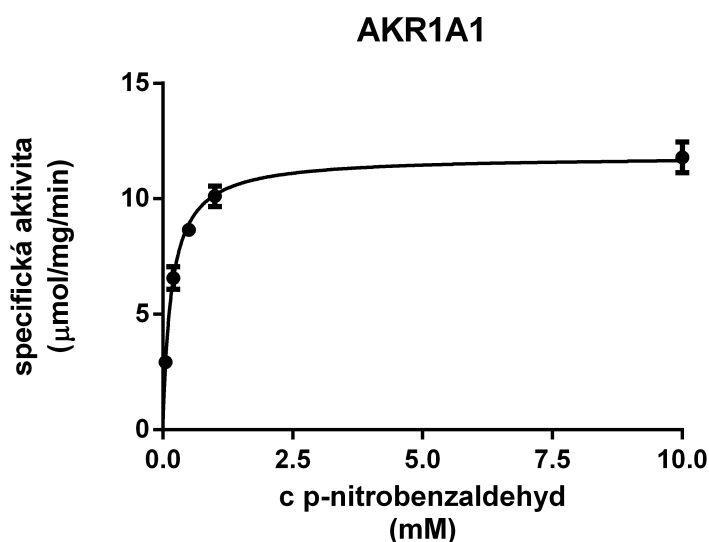
Tabulka 13: Hodnoty specifické aktivity AKR1A1 s NBA v draselno-fosfátovém pufru pro stanovení kinetických parametrů.

konc. NBA [mM]	specifická aktivita 1. řada [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$]	specifická aktivita 2. řada [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$]	specifická aktivita 3. řada [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$]	průměr hodnot specifické aktivity [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$]
0,05	3,556	2,348	1,650	2,518
0,2	8,438	7,451	6,482	7,457
0,5	9,034	8,459	8,707	8,733
1	9,221	9,174	9,575	9,323
10	11,561	10,641	10,786	10,996

Pomocí programu Grafpad Prism 6 byla z hodnot specifické aktivity zjištěna maximální rychlost V_{\max} a hodnota Michaelisovy konstanty K_M pro studovanou dvojici enzym substrát.

$$K_M = 164,76 \pm 12,69 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 11,839 \pm 0,213 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$$



Obrázek 16: Závislost specifické aktivity AKR1A1 na zvyšující se koncentraci substrátu. Kinetická data byla získána spektrofotometrickým měřením úbytku NADPH při 340 nm. Reakce probíhala v prostředí 0,1M draselno-fosfátového pufru, pH 7,4, při 37°C. Hodnota K_M pro NBA byla určena ze saturace 0,2mM NADPH.

Získané hodnoty specifické aktivity byly porovnány s literaturou, kde byly nalezeny hodnoty specifické aktivity $5,09 \pm 0,16 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (Riggs a kol., 2008) a $8,37 \pm 0,15 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (O'Connor a kol., 1999). V obou studiích byla aktivita enzymu měřena pro 1mM NBA při 25°C v sodno-fosfátovém pufru (0,1M), ostatní podmínky reakce byly shodné. Přesto bylo dosaženo vyšší specifické aktivity (9,32 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) při stejné koncentraci substrátu, tato hodnota přibližně odpovídá publikovaným datům. Rozdíl je dán odlišnými podmínkami reakce, jednak teplotou měření a použitým pufrům v reakční směsi. Vliv teploty je nezanedbatelný. Aktivita enzymů při zvyšující se teplotě narůstá až do teploty, která způsobí denaturaci enzymu. AKR1A1 je enzym fungující v lidském organismu, kde se teplota pohybuje okolo 37°C, proto byla zjištěna při této teplotě vyšší aktivita enzymu. Pufr zvolený pro měření aktivity a následnému uložení enzymu může také ovlivnit aktivitu enzymu, například imidazol obsažený v elučním pufru (viz purifikace enzymu), významně snižuje aktivitu enzymu. Proto byl enzym po purifikaci převeden do draselno-fosfátového pufru o pH 7,4, který, jak vyplývá z provedených měření, je vhodnějším pufrům pro AKR1A1 než sodno-fosfátový pufr o stejném pH.

5 Závěr

Do nedávné doby byly považovány redukční reakce za minoritní součást biotransformace, ale dnes se na ně soustřeďuje mnohem větší pozornost. Karbonyl redukující enzymy zaujímají významné místo v biotransformačních reakcích celé řady xenobiotik i v metabolismu endogenních látek jako jsou steroidní hormony, cholesterol a žlučové kyseliny, u kterých mají nezastupitelnou úlohu.

Enzym AKR1A1 se nachází ve většině tkání lidského organismu, nejvíce v hepatocytech a renálních buňkách. Jeho úlohou je redukce aldehydů a ketonů na příslušné alkoholy. Podílí se i na metabolismu sacharidů a steroidních hormonů. Jeho významnými substráty jsou antracyklinová chemoterapeutika – doxorubicin a daunorubicin.

Izolace cDNA z plasmidu pDNR-LIB, vloženého v *E. coli* kmen DH10B se zdařila bez větších obtíží. Sekvence byla namnožena pomocí polymerasové řetězové reakce, kterou bylo nutno optimalizovat přidáním Mg^{2+} a zopakovat. Spolu s plasmidem pET28b(+) byly produkty PCR ošetřeny restrikcími endonukleasami *XhoI* a *NdeI*. Naštěpené produkty byly zaligovány DNAligasou a transformovány do kompetentních buněk *E. coli* HB101, což bylo nutné pro negativní výsledky několikrát opakovat a optimalizovat. Po ověření sekvence DNA byla v buňkách indukována exprese enzymu AKR1A1, který byl následně purifikován afinitní chromatografií. Poté byla změřena koncentrace získaného enzymu metodou dle Bradforda. Nakonec byla ověřena aktivita enzymu inkubací s *p*-nitrobenzaldehydem, která odpovídala údajům z literatury. Během přípravy enzymu jsem si osvojila základní techniky klonování v prokaryotním systému.

Rekombinantně připravený enzym AKR1A1 bude sloužit k dalšímu studiu na katedře biochemických věd, k výzkumu jeho substrátů především z řady léčiv a také jeho inhibitorů.

Seznam zkratek

Alanin – Ala – A	Glutamin – Gln – Q	Prolin – Pro – P
Arginin – Arg – R	Glycin – Gly – G	Serin – Ser – S
Asparagin – Asn – N	Histidin – His – H	Threonin – Thr – T
Aspartát – Asp – D	Isoleucin – Ile – I	Tryptofan – Trp – W
Cystein – Cys – C	Leucin – Leu – L	Tyrosin – Tyr – Y
Fenylalanin – Phe – F	Lysin – Lys – K	Valin – Val – V
Glutamát – Glu – E	Methionin – Met – M	

AA – akrylamid
APS – persíran amonný
AKR – aldo-ketoreduktasa
ATB – antibiotikum
bis AA – bisakrylamid
BSA – bovinní sérový albumin
CaCl₂ – chlorid vápenatý
CBR – karbonylreduktasa
CNS – centrální nervový systém
CYP – cytochrom P450
D – Německo
DAO – diaminoxydasy
ddNTPs – dideoxyribonukleotidy
DMSO - dimethylsulfoxid
DNA – deoxyribonukleová kyselina
EDTA – ethylendiamintetraacetát
FAD – flavin adenin dinukleotid
FMO – flavinové monooxygenasy
GIT – gastrointestinální trakt
H₂O – voda
HCl – kyselina chlorovodíková
IPTG – isopropyl-1-β-D-galaktopyranosid
kb – kilobaze
KH₂PO₄ – hydrogenfosforečnan draselný

konc. – koncentrace
LB – Luria – Bertani
MAO – monoaminoxidasy
MDR – dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
mRNA – mediátorová RNA
NADH – nikotinamidadeninukleotid
NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBA – *p*-nitrobenzaldehyd
OD – optická denzita
PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky
PAO – polyaminoxidasy
PAPS – 3'fosfoadenin-5'fosfosulfát
PCR – polymerasová řetězová reakce
RNA – ribonukleová kyselina
SDR – dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SDS – dodecylsulfát sodný
TEMED – N,N,N',N'-tetraethylendiamin
UDP – uridin difosfát
UV – ultrafialové

Seznam použité literatury

- Abedin, Z., Sen, S. & Field, J. (2012). Aldo-keto reductases protect lung adenocarcinoma cells from the acute toxicity of B[a]P-7,8-trans-dihydrodiol. *Chemical research in toxicology*, 25 (1), 113-21.
- Anonymous. (2008). *QIAEX II Handbook*. Hilden: QIAGEN
- Barski, O. A. Tipparaju, S. M. & Bhatnagar, A. (2008a). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug metabolism reviews*, 4, 553-624.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M. & Bhatnagar, A. (2008b). Kinetics of nucleotide binding to the β -subunit (AKR6A2) of the voltage-gated potassium (Kv) channel. *Chemico-biological Interactions*, 178, 165-70.
- Barski, O. A., Gabbay K. H. & Bohren K. M. (1999). Characterization of the human aldehyde reductase gene and promoter. *Genomics*, 60, 188-98.
- Bio-Rad. (2013). *Precision plus protein prestained standard*, [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: <http://www.biorad.com/prd/en/US/adirect/biorad?cmd=BRCatgProductDetail&productID=241601>
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B. & Gabbay, K. H. (1989). The aldo-keto reductase superfamily. *The journal of biological chemistry*, 264, 9547-51.
- Brown, T. A. (2007). *Klonování genů a analýza DNA*. (M. Fellner, Překl.), Olomouc: Univerzita Palackého, ISBN: 978-80-244-1719-6.
- Ebert, B., Kisiela, M., Malátková, P., El-Hawari, Y. & Maser, E. (2010). Regulation of human carbonyl reductase 3 (CBR3; SDR21C2) expression by Nrf2 in cultured cancer cells. *Biochemistry*, 49, 8499-511.
- 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, 1326-30.
- FAQ: What is touchdown PCR? *New England Biolabs*, [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <https://www.neb.com/faqs/1/01/01/what-is-touchdown-pcr>
- Hoffmann, F. & Maser E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the shortchain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug metabolism reviews*, 39, 87-144.
- Kolektiv autorů. AKR1A1 - aldo-keto reductase family 1, member A1. *WikiGenes databáze*, [cit. 2012-10-23]. Dostupné z: <http://www.wikigenes.org/e/gene/e/10327.html>

- Kolektiv autorů (2012). AKR1A1 aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase) [Homo sapiens]. *National PubMed* databáze [cit. 2012-10-23]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10327>
- Kolektiv autorů (1999). Aldehyde reductase. *RCSB: Protein data bank* databáze [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2alr>
- Kolektiv autorů. Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] homo sapiens (human). *Uniprot KB* Databáze. [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P14550>
- Kolektiv autorů. Aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase) AKR1A1. *GeneCards human gene* databáze. [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKR1A1>
- Kolektiv autorů (2013). EC 1.1.1.2 Alcohol dehydrogenase (NADP(+)). *Enzyme structure database*. [cit. 2013-04-17] Dostupné z: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=1.1.1.2
- Kolektiv autorů (1992). EC 1.1.1.2., *Enzyme nomenclature* databáze [cit. 2012-10-25] Dostupné z: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/2.html>
- Kvasničková, E. (1995). *Xenobiochemie*, Karolinum, ISBN 80-7066-993-4.
- Ledvina, M., Stoklasová E., & Cerman J. (2009). *Biochemie pro studující medicíny*, Karolinum (2), ISBN 978-80-246-1414-4.
- Lincová, D., Farghali, H. & kolektiv (2007). *Základní a aplikovaná farmakologie: Druhé, doplněné a přepracované vydání*, Galén, ISBN 970-80-7262-373-0.
- Markoulatos, P., Siafakas, N. & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*, 16, 47-51.
- Mindnich, R., Drury, J. E. & Penning, T. (2010). The effect of disease associated point mutations on 5 β -reductase (AKR1D1) enzyme function. *Chemico-biological interactions*, 191, 250-54.
- Mindnich, R. & Penning T. M. (2009). Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Human genomics*, 3, 362-70.
- NEB (2013). *2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb)*, New England Biolabs [cit. 2013-03-15], Dostupné z: <https://www.neb.com/products/n3200-2-log-dna-ladder-01-100-kb>
- O'Connor, T., Ireland, L. S., Harrison, D. J. & Hayes, J. D. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochemical journal*, 343, 487-504.

- Oppermann, U. C. T. & Maser, E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144, 71-81.
- Penning, T. M. & Drury J. E. (2007). Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Science direct*, 464, 241-50.
- Pérez-Sala, D., Díez-Decal, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Timms, J. F., Coderch, C. & Gago, F. (2011). Identification of aldo-keto reductase AKR1B10 as a selective target for modification and inhibition by prostaglandin A1: implications for antitumoral activity. *Cancer research*, 71, 4161-71.
- Persson, B. & Kallberg Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-biological interactions*, 202, 111-15.
- Riggs, K. W., Takahashi R. H., Bains, O. S., Pfeifer, T. A., Grigliatti, T. A. & Reid, R. E. (2008). Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug metabolism & disposition*, 36, 904-10.
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold spring harbor protocols*.
- Ruiz, F. X., Moro, A., Gallego, O., Ardévol, A., Rovira, C., Petrash, J. M., Parés, X. & Farrés, J. (2011). Human and rodent aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily and their specificity with retinaldehyde. *Chemico-biological interactions*, 191, 195-205.
- Rumlova, M., Pačes, V., & Ruml, T. (2003). *Základní metody genového inženýrství*, Praha: JPM Tisk.
- Salabei, J. K., Xiao-Ping, L., Petrash, J. M., Bhatnagar, A. & Barski, O. A. (2011). Functional expression of novel human and murine AKR1B genes. *Chemico-biological Interactions*, 191, 177-84.
- Skálová, L., Boušová I. & kolektiv (2011). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Karolinum, ISBN 978-80-246-1917-0.
- Zhang, J. & Blanco J. G. (2009). Identification of the promoter of human carbonyl reductase 3 (CBR3) and impact of common promoter polymorphisms on hepatic CBR3 mRNA expression, *Pharmaceutical research*, 26, 2029-15.