

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

**Imunochemické stanovení enzymů DHRS8 a DHRS12
v lidských tkáních**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce:

Hradec Králové, 2016

RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Markéta Svobodová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Tereze Lundové za její cenné rady a trpělivost při práci v laboratoři i mimo ní, které mi pomohly při tvorbě této diplomové práce. Dále děkuji své vedoucí RNDr. Evě Novotné, Ph.D. za vstřícné chování a odbornou pomoc v této problematice.

Taktéž bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mě podporovali nejen při tvorbě této diplomové práce, ale i po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Markéta Svobodová

Školitel: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Název diplomové práce: Imunochemické stanovení enzymů DHRS8 a DHRS12 v lidských tkáních

Dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodiny) člen 8 (DHRS8, SDR16C2) a dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodiny) člen 12 (DHRS12, SDR40C1) jsou lidské mikrosomální enzymy, které patří do nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Tato nadrodina představuje jednu z největších proteinových skupin. SDR enzymy se podílejí na metabolismu různých endogenních a cizorodých látek a jsou zapojeny do fyziologických i patologických procesů. Nicméně, stále existuje mnoho enzymů, které nejsou dostatečně charakterizovány.

Doposud jsou k dispozici informace o DHRS8 jen na úrovni mRNA a o její katalytické aktivitě vůči 5 α -androstan-3 α -17 β -diolu. Navíc neexistují dosud publikované informace (kromě predikce) ohledně DHRS12.

Cílem této studie bylo prozkoumat expresi DHRS8 a DHRS12 v různých lidských tkáních na úrovni proteinu. Vzorke tkáně byly odebrány od čtyř mužů středního věku po náhlé smrti bez zjevného onemocnění. Detekce proteinů byla provedena pomocí Western blottingu a specifických protilátek. Rekombinantní forma hledaných proteinů (DHRS12, DHRS8) byla exprimována v *Sf9* hmyzích buňkách a byla použita jako kontrola.

Podle našich výsledků je enzym DHRS8 široce exprimován v mnoha tkáních s největším nálezem v játrech a nadledvinách. DHRS12 byla detekována pouze na úrovni mozku. Za pomoci nově získaných informací je možné odhadnout úlohy těchto enzymů v lidském těle.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Markéta Svobodová

Supervisor: RNDr. Eva Novotná, Ph.D

Title of diploma thesis: Expression of DHRS8 and DHRS12 enzymes in human tissues

Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8 (DHRS8, SDR16C2) and dehydrogenase/reductase (SDR family) member 12 (DHRS12, SDR40C1) are human microsomal enzymes belonging to the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). This superfamily represents one of the largest protein groups. SDR enzymes participate in the metabolism of various xenobiotic and endogenous compounds and are involved in physiological and pathological processes. However, there are still many enzymes which are only poorly characterised.

To this date, the expression on mRNA level and catalytic activity toward 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol are the only available information about DHRS8. Moreover, there is still no published information (apart from the prediction) regarding DHRS12.

The aim of this study was to examine the protein expression of DHRS8 and DHRS12 enzymes in various human tissues. The tissue samples were collected from four middle aged male subjects after the sudden death without apparent disease. Proteins of interest were detected using western blotting and specific antibodies. Recombinant form of searched proteins (DHRS12, DHRS8) expressed in *Sf9* insect cells was used as a control.

According to our results, DHRS8 is widely expressed in many tissues with the highest level in the liver and adrenal glands. On the other hand, the expression of DHRS12 was detected only in the brain. Our data could help to estimate the role of these enzymes in human body.

OBSAH

A. ÚVOD.....	8
B. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 Metabolismus sloučenin s karbonylovou skupinou	9
2 SDR nadrodina enzymů	10
2.1 Přehled objevů proteinů SDR nadrodiny.....	10
2.2 Výskyt enzymů SDR nadrodiny u organismů	11
2.3 Názvosloví SDR nadrodiny.....	12
2.4 Struktura	13
2.5 Metabolická aktivita.....	14
2.6 Nemoci způsobené změnou struktury enzymu	16
2.7 DHRS8	17
2.7.1 Názvosloví a zařazení.....	17
2.7.2 Výsledky dosavadních studií.....	17
2.8 DHRS12	20
2.8.1 Nomenklatura, zařazení.....	20
2.8.2 Struktura, metabolická aktivita	20
2.8.3 Výsledky dosavadních studií.....	21
3 Proteomika	21
3.1 Western Blotting	21
3.2 SDS-PAGE	22
C. CÍL PRÁCE.....	26
D. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4 Materiál	27
4.1 Pomůcky a přístroje	27
4.2 Chemikálie	28
4.3 Zásobní roztoky:.....	30
4.4 Standard molekulových hmotností	35
4.5 Kity	35
4.6 Protilátky.....	35
4.7 Vzorky	36
5 Metodika.....	37
5.1 Dot blot.....	37
5.2 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	38
5.2.1 Příprava polyakrylamidového gelu	38
5.2.2 Příprava vzorků pro elektroforézu	39
5.2.3 Příprava kontrolního (porovnávacího) vzorku.....	40
5.2.4 SDS elektroforéza	40
5.3 Western blotting (WB)	41
5.3.1 Semi-dry přenos	41
5.3.2 Wet přenos.....	42
5.4 Kontrola přenosu proteinů (barvení membrány pomocí Ponceau S).....	43
5.5 Blokace membrány	43
5.6 Příprava a aplikace protilátek.....	44

5.6.1	Příprava protilátek	44
5.6.2	Nanášení protilátek	45
5.7	Vizualizace a vyhodnocení	45
5.8	Měření koncentrace proteinu metodou BCA	46
5.9	Stripování, znovupoužití membrány	46
E.	VÝSLEDKY	47
6	DHRS8	47
6.1	Optimalizace detekce proteinu DHRS8	47
6.1.1	Optimalizace ředění králičí protilátky proti DHRS8	47
6.1.2	Zkouška zvoleného ředění protilátky na reálných vzorcích	48
6.1.3	Zvýšení účinnosti přenosu proteinů na membránu	49
6.1.4	Úprava ředění primární protilátky	50
6.1.5	Úprava složení ředícího roztoku protilátky	51
6.1.6	Ověření stability vzorků	52
6.1.7	Optimalizace „nové“ primární protilátky (ab 103087)	52
6.2	Optimalizované stanovení exprese DHRS8 ve vzorcích	53
6.2.1	Homogenát z tkání člověka 3.....	54
6.2.2	Mikrosomy z tkání člověka 4	54
6.2.3	Mikrosomy ze tkání člověka 5.....	55
7	DHRS12	56
7.1	Optimalizace detekce proteinu DHRS12	56
7.2	Testování na lidských tkáních	57
7.2.1	Homogenát ze tkání člověka 1.....	57
7.2.2	Mikrosomy z tkání člověka 5	58
F.	DISKUZE.....	60
G.	ZÁVĚR.....	63
H.	POUŽITÉ ZKRATKY	64
I.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	68
J.	SEZNAM TABULEK.....	70
K.	LITERATURA	71

A. ÚVOD

Enzymy jak je všeobecně známo zajišťují jednu z nejzákladnějších funkcí v buňce a to enzymovou katalýzu. Pomocí katalytických reakcí se uskutečňují chemické pochody v buňce, které utvářejí celý metabolismus organismu.

Dehydrogenasy/reduktasy rodiny SDR jsou enzymy s vysokým zastoupením u všemožných organismů. Po objevení těchto enzymů i u lidí se naskytla příležitost ke kladení spousty klíčových otázek. Co to je za enzymy? Kde se nacházejí a které z metabolických pochodů ovlivňují?

Touto problematikou se zabývá vědecká skupina na Katedře biochemických věd, Faf UK v Hradci Králové, pod vedením prof. Ing. Vladimíra Wsóla, Ph.D., které jsem byla součástí. Mým úkolem bylo stanovit expresi dvou konkrétních enzymů DHRS8 a DHRS12 v lidských tkáních za použití imunochemických metod.

Naše skupina přispěla k poznání těchto enzymů, pomohla přibližně určit, k jakému účelu tyto enzymy slouží a potvrdila nebo vyvrátila vzniklé domněnky v ovlivnění celého organismu.

B. TEORETICKÁ ČÁST

1 Metabolismus sloučenin s karbonylovou skupinou

Karbonylová skupina je přítomná jak v endogenních tak i xenobiotických sloučeninách. Karbonyl můžeme nalézt u ketonů, aldehydů a chinonů. Enzymy, které metabolizují sloučeniny s karbonylovou skupinou lze rozdělit do pěti základních skupin, tzv. nadrodin. Jedná se o aldo-ketoreduktasy (AKR), aldehyddehydrogenasy (ALDH), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a NAD(P)H-dependentní chinonreduktasy (QR) (Obrázek 1) (Štambergová, 2013; Oppermann et al., 2000).

Název	Funkce	Koenzym	Velikost	Struktura
MDR Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem	Oxidace alkoholů, redukce chinonů, endogenní dehydrogenace/redukce	Převážně NAD(H)	Cca 370 zbytků	Nukleotidově vázaná doména Rossmannova záhybu, dvou-doménová struktura, většinou Zn ²⁺ -dependentní enzymy
ALDH Aldehyddehydrogenasy	Oxidace endogenních a xenobiotických aldehydů	NAD(P)+	Cca 500 zbytků	Tří-doménové enzymy, nukleotidově vázaná doména Rossmannova záhybu
AKR Aldo-ketoreduktasy	Oxidace endogenních a xenobiotických karbonylů, alkoholů a C=C	NADP(H)	Cca 320 zbytků	(α/β)(TIM) Barrel; bez nukleotidově vázané domény Rossmannova záhybu
SDR Krátko řetězcové dehydrogenasy/reduktasy	Oxidace endogenních a xenobiotických substrátů lyasy, epimerasy	NAD(P)(H)	Cca 270 zbytků	α/β -Fold, one-domain Rossmann-fold nucleotide binding site
QR NAD(P)H- dependentní chinonreduktasy	Dvou elektronová redukce endogenních a xenobiotických chinonů	NAD(P)H; N-alkyl, N-ribosyl nikotinamid	Cca 280 zbytků	Flavodoxinový záhyb FAD

Obrázek 1: Přehled enzymů redukcujících sloučenin s karbonylovou skupinou (upraveno dle Oppermann et al., 2000).

2 SDR nadrodina enzymů

2.1 Přehled objevů proteinů SDR nadrodiny

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) tvoří jednu z největších enzymatických nadrodin. Nejvíce frekventovaný je klasický typ s 285 rodinami a 68 000 členy a s prodlouženým řetězcem zahrnující 81 rodin a 38 000 členů. V současné době existuje celkem 163 120 členů v UniprotKB (elektronická databáze proteinů) přiřazených k SDR nadrodině. Z nich 122 940 lze přiřadit do 464 rodin, zatímco zbývajících 40 180 je složeno z příliš krátkých úseků, aby byly použitelné pro Hidden Markov model (klasifikační metoda, viz kap. 2.3.) (Persson et al., 2013).

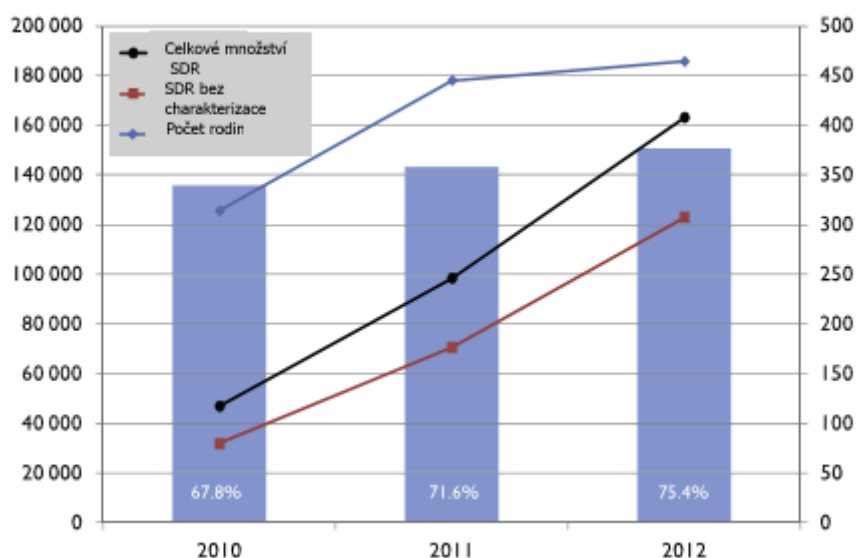
V 70. letech 20. století byl nalezen první enzym patřící do SDR nadrodiny. Průkopníkem byl zástupce z hmyzí říše, alkoholdehydrogenasa s následným pokračovatelem ribitoldehydrogenasou, která byla objevena u bakterií (Persson et al., 2013).

V počátečních studiích byly SDR enzymy zaznamenány pouze u bakterií a nižších eukaryot. Teprve pozdější masivní metagenomické sekvenování ukázalo, že tyto enzymy se nacházejí u všech druhů organismů a představují tak jednu z největších známých proteinových nadrodin (Persson et al., 2013; Bhatia et al., 2015).

V 90. letech bylo přidáno dalších 20 členů. V roce 1992 byl zaveden klasifikační systém HMM a bylo objeveno až 47 000 dalších členů (Persson et al., 2013).

V roce 2009 bylo sekvenováno více než 140 různých enzymů a z toho 70 z nich bylo zařazeno mezi lidské SDR enzymy (Tang et al., 2014).

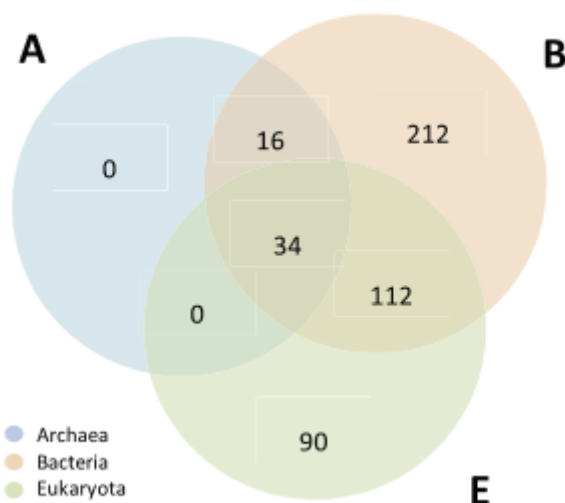
Počet členů SDR nadrodiny se od roku 2010 úměrně navyšoval společně s objevováním nových sekvencí, které byly postupně zapisovány do databází. Od 47 000 členů v roce 2010 po 163 000 členů v roce 2012. Naopak počet rodin se stejným tempem nezvyšoval. V roce 2010 bylo známo 314 rodin, zatímco v roce 2012 se jejich počet zvýšil na 464. Procentuální podíl popsanych SDR rodin se zvýšil z 68 % v 2010 na 75 % v roce 2012. To znamená, že celkový počet rodin je omezený. Tuto situaci znázorňuje Obrázek 2. Na pravé části osy y je znázorněn celkový počet objevených rodin. Naopak na levé straně osy y jsou vyobrazené rodiny, patřící do SDR nadrodiny. Odpovídající podíl rodin je znázorněn ve sloupcích (Persson et al., 2013).



Obrázek 2: Vývoj charakterizovaných SDR rodin od roku 2010 po rok 2012 (upraveno dle Persson et al, 2013).

2.2 Výskyt enzymů SDR nadrodiny u organismů

Obrázek 3 ukazuje zastoupení enzymů patřících do SDR nadrodiny u organismů. Nejvíce zástupců bylo objeveno u bakterií (374 rodin). U eukaryot bylo charakterizováno 236 rodin, zatímco u archeí pouze padesát. Devadesát rodin se vyskytuje pouze u eukaryot, zatímco 212 je specifických pouze pro bakterie. Pro archea nejsou specifické žádné rodiny. Zároveň 34 SDR rodin je součástí všech tří říší organismů (Persson et al., 2013).



Obrázek 3: Zastoupení SDR rodin u organismů (upraveno podle Persson et al., 2013).

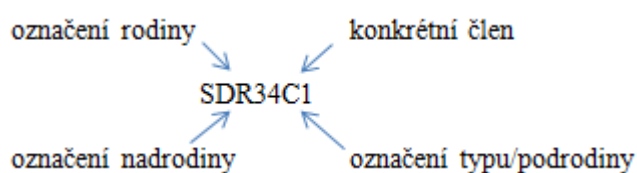
2.3 Názvosloví SDR nadrodiny

SDR nadrodina je velmi rozsáhlá skupina proteinů. Pro klasifikaci jednotlivých SDR rodin byl zaveden nový semiautomatický systém, tzv. Skrytý Markovův model (Hidden Markov model; HMM). Metoda je založená na analytickém zpracování sekvenčních motivů enzymů, které byly extrahovány z UniprotKb databáze. Zkoumají se vlastnosti proteinu jako je lipofilita, distribuce nabitých zbytků, aminokyselinová preference, existence signálních peptidů a vývojové informace odvozené od více sekvenčních podobností (Jörnvall et al., 2014; Tsaousis et al., 2014).

Metoda se stala velmi populární v bioinformatice a je úspěšně používána pro klasifikaci proteinů. Vytvoření HMM usnadnilo orientaci v databázích a v nových údajích v genomových datech při detekci dalších členů. HMM umožňuje identifikovat a využít sekvenční uspořádání, které by jinak bylo těžce odhalitelné (Persson et al., 2013).

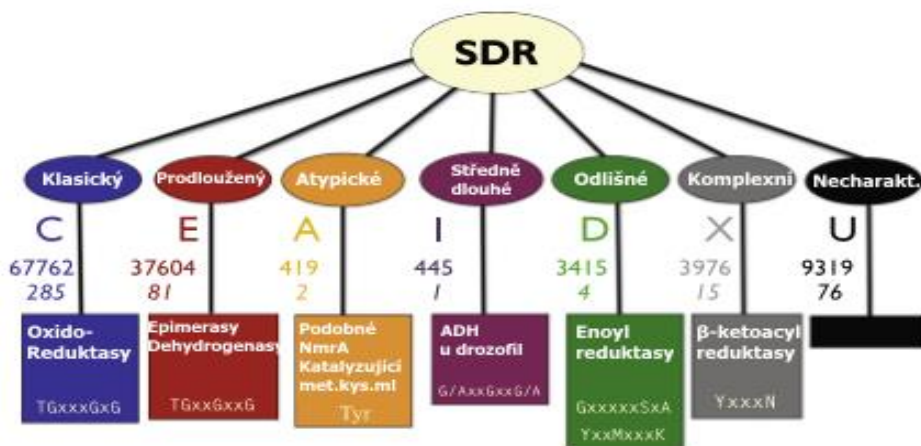
Použitím této metody bylo rozlišeno minimálně pět základních typů lidských SDR skupin. Tato analýza anotovaných SDR sekvencí byla později použita jako nomenklaturní vzor pro nově objevené enzymy a posunula celý výzkum významně dopředu (Bhatia et al., 2015).

V názvoslovném schématu (Obrázek 4) bylo každé SDR rodině přiřazeno číslo. V současné době je nalezeno 48 lidských SDR rodin, kterým byla přidělena názvoslovná čísla od 1 do 48. Po očíslování všech lidských rodin, byla dána přednost SDR rodinám ze savčí říše nebo jiných eukaryot. Těm rodinám, které se vyskytovaly ve všech říších, byla přiřazena nižší čísla než u rodin, které se vyskytovaly jen v jedné nebo dvou říších. U dalších rodin, které byly zastoupeny v bakteriální říši a u archeí byla dána čísla v souladu s klesající velikostí rodiny. A jako poslední SDR rodiny, které se vyskytují jen u bakterií, taktéž podle stoupající velikosti, začínající tou nejrozsáhlejší. Mezi poslední, nejvyšší čísla by byla přiřazena rodina, která se vyskytuje jen u archeí. Ta však zatím nebyla objevena. Z toho vyplývá, že nejnižší čísla připadají lidským a nejvíce zastoupeným rodinám enzymů (Persson et al., 2013).



Obrázek 4: Názvosloví SDR nadrodiny (převzato z Štambergová H., 2013).

Celkově byly lidské SDR enzymy rozděleny do sedmi skupin rodin. Tyto základní typy SDR enzymů byly označeny písmeny C (classical), E (extended), A (atypical), I (intermediate), D (divergent), X (complex), U (unassigned) (Obrázek 5) (Persson et al., 2013).



Obrázek 5: Sedm typů enzymů SDR rodiny známých v roce 2012 (převzato dle Persson et al., 2013). Na tomto přehledu můžeme vidět rozdělení SDR enzymů do sedmi typů. Společně s každým typem je přiřazen i počet SDR forem a rodin (kurzívou). Pod uvedením počtu, jsou v obdélnících příklady enzymatické aktivity a charakteristická sekvence pro každý typ.

Všechny SDR rodiny jsou uvedeny na webové stránce <http://www.sdr-enzymes.org>. Každý měsíc jsou zapisovány nově charakterizované sekvence genomů. Tento pokrok je daný zejména zlepšením sekvenčních technologií. Je pravděpodobné, že SDR rodina stále poroste a v budoucnu se bude muset zavést opět nový systém pro názvosloví (Persson et al., 2013).

2.4 Struktura

Na základě modelů enzymů, vytvořených ze znalostí příslušných mRNA se zjistilo, že enzymy, patřící do SDR nadrodiny, mají vysokou sekvenční variabilitu, jejich podobnost je pouze 15-30 % (Tang et Le, 2014; Persson et al., 2013).

Enzymy z SDR rodiny obsahují většinou 250 („classical SDR“) až 350 („extended SDR“) aminokyselinových zbytků (Tang et Le, 2014). Mohou být monomery, dimery nebo dokonce tetramery (Morris et al., 2004).

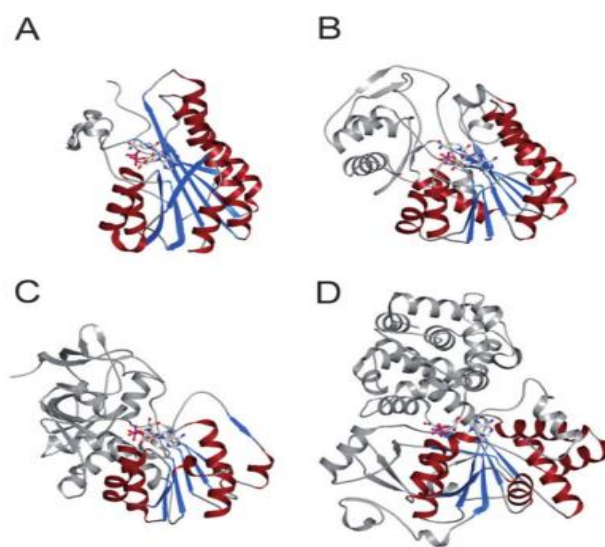
N-koncová doména SDR enzymů váže kofaktor. Toto místo je tvořeno Rossmannovým záhybem s centrálními paralelně uspořádanými 6 -7 beta-listy. Tyto beta-listy jsou lemovány z každé strany 3-4 alfa helixy (Obrázek 6). Takto uspořádaná strukturální formace poskytuje „lešení“ pro různé sekvenční prvky, které tvoří prostředí pro navázání

kofaktoru a určují specifitu bílkoviny (Kavanagh et al., 2008).

Vazebné místo pro substrát je lokalizováno na terminálním C-konci. Další drobné domény jsou občas pozorovány u prodloužených SDR enzymů (Kavanagh et al., 2008).

Katalytická tetráda je u SDR enzymů většinou tvořena aminokyselinami Asn-Ser-Tyr-Lys. Serin a asparigin jsou velice konzervované na rozdíl od tyrosinového zbytku, který není vždy zastoupen (Persson et al., 2013).

Zajímavá je podobnost aktivního místa aldo-ketoreduktas s SDR nadrodinou. Jedná se o příklad tzv. konvergentní evoluce konformace aktivní strany (Bhatia et al., 2015).



Obrázek 6: 3D porovnávací model klasických SDR, prodloužených SDR, MDR a LDR enzymů (Kavanagh et al., 2008).

(A) SDR zástupce s klasicky dlouhým řetězcem (3α , 20β -hydroxysteroiddehydrogenasy), (B) SDR zástupce s prodlouženým řetězcem (galaktoepimerasa). (C) SDR zástupce se středně dlouhým řetězcem (alkoholdehydrogenasa z koňských jater). (D) SDR zástupce s dlouhým řetězcem (manitoldehydrogenasa). Rossmannův záhyb je vyobrazen s beta listy v modré a helixy v červené barvě. Další domény a sekundární strukturální prvky jsou znázorněné šedě.

2.5 Metabolická aktivita

Dehydrogenasy/reduktasy patřící do SDR nadrodiny zaujímají z celého množství reduktas až 25 % (Persson et al., 2009).

Téměř polovina z nich jsou typu s prodlouženým řetězcem, pro který je charakteristická epimerasová a dehydrogenasová aktivita (Persson et al., 2013).

Atypické SDR enzymy jsou zapojeny v adaptaci redoxního stavu nebo zpracování

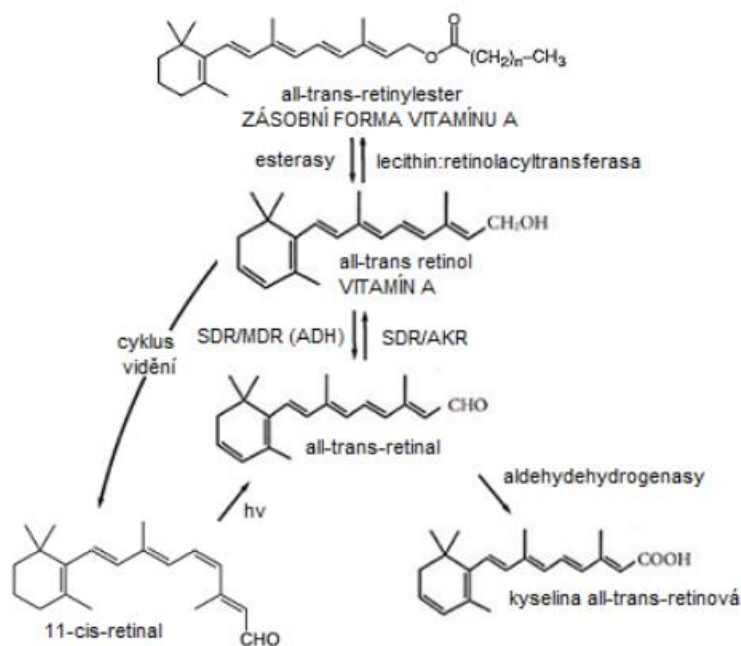
RNA. Díky této aktivitě SDR enzymů můžeme říct, že jsou nedílnou součástí celé řady životně důležitých buněčných procesů (Bhatia et al., 2015).

Škála metabolických procesů enzymů SDR nadrodiny nezahrnuje jen přeměnu eobiotických substrátů, ale taktéž xenobiotik. Enzymy zasahují do metabolismu lipidů, aminokyselin, sacharidů i hormonů. Jedná se například o steroidní hormony, prostaglandiny a retinoidy (Tang et Le, 2014; Lukacik et al., 2006).

Významnou skupinou jsou 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD), které se zapojují do metabolismu androgenů a estrogenů. Aktivita enzymů spočívá v katalýze oxidace hydroxylových nebo redukce karbonylových skupin v pozici C17 u androgenů a estrogenů. Díky uvedené reakci je možné tímto způsobem regulovat nitrobuněčnou dostupnost steroidních hormonů a jejich vazbu na jaderné receptory. V roce 1997 bylo veřejně známo pět 17 β -HSD isoenzymů-(17 β -HSD typ 1 až 5). Nález enzymů byl potvrzen jak u opic tak u člověka (Labrie et al., 1997).

Na metabolismu látek se steroidní strukturou (pohlavních hormonů, mineralokortikoidů a glukokortikoidů) se podílí dále 3 β -hydroxysteroiddehydrogenasy a 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (McBride et al., 1999; Wu et al., 2007).

Další významnou skupinou jsou retinoldehydrogenasy, které zasahují do metabolismu retinoidů (derivátů vitamínu A). Kyselina retinová, je syntetizována dvěma kroky z retinolu (Obrázek 7). Prvním krokem je oxidace all-*trans*-retinolu na all-*trans*-retinalaldehyd. Tato reakce je katalyzována cytosolickou alkoholdehydrogenasou (ADH), která patří do nadrodiny dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) a mikrosomální retinoldehydrogenasou, která je členem nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Druhým krokem je oxidace all-*trans*-retinalaldehydu na kyselinu retinovou za spoluúčasti několika aldehyddehydrogenas (většinou retinaldehyddehydrogenasa typu 2) nebo některých enzymů z nadrodiny aldoketoreduktas (Parés et al, 2008; Haeseeler et al., 1998; Billings et al., 2013).



Obrázek 7: Příklad metabolismu retinoidů, do kterého zasahují enzymy z nadrodiny SDR (upraveno z Haeseeler et al., 1998; Billings et al., 2013).

Do nadrodiny SDR enzymů se dále řadí lidské karbonylreduktasy CBR1, CBR3 a CBR4. Jedná se o cytosolické SDR enzymy, z nichž zejména CBR1 patří mezi nejlépe charakterizované enzymy této nadrodiny. CBR1 se účastní metabolismu nejen eobiotických substrátů, ale také celé řady vysoce toxických sloučenin (např. 9,10-fenanetrenchinonu nebo 4-methylnitrosamin-1-(3-pyridyl)-1-butanonu vyskytujícího se v cigaretovém kouři) (Kassner et al., 2008).

2.6 Nemoci způsobené změnou struktury enzymu

Enzymy z SDR nadrodiny ovlivňují řadu metabolických pochodů. Pokud tedy dojde k narušení hladiny těchto enzymů, vzniká disbalance, která se může projevit onemocněním. Jako příklad lze uvést enzymový polymorfismus, který může mít za následek různá genetická onemocnění, např. diabetes mellitus II. typu (11 β -HSD1) (Keildson et al., 2014).

Vzhledem k tomu, že SDR enzymy ovlivňují metabolismus steroidních hormonů, nerovnováha aktivní formy hormonů může být jedna z příčin onemocnění. SDR enzymy mohou být také zapojeny do procesu karcinogeneze. Příkladem je 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (17 β -HSD) se podílí na rakovině prsu (Rotinen et al., 2009).

Dalším příkladem může být enzym 17 β -HSD8, který reguluje konverzi estradiolu na estron. Snížení jeho exprese mělo za následek vznik recesivní polycystické nemoci ledvin (Rotinen et al., 2009).

Některé z SDR enzymů mohou také zasahovat do degenerativních a zánětlivých onemocnění jako je Alzheimerova choroba (17 β -HSD10, CBR1), osteoporóza nebo, Cushingova choroba (11 β -HSD2) a onemocnění s poruchou zraku (RDH1-14) (Draper et al., 2005; Keller et al., 2006; Parker et al., 2010; Štambergová et al., 2016).

2.7 DHRS8

2.7.1 Názvosloví a zařazení

Dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodina) člen 8 (DHRS8, SDR16C2) je také známá jako retinaldehydrogenasa/reduktasa 2 s krátkým řetězcem 2 (retSDR2), Pan1b nebo 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 11 (17 β -HSD11). Tento enzym patří do jedné z nejpočetnějších rodin SDR16C, dehydrogenas/reduktas (SDR) s krátkým řetězcem. Doposud bylo objeveno pět lidských zástupců SDR16C (Chai et al., 2003; Bray et al., 2009; Persson et al., 2013).

V prvotních studiích je záznam o enzymu s názvem Pan1b s 17 β -hydroxysteroidních aktivitou (Li et al., 1998). Díky identické sekvenci v databázi proteinů byly názvy Pan1b a retSDR2 sdruženy a přejmenovány na 17 β -HSD11 (Haeseleer et al., 2000).

Nejvyšší procento sekvenční podobnosti (63 %) s DHRS8 má enzym SCDR9, člen SDR16C. Katalytická aktivita tohoto enzymu však nebyla dosud charakterizována (Lundova et al., 2016).

2.7.2 Výsledky dosavadních studií

Pro základní pochopení možné funkce enzymu je důležité znát lokalizaci enzymu, jeho katalytickou aktivitu a profil exprese. Některé z těchto faktů jsou u enzymu DHRS8 již známé, ale obecně je třeba shrnout a rozšířit škálu poznatků o tomto enzymu (Lundova et al., 2016).

Přestože zájem o bližší studium DHRS8 se projevil, charakteristika enzymu nebyla úplná. Například v názvosloví jsou velké nesrovnalosti. Jak bylo výše sepsáno, tento enzym má názvů mnoho (Bray et al., 2009).

Lokalizace v buňce

Přesný výskyt enzymu v buňce není přesně daný, neboť jeho přítomnost byla zaznamenána v endoplasmatickém retikulu, ale také v cytosolu. Enzym DHRS8 může být dále redistribuován do lipidových částic (Yokoi et al., 2007; Horiguchi et al., 2008).

O DHRS8 enzymu je dále známo, že obsahuje transmembránový úsek. Protein se skládá z N-konce, který prostupuje membránu a C-konce, který zaujímá větší část (aktivní strana) a je orientovaný do cytosolu (Lundova et al., 2016).

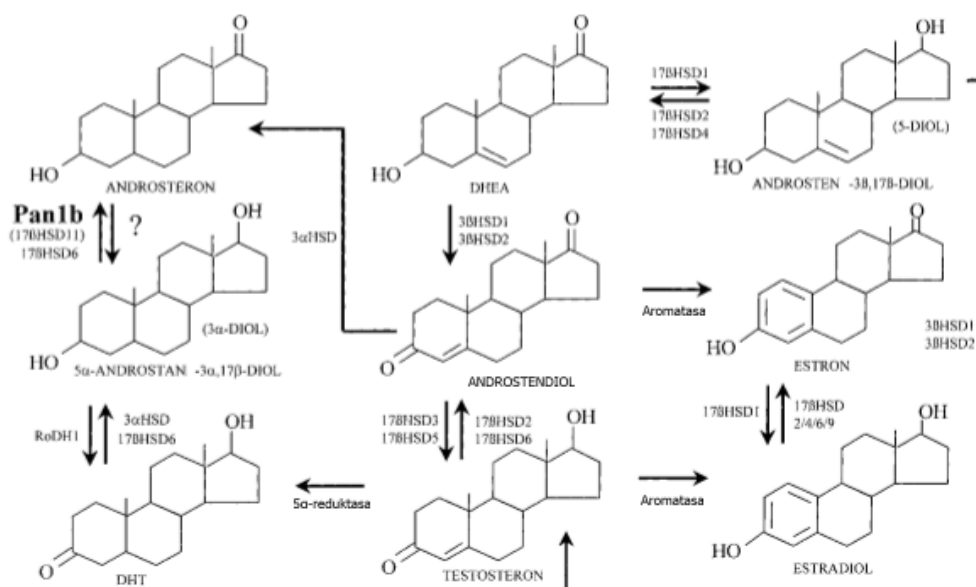
Katalytická aktivita

a) Eobiotické substráty

Všeobecně enzymy SDR16C mají *in vitro* schopnost metabolizovat substráty pomocí oxidace a redukce. První zmínky o DHRS8 (uvedený jako nový 17 β -HSD enzym) jsou v souvislosti s jeho slabou dehydrogenasovou aktivitou vůči β -estradiolu (Li et. al., 1998).

Dále byla potvrzena reakce, při které ovlivňuje DHRS8 konverzi 5 α -androstandiolu na androsteron (Chai et al., 2003).

Znázornění metabolismu androsteronu můžeme vidět na Obrázku 8. DHRS8 má prokázanou aktivitu v přeměně 5 α -androstan-3 α , 17 β -diolu na androsteron. Zpětná přeměna ale nebyla doposud prokázána (Brereton et al., 2001).



Obrázek 8: Metabolická aktivita DHRS8 (Brereton et al., 2001).

Enzym DHRS8 dále ovlivňuje jak hladinu steroidních hormonů tak retinoidů. Nedávná data potvrdila, že enzym se zapojuje spíše na úrovni metabolismu mastných kyselin než steroidů. Hladina látek je ovlivňována regulací přes PPAR (peroxisomal proliferator activated receptors) α -agonisty, který se vyskytuje převážně v jejunu (Motojima, 2004; Yokoi, 2007).

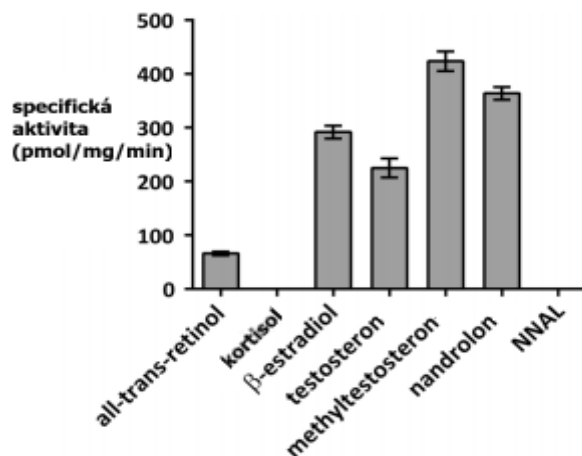
Na odhalení metabolické aktivity vůči steroidním látkám a retinoidům se spolupodílela i naše katedra (Obrázek 9). Pomocí metody HPLC byla rozšířena paleta substrátů o další dva členy. *All-trans*-retinol a testosteron. DHRS8 má na substráty β -estradiol a testosteron deaktivující efekt. Díky této schopnosti může DHRS8 ovlivňovat hormonální rovnováhu a zabránovat tak přebytku aktivní formy steroidních hormonů. Nejvyšší afinita DHRS8 byla popsána u β -estradiolu, 3α -diolu a testosteronu. 3α -diol se pravděpodobně považuje za hlavní substrát DHRS8 (Lundova et al., 2016).

Další aktivita enzymu byla zaznamenána u oxidační přeměny *all-trans*-retinolu na *all-trans*-retinal. Tato reakce byla poprvé popsána na naší katedře. Na rozdíl od ostatních substrátů, *all-trans*-retinal se metabolizací nedeaktivuje, ale snižuje se jeho účinnost. To poté může zasahovat do metabolismu důležité signální molekuly-retinové kyseliny (Lundova et al., 2016).

Jiná studie však katalytickou aktivitu DHRS8 na *all-trans*-retinolu nepotvrdila, ale byla pozorována inhibice metabolismu 3α -diolu v přítomnosti retinoidů (Brereton et al., 2001).

b) Xenobiotické substráty

Aktivita enzymu není však jen u eobiotických substrátů. DHRS8 metabolizuje i dva xenobiotické substráty. Jsou to anabolické steroidy, methyltestosteron a nandrolon (Lundova et al., 2016).



Obrázek 9: Vyobrazení katalytické aktivity DHRS8- oxidační reakce (upraveno dle Lundova et al., 2016). S β 9-Mi-DHRS8 byly inkubovány s testovanými substráty a výsledné produkty byly analyzovány za pomoci metody HPLC. Katalytická aktivita vůči methyltestosteronu a nandrolonu byla naměřena spektrofotometricky produkcí množství NADH. NNAL = 4-methylnitrosamino-1- (3-pyridyl)-1-butanol.

1) Nálezy DHRS8 v lidských tkáních

Znalost exprese DHRS8 na proteinové úrovni ve tkáních je známa pouze u některých typů tkání (např. u jater, plic a u tkání vytvářející steroidní hormony) (Li et al., 1998; Steckelbroeck et al., 1999; Chai et al., 2003; Keller et al., 2006).

Doposud provedené studie ukázaly taktéž výskyt DHRS8 u hepatocytárního karcinomu buněčné linie HepG2 a v prostatě postižené rakovinou (Rotinen et al., 2009; Gatzeva-topalova et al., 2011).

2.8 DHRS12

2.8.1 Nomenklatura, zařazení

Dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodiny) člen 12, taktéž známý jako SDR40C1, patří mezi doposud velmi málo prozkoumané lidské oxidoreduktasy (Persson et al., 2009).

2.8.2 Struktura, metabolická aktivita

Gen pro vznik této bílkoviny nese chromosom 13. Struktura enzymu obsahuje typické rysy pro SDR rodinu, metabolická aktivita není doposud známá (Internet 7).

2.8.3 Výsledky dosavadních studií

V odborných publikacích, můžeme najít zmínku o DHRS12, skrytou v souvislosti s nálezem neznámého enzymu v myelinu jednoho druhu ryby nadřádu Kostnatí. Ve studii byla identifikována homologická genová exprese savčího myelinu v CNS. Mezi detekovanými proteiny se našel i jeden necharakterizovaný, který nevykazoval strukturální homologii s žádnými ze známých myelinových proteinů (Morris et al., 2004).

Naopak, tento 36 kDa enzym sdílel strukturální znaky s dehydrogenasou z rodiny s krátkým řetězcem z 60 %. Necharakterizovaný protein s 36 kDa molekulovou hmotností byl nalezen pouze u jednoho druhu ryby, u dalších ne (Moll et al, 2003; Morris et al., 2004).

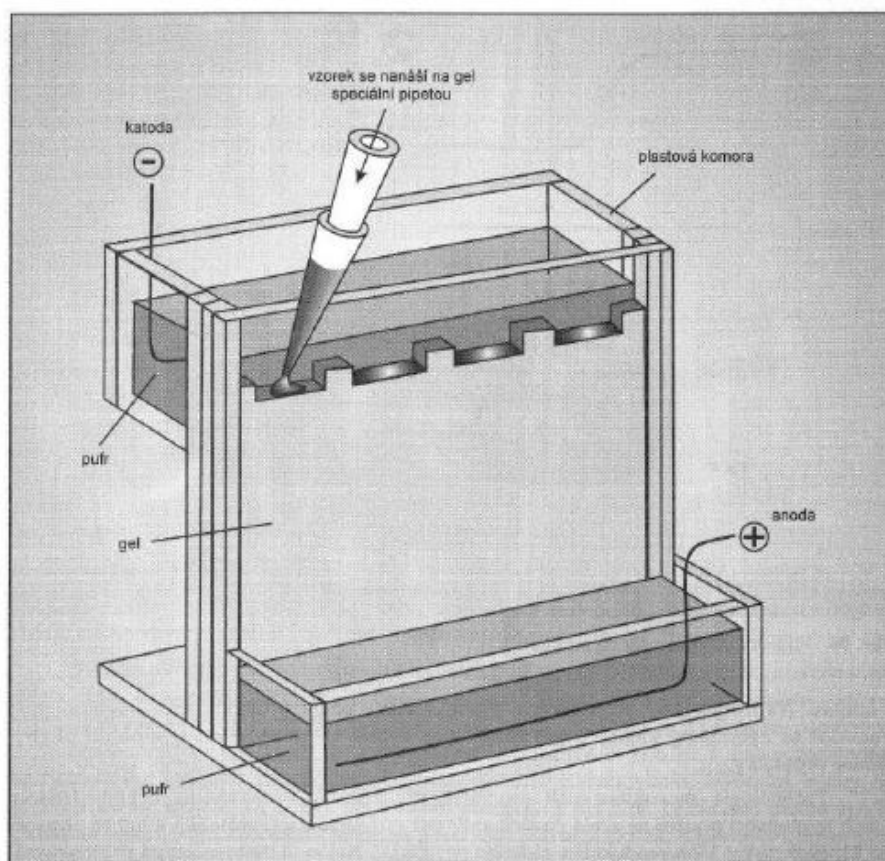
Metodou Northern blotting byla identifikovaná mRNA tohoto enzymu s expresí v mozkové tkáni. Konkrétní exprese je nalezena v oligodendrocytech a neuronech kůry mozkové u dospělého člověka (Moll et al, 2003; Morris et al., 2004).

3 Proteomika

Proteomika je obor, jehož náplní je globální identifikace proteinů v určité zdravé nebo nemocné buňce či tkáni a studium jejich funkce a interakce (Kovářová, 2005).

3.1 Western Blotting

Western blotting je metoda používaná k identifikaci polypeptidů prostřednictvím protilátek. Skládá se obvykle z polyakrylamidové gelové elektroforézy (Obrázek 10), která proteiny rozděljuje za pomoci elektrického pole. Protože protilátky nemohou být využity přímo ve struktuře gelu, nejdříve se zviditelní hledané proteiny protilátkami přenosem rozdělených proteinů na membránu, kde se znovu používá elektrické pole. Dále se imunochemicky navazují protilátky, které zachytí specifickou bílkovinu a následným navázáním detekčního systému se výskyt proteinu vyvolává na film (Šmarda et al., 2005).

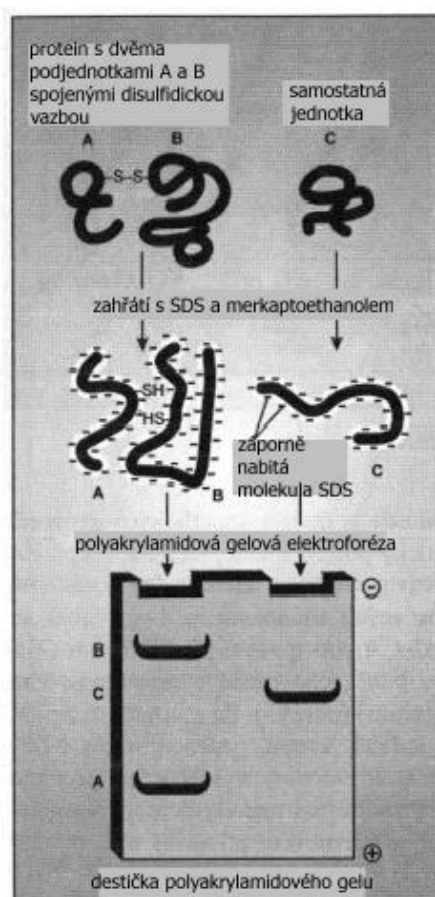


Obrázek 10: Elektroforetická aparatura (Šmarda et al., 2005).

3.2 SDS-PAGE

Důležitou roli v detekci proteinu hraje tvarová rozmanitost bílkovin (globulární bílkoviny se přesouvají rychleji než vláknité), hustota náboje (poměr náboje na molekulární hmotnost) a velikost (menší proteiny se pohybují rychleji než větší).

K odstranění těchto komplikací se používá SDS-PAGE. Před aplikací vzorků na polyakrylamidový gel se bílkoviny denaturují detergentem laurylsíranem sodným (SDS). Denaturace proteinu je znázorněná na Obrázku 11. Přítomné disulfidické vazby se odstraní působením redukčního činidla (β -merkптоethanolem). To zapříčiní rozpad komplexů, které jsou složeny z více proteinů. Posledním krokem je krátké převaření vzorků (Šmarda et al., 2005).



Obrázek 11: Princip použití laurylsíranu sodného (SDS) u metody SDS-PAGE (upraveno dle Šmarda et al., 2005).

Mechanismus účinku spočívá v obklopení negativně nabitého SDS kolem komplexu proteinů. Negativní náboje se navzájem odtahují a tím molekulu narovnají do tyčinkovitého tvaru. Také množství navázaného SDS je zhruba úměrné jeho molekulové hmotnosti. Tím testovaná bílkovina, bez ohledu na její velikost, dostane ekvivalentní hustotu náboje.

Přidané SDS nezasahuje do jediného klíčového faktoru, podle kterého se vzorky budou rozdělovat. A to je jejich molekulová hmotnost (Mahmood et al., 2012).

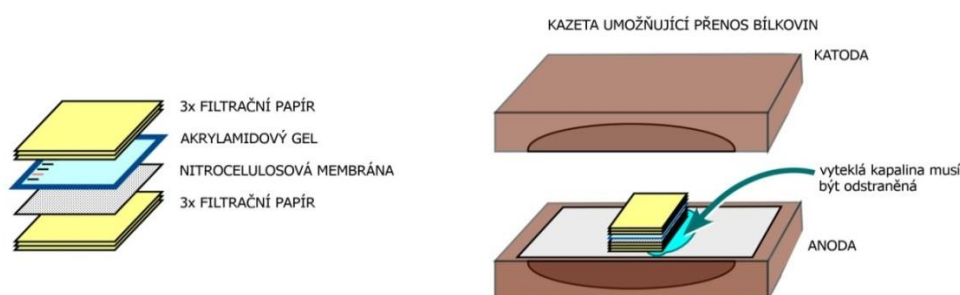
Nejčastější je deskové upořádání elektroforézy, která zapříčiní separaci bílkovin. Vzorky proteinů se nanosou do jamek gelu v alkalickém pufru. Tím proteiny získávají jednotný negativní náboj, a jakmile se zapojí do elektrického pole, tak se pohybují od katody k anodě. A právě podle molekulové hmotnosti se rozdělí.

Na to, aby byly detekovány specifické proteiny protilátkami, je důležité je dále přenést na nitrocelulosovou membránu (v postupu semi-dry přenos) nebo na PVDF membránu (v postupu wet přenos) (Šmarda et al, 2005).

- Semi-dry přenos

Po SDS-PAGE se separované proteiny přenesou z gelu na povrch tenké nitrocelulosevé membrány, kde jsou navázány a imobilizovány. Semi-dry blotting se provádí s deskovými elektrodami v horizontálním uspořádání, poskládáním gelu a membrány mezi filtrační papíry, které jsou nasáklé pufrý. Celá aparatura je sestavena na Obrázku 12. Tyto papíry fungují jako zásobníky iontů. Při elektroforetickém přenosu záporně nabitě molekuly migrují z gelu a pohybují se směrem ke kladné elektrodě, kde jsou zachyceny na membránu. Deskové elektrody, odděleny pouze od gelu a filtračních papírů, poskytují vysoko intenzivní pole (V/cm) na celém gelu, což umožňuje velmi efektivní a rychlý přenos (Internet 6).

Semi-dry oproti tradičnímu wet přenosu má několik výhod. Metoda má snadnou instalaci, minimální požadavky na rozpouštědla a vyšší výkon. Celá metoda je rychlejší (Internet 5).

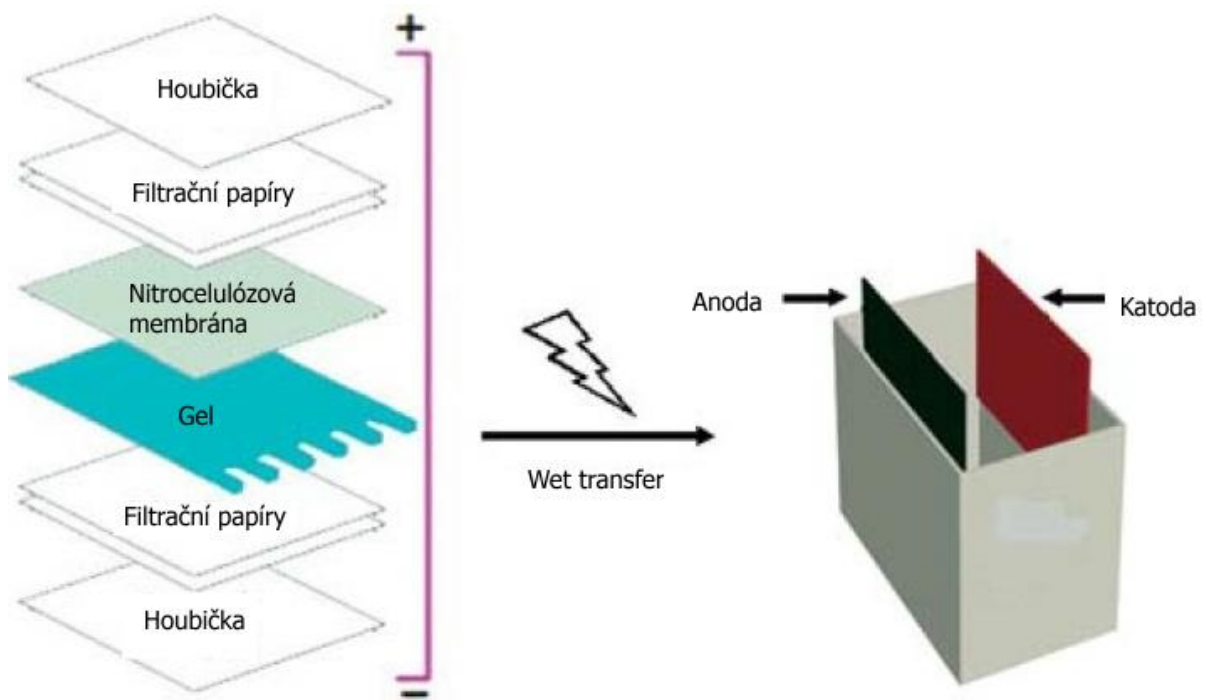


Obrázek 12: Sendvičové uspořádání u semi-dry přenosu (upraveno dle Internet 4)

- Wet přenos

Vlhké podmínky jsou obvykle spolehlivější, protože je méně pravděpodobné vysušení gelu a je vhodné pro větší proteiny.

Membrána je umístěna mezi povrchem gelu a kladnou elektrodou v sendviči. Sendvič obsahuje vláknitou podložku (houbičku) na každém konci a filtrační papíry na ochranu gelu a speciální odsávací membránu (Obrázek 13) (Mahmood et al., 2012).



Obrázek 13-Znázornění poskládaného sendviče při blottingu, wet metoda (upraveno dle Mahmood et al., 2012).

Po transportu bílkovin na membránu se aplikují protilátky, které specificky zachytí hledaný úsek. Následuje eliminace primární protilátky, která nebyla navázána. Dalším krokem je přidání sekundární protilátky, která je často konjugována s určitým enzymem (např. alkalickou fosfatase), která se ochotně navazuje na primární protilátku. Jako poslední část celku se naváže detekční roztok, který vykazuje chemiluminiscenci. Ta se dále vyvolává na fotofilm v temné komoře (Šmarda et al, 2005).

Tloušťka pruhu na fotofilmu odpovídá množství přítomného proteinu. Výsledek se porovnává se standardem, u kterého přesně víme dané množství (Mahmood et al., 2012).

C. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo stanovení exprese proteinů DHRS8 a DHRS12 ve vzorcích lidských tkání (16 typů tkání ze 4 objektů mužského pohlaví) s využitím metody Western blotting a imunodetekce. Nově získané informace o výskytu těchto bílkovin porovnat s doposud publikovanými pracemi v odborných člancích z ostatních vědeckých pracovišť. Práce byla rozdělena do následujících kroků:

- 1) Stanovení exprese enzymu DHRS8
 - Optimalizace ředění protilátky proti DHRS8
 - Vlastní stanovení exprese tohoto enzymu ve vzorcích z lidských tkání
- 2) Stanovení exprese enzymu DHRS12
 - Optimalizace ředění protilátky proti DHRS12
 - Vlastní stanovení exprese tohoto enzymu ve vzorcích z lidských tkání
- 3) Porovnání výsledků se dříve známými poznatky

D. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 Materiál

4.1 Pomůcky a přístroje

<i>Pomůcky</i>	<i>Výrobce</i>
Hypercassette™	Amersham Biosciences
Automatické pipety a špičky (0,5 µl-5 ml)	Biohit
Mikrozkumavky	Eppendorf
Skla používané u elektroforézy	Bio-Rad
Nitrocelulózová membrána (0,045 µm)	Bio-Rad
Polyvinyliden difluoridová membrána (PVDF)	Bio-Rad
CL-XPosure Film	Thermo Scientific

Laboratorní sklo: kádinky, odměrné válce

<i>Přístroj</i>	<i>Model</i>	<i>Výrobce</i>
Centrifuga	miniSpin plus	Eppendorf
Hlubokomrazící box	Herafreeze	Heraeus
Magnetická míchačka	Color squid	IKA
pH metr	Orion 410A	Thermo
Analytické váhy	Scaltec SBC22	Sartorius

Kývačka	UNIMAX 1010	Heidoph
Thermomixer	Compact	Eppendorf
Vortex	MS 3 basic	IKA
Stroj na výrobu ledové tříště	AF 80	Scotsman
Ultradestilační přístroj	Milli-Q	Millipore
Předvážky	PT310	Sartorius
Vertikální elektroforéza	Mini PROTEAN [®] Tetra System	Bio-Rad
Western blotting	Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer System	Bio-Rad
Zdroj pro elektroforézu	PowerPac Universal	Bio-Rad
Spektrofotometr	Tecan Infinite M200	Tecan

4.2 Chemikálie

<i>Název chemikálie</i>	<i>Výrobce</i>
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
Akrylamid, elektroforéza	Sigma-Aldrich
Blotting Grade Blocker Not-fat Milk	Bio-Rad
Chlorid draselný, p.a.	Penta

Chlorid sodný, p.a.	Penta
Commassie Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich
Dodecylgydrogensulfát sodný (SDS), 90%	Merck
Glycin, elektroforéza $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan didraselný bezvodý, p.a.	Penta
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a.	Penta
Isobutanol, p.a.	Penta
Methanol, p.a.	Penta
Močovina, p.a.	Penta
<i>N,N'</i> -Methylen (bisakrylamid), f.e. $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Octová kyselina, 99%, p.a.	Penta
Persíran amonný, elektroforéza, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
TEMED, elektroforéza, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.	Penta
TWEEN [®] 20, for molecular biology	Sigma-Aldrich
Univerzální rychloustalovač, FOMAFIX	Foma Bohemia

4.3 Zásobní roztoky:

➤ **30% Akrylamid (AA) + 0,8% Bisakrylamid (bis-AA)**

Akrylamid	30 g
Bisakrylamid	0,8 g
Destilovaná voda	doplnit na 100 ml

➤ **1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8**

Tris	18,5 g
Destilovaná voda	doplnit na 100 ml
pH upravit konc. HCl na hodnotu pH 8,8	

➤ **0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8**

Tris	6 g
Destilovaná voda	doplnit na 100 ml
pH upravit konc. HCl na hodnotu pH 6,8	

➤ **10% SDS**

SDS	10 g
Destilovaná voda	doplnit na 100 ml

➤ **10% Persíran amonný (APS)**

Persíran amonný	20 mg
Destilovaná voda	200 µl

➤ **Isobutanol nasycený vodou**

Smíchání isobutanolu s destilovanou vodou	libovolné množství
V horní vrstvě je nasycený isobutanol	

➤ **0,5% Bromfenolová modř**

Bromfenolová modř	5 mg
Destilovaná voda	doplnit na 10 ml

➤ **5x koncentrovaný elektrodový pufr, pH 8,3**

Glycin	72 g
Tris	15 g
SDS	5 g
Destilovaná voda	doplnit na 1000 ml
pH upravit konc. HCl	

➤ **Elektrodový pufr**

5x koncentrovaný elektrodový pufr	200 ml
Destilovaná voda	800 ml

➤ **Roztok na obarvení nitrocelulóзовé membrány, -0,1%Ponceau S v 5% kyselině octové**

Ponceau S	0,1 g
5% kyselina octová	doplnit na 100 ml

➤ **Zásobní vzorkový pufr**

SDS	1 g
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5,0 ml
Glycerol 85%	3,4 ml
0,5% Bromfenolová modř	0,4 ml
Destilovaná voda	1,2 ml

➤ **10% kyselina octová**

99% kyselina octová	50,5 ml
Destilovaná voda	449,5 ml

➤ **Vzorkový pufr s 2-merkaptoethanolem**

50 µl 2- merkaptoethanolu na 1 ml zásobního vzorkového pufru (1:20)

➤ **PBS pufr**

137 mM NaCl	80 g
2,7 mM KCl	2 g
10 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	35,8 g
2 mM KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilovaná voda	doplnit na 1000 ml

➤ **0,1 M Tris pufr, pH 8,0**

Tris	12,11 g
Redestilovaná voda	800 ml
Upravit pH na 8,0 pomocí 4 M HCl	
Redestilovaná voda	doplnit na 1000 ml
Uchovávat v lednici	

➤ **10x zředěný TBS**

Tris Base	24,2 g
NaCl	80 g
Destilovaná voda	700 ml
1 M HCl	38 ml
Upravit pH na 7,6	
Destilovaná voda	doplnit na 1000 ml

➤ **TBS-T pufr**

Destilovaná voda	450 ml
10x zředěný TBS	50 ml
Tween 20	250 µl
Uchovávat v lednici	

➤ **Blotovací pufr**

Jednopufrový systém

25 mM Tris	3,03 g
192 mM Glycin	14,4 g
20% MeOH	200 ml (100%)
Destilovaná voda	doplnit na 1000 ml
pH 8,3 (neupravuje se)	

Třípufrový systém

Anodový pufr I

300 mM Tris	3,642 g
20% MeOH	20 ml (100%)
Destilovaná voda	doplnit na 100 ml
pH 10,4 (neupravuje se)	

Anodový pufr II

25 mM Tris	1,5 g
20% MeOH	100 ml
Destilovaná voda	doplnit na 500 ml
pH 10,4 (neupravuje se)	

Katodový pufr

25 mM Tris	0,303 g
0,04 M 6-aminokaproová kyselina	0,525 g
20% MeOH	20 ml (100%)
Destilovaná voda	doplnit na 100 ml
pH 9,4 (neupravuje se)	

➤ **10% kyselina octová**

Kyselina octová	10,1 ml
Destilovaná voda	na 100 ml

➤ **Promývací pufr PBS-T**

PBS	100 ml
Tween 20	1 ml
Destilovaná voda	doplnit na 1000 ml

➤ **Blokovací pufr**

5% mléko v PBS-T

Sušené odtučněné mléko	5 g
PBS-T	doplnit na 100 ml

5% mléko v TBS-T

Sušené odtučněné mléko	5 g
TBS-T	doplnit na 100 ml

➤ **3% roztok sušeného mléka v PBS-T**

Sušené odtučněné mléko	3 g
PBS-T	doplnit na 100 ml

➤ **3% roztok sušeného mléka v TBS-T**

Sušené odtučněné mléko	3 g
TBS-T	doplnit na 100 ml

➤ **3% roztok hovězího sérového albuminu**

BSA	3 g
TBS-T	doplnit na 100 ml

➤ **Vývojka (požadované ředění 1:10)**

Vývojka FOMADON LQN	8 ml
Destilovaná voda	72 ml

➤ **Ustalovač (požadované ředění 1:5)**

Univerzální rychloustalovač	17 ml
Destilovaná voda	85 ml

Poté byly přesunuty opět do vody, okapány a pověšeny ve svislé poloze na vzduchu.

➤ **Stripovací pufr**

0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	25 ml
10% SDS	40 ml
B-merkaptoethanol	1,6 ml
Destilovaná voda	135 ml

4.4 Standard molekulových hmotností

<i>Název</i>	<i>Výrobce</i>
Precision Plus Protein TM Standards, All Blue	Bio-Rad

4.5 Kity

<i>Název</i>	<i>Výrobce</i>
ECL Prime Western blotting detekční reagent	GE Healthcare Life
BCA kit	Sigma-Aldrich

4.6 Protilátky

<i>Název</i>	<i>Výrobce</i>
Králíčí protilátka proti DHRS8 (ab103087)	Abcam, UK
Králíčí protilátka proti DHRS8 (ab113490)	Abcam, UK
Králíčí protilátka proti DHRS12	Abcam, UK

(ab177968)

HRP-kojugovaná prasečí protilátka proti králičí protilátce (P0217) Dako, Denmark

Myší protilátka proti β -aktinu (ab8226) Abcam, UK

4.7 Vzorky

Pro imunochemické stanovení enzymů DHRS8 a DHRS12 v lidských tkáních bylo použito 16 vzorků lidských tkání z 5 objektů mužského pohlaví ve středním věku. Příčina úmrtí byla náhlá smrt bez zjevného onemocnění, které by mělo na smrt dopad. Vzorky byly získány z Ústavu soudního lékařství, Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, za schválení etické komise. Po separaci vzorků byly uschovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v hlubokomrazícím boxu. Tyto vzorky byly zpracované Mgr. Terezou Lundovou na Katedře biochemických věd, Faf UK, jak bylo popsáno dříve (Lundová et al., 2016).

Rekombinantní forma DHRS8 a DHRS12 byla získána stejným postupem jako již dříve zkoumaný enzym DHRS7 (Štambergová et al., 2013). Lidská cDNA kódující enzymy DHRS8 a DHRS12 byla získána z genové knihovny Structural Genomics Consortium (SGC) (Štambergová et al., 2013).

Insert byl zaklonován do plazmidu pFB-CT10HF-LIC a použit pro přenesení do bakmidu v DH10Bac buňkách. DNA izolovaná z bakmidu byla transfekována do hmyzích *Sf9* buněk. Expres rekombinantních lidských DHRS8 a DHRS12 byla provedena v suspenzi buněk *Sf9*, které byly infikovány rekombinantním virem a inkubovány při $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 65 hodin (Skarka et al., 2014).

Buňky *Sf9* byly zpracovány centrifugací při $3000\times g$ po dobu 10 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelety byly omyty v polovičním objemu buněčné kultury 0,1 M draselno-fosfátovým pufrém (pH 7,5) a znovu stočeny stejným způsobem jako předtím. Pelety byly dále promyty v lyzačním pufru (0,1 M draselno-fosfátového pufr; 50 mM KCl; 250 mM sacharóza; 1,1 mM EDTA (pH 8,00); 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT; 0,5 mM AEBSF; 1:1000 koktejl inhibitorů proteas) při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelety byly rozděleny 1/50 lyzačního pufru a sonikovány 25 sekund při pulzech 49 W. Homogenní vzorky byly centrifugovány při $12\ 000\times g$ po dobu 20 minut a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na supernatanty byla použita ultracentrifuga 1 hodinu při $185\ 000\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelety byly

resuspendovány v resuspendačním pufru (0,1 M draselno-fosfátový pufr; 1,1 mM EDTA; 50 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM AEBSF; 0,5 mM PMSF; 20% glycerol) (Štambergová, 2013; Skarka et al., 2014).

Takto byly připravené kontrolní vzorky *Sf9*-Mi-DHRS8, 12 (*Sf9*-obsahující nadexprimovaný enzym DHRS8 a DHRS12).

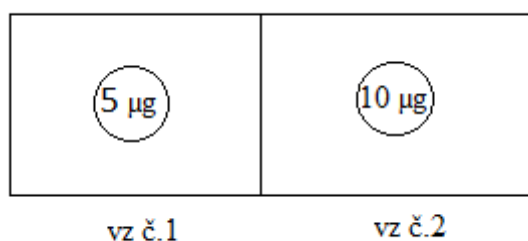
5 Metodika

5.1 Dot blot

K optimalizaci koncentrace používaných protilátek byla využita rychlá metoda Dot blot. Jako nosič pro vzorky proteinů byla použita nitrocelulósová membrána. Na nitrocelulósovou membránu byly aplikovány vzorky pipetou. Rozměr obdélníků byl cca 1,5 x 2,5 cm.

Primární protilátka byla připravena v koncentracích 1: 1000, 1: 2000, 1: 4000, 1: 8000 rozpuštěním v 3% sušeném mléce v PBS-T pufru.

Na membránu o velikosti 1,5 x 2,5 byly napipetovány vzorky (*Sf9* obsahující nadexprimovaný enzym DHRS8) o koncentraci proteinu 5 a 10 μg (Obrázek 14) a ponechány, aby patřičně zaschly.



Obrázek 14: Náčrt nitrocelulósové membrány se znázorněnými vzorky pro dot blot

Membrána byla vložena do nádoby s 3% blokovacím mlékem a zanechána 1,5 h na kývačce. Po uplynutí této doby bylo blokovací mléko zaměněno za králičí primární protilátku v různých koncentracích a ponecháno inkubovat přes noc za chladu na rotátoru. Další den byla primární protilátka slita a membrána byla třikrát krátce a třikrát a po 10 minutách opláchnuta v PBS-T (případně TBS-T pufru).

Dále byla použita sekundární prasečí protilátka (P0217) proti králičí primární

protilátce v ředění 1:20 000. Nádoby s membránou a protilátkou byly na míchačce ponechány 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly 3x krátce a 3x po 10 minutách opět promývány v PBS-T (TBS-T) pufru na kývačce.

5.2 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Jelikož jsme ve vzorcích měli nadměrné množství různých typů bílkovin, byla využita metoda SDS-PAGE, pomocí které byly proteiny separovány podle molekulových hmotností (Alberts et al., 2008).

5.2.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Pro přípravu polyakrylamidového gelu bylo použito sklo se spacery o hloubce 0,75 mm a tenké krycí sklo. Pro přesnost výsledků byla skla důkladně umyta jarem, destilovanou vodou, lihomethanolem pro rychlejší usušení a položena do vertikální polohy. Po oschnutí byla skla přiložena k sobě a spojena sponami. Zadní strana skel byla přetažena parafilmem a nakonec upevněna do nalévacího rámečku.

V dalším kroku byl namíchán separační gel a přidané APS iniciovalo reakci. Po iniciaci byl ihned přidán TEMED. Roztok byl dostatečně promíchán a pomocí pipety nanesen mezi skla. Takto vytvořený gel byl převrstven isobutanolem, který zabraňuje vysychání gelu a ponechán polymerovat minimálně 45 min.

Po uplynutí této doby byl isobutanol slit a propláchnut destilovanou vodou.

Po ztuhnutí separačního gelu byl nanesen gel zaostřovací. Výsledný gel byl tedy složen z 12,5% separačního a 4% koncentračního gelu (Tabulka 1). Na závěr byl mezi skla vsunut plastový hřeben, který sloužil k vytvoření jamek pro aplikaci vzorků. Separační gel polymeroval více než 90 minut, popř. přes noc při 4 °C.

Tabulka 1: Příprava polyakrylamidového gelu
Separáčn  gel 12,5%

1 gel

Destilovaná voda 3,2 ml

1,5 M Tris-HCl; pH 8,8 2,5 ml

10% SDS 100 μ l

30% AA+0,8% bis-AA 4,2 ml

Iniciace polymerace:

10% APS 100 μ l

TEMED 5 μ l

2 gely

Destilovaná voda 6,4 ml

1,5 M Tris-HCl; pH 8,8 5,0 ml

10% SDS 200 μ l

30% AA+ 0,8% bis-AA 8,4 ml

10% APS 200 μ l

TEMED 10 μ l

Koncentrační gel 4%

1 gel

Destilovaná voda 3,125 ml

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,25 ml

10% SDS 50 μ l

30% AA +0,8% bis-AA 500 μ l

Iniciace polymerace:

10% APS 100 μ l

TEMED 5 μ l

2 gely

Destilovaná voda 6,25 ml

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 6,25 ml

10% SDS 100 μ l

30% AA + 0,8% bis-AA 1 ml

10% APS 200 μ l

TEMED 10 μ l

5.2.2 Příprava vzorků pro elektroforézu

Nejprve byl zapnut termoblok, aby se předeřřal na požadovaných 95 °C. Meztím byly smířhány vzorky stanovovaného proteinu se vzorkovým puřrem obsahujícím

merkptoethanol (Tabulka 2) v poměru 1:4. Takto připravené vzorky byly vloženy do termobloku a vystaveny teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Vlivem zvýšené teploty byla část roztoku odpařena, a proto bylo nutné tyto orosené vzorky krátce stočit v centrifuze (13 000xg, 45 sekund).

Tabulka 2: Příprava vzorkového pufru obsahujícího 2- merkptoethanol.

<i>Komponenta</i>	<i>Množství</i>
Vzorkový pufr	75 µl
2- merkptoethanol	25 µl

5.2.3 Příprava kontrolního (porovnávacího) vzorku

Kontrolní vzorek (rekombinantní forma enzymů DHRS8, 12) byl vytvořen smícháním zásobního roztoku kontroly, poté přidáním vody a nakonec pufru (Tabulka 3). Poté byl napipetován společně se zkoušejícími vzorky.

Tabulka 3: Příprava kontrolního roztoku k porovnání zkoušených vzorků.

<i>Komponenta</i>	<i>Množství</i>
Zásobní roztok kontroly	0,6 µl
Destilovaná voda	9,4 µl
Vzorkový pufr	2,5 µl

5.2.4 SDS elektroforéza

Z hotového gelu byl opatrně vyjmut plastový hřeben, který vytvořil jamky pro vzorky. Následně byly skla s gely upevněny do elektroforetického stojanu a zajištěny sponami. Vzniklá mezera mezi skly byla vyplněna elektrodoým pufrem a celý systém položen do vany určené pro elektroforézu. Elektroforetická vana byla nakonec vložena ještě do větší nádoby s ledem za účelem chlazení celého systému.

Všechny testované vzorky byly společně s kontrolním roztokem napipetovány do jamek. Stojan byl doplněn až po okraj 1x koncentrovaným elektrodoým pufrem. Celý systém byl zapojen ke zdroji stejnosměrného napětí. Prvních 15 minut byly gely vystaveny napětí 100 V. Poté bylo napětí zvýšeno na 160 V do doby, než startovní čelo se vzorky doběhlo až na konec gelu. Následně byl zdroj napětí vypnut a skla byla rozevřena pomocí klínku. Polyakrylamidové gely byly vyjmuty. Posledním krokem bylo odstranění koncentračního gelu a odříznutí spacerů.

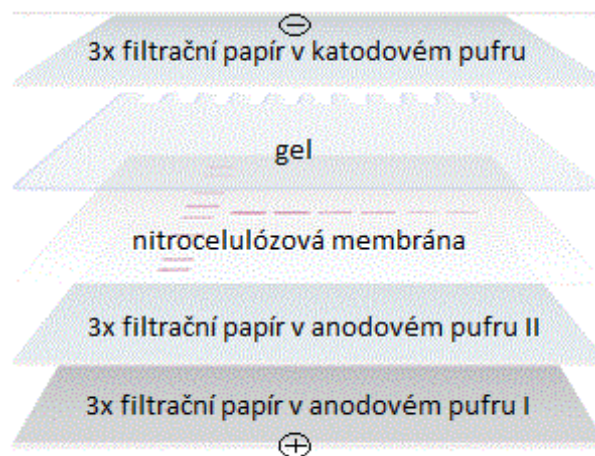
5.3 Western blotting (WB)

Upravené gely (vyjmuté ze skel, oříznuté a zbavené koncentračních gelů) byly vloženy do předem připravených nádob s blotovacím anodovým pufrem II. V těchto nádobách byly ponechány 10-15 minut. Do anodového pufru byla vložena také nitrocelulózová membrána.

Principem western blotingu v první fázi je transport proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulózovou membránu. Toho se docílí uspořádáním filtračních papírů do tzv. sendvičového systému. Pro přenos byl využit jak semi-dry přenos (Obrázek 15) tak později i wet přenos popsaný níže (Obrázek 16).

5.3.1 Semi-dry přenos

Sendvičový systém se skládá z pěti vrstev (Obrázku 15). Pro dosažení dostatečné tloušťky každé vrstvy, byly na každý druh pufru použity vždy tři filtrační papíry přibližně stejně velké jako okrojené gely. Jednotlivé vrstvy byly postupně přeneseny pomocí pinzety do kazety blotovacího přístroje.



Obrázek 15: Metoda SEMI-DRY přenos-Sestavený sendvič pro transport proteinů z gelu na membránu (upraveno dle Internet 3).

Po položení všech částí komplexu, byla kazeta uzavřena a pro transport proteinů použito konstantní napětí 10 V po dobu 30 min. Po uplynutí této doby bylo nastavení napětí změněno na 25 V.

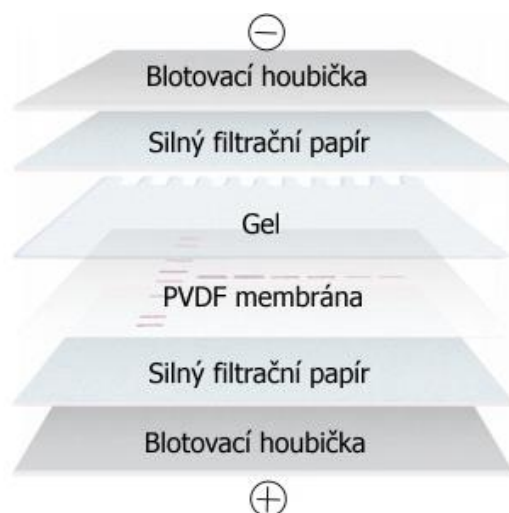
5.3.2 Wet přenos

V prvním kroku byla PVDF (polyvinyliden difluoridová) membrána aktivována namočením do methanolu (MeOH) (5 minut).

Gel se separovanými proteiny byl vložen do blotovacího pufu.

Z MeOH do blotovacího pufu byla přenesena i PVDF membrána. Do další krabičky s blotovacím pufrem byl ponořen tlustý filtrační papír (2 ks pro jeden gel) a blotovací houbičky. Vše bylo ponecháno v blotovacím pufu cca 10 minut.

Dále bylo poskládáno z jednotlivých částí sendvičové uspořádání (Obrázek 16).



Obrázek 16: Metoda WET přenos-Sestavený sendvič pro transport proteinů z gelu na membránu (upraveno dle Internet 3).

Hotový blotovací sendvič byl uzavřen a vsunut do blotovacího nástavce. Blotovací nástavec byl vložen do elektroforetické blotovací vany s elektrodovým pufrem, aby nedocházelo k přílišnému zahřívání. Nakonec bylo připojeno víko s kabely ke zdroji a spuštěn konstantní proud 80 mA po dobu 19 hodin (přes noc).

Po doběhnutí blotingu byla membrána pomocí pinzety opatrně vyjmuta.

Jako kontrolu přenosu proteinů z gelu na membránu bylo využito barvení pomocí Ponceau S.

5.4 Kontrola přenosu proteinů (barvení membrány pomocí Ponceau S)

Úspěšnost přenosu proteinů z gelu na membránu byla ověřena obarvením membrány pomocí barviva Ponceau S (0,1%). Ještě před samotným zbarvením je důležité si zvýraznit (např. tužkou) kontrolní marker. Po odbarvení není totiž viditelný.

Nitrocelulósová membrána (nebo PVDF) byla minimálně na 1 minutu vystavena reakci s roztokem, úspěšnost přenosu proteinů byla vizuálně zkontrolována a membrána byla poté opět odbarvena pomocí 10% kyseliny octové a opláchnuta pomocí PBS-T.

5.5 Blokace membrány

Blokace membrány byla uskutečněna pomocí 5% blokovacího pufru ze sušeného mléka. Tento proces probíhal přibližně 1,5 hodiny za mírného míchání. Blokovací pufr byl

následně slit a membrána byla dvakrát opláchnuta PBS-T pufrem.

5.6 Příprava a aplikace protilátek

Po separaci proteinů, následnému přenosu z gelu na membránu, byla využita metoda imunodetekce za použití specifických protilátek proti testovaným enzymům.

5.6.1 Příprava protilátek

Králičí primární protilátka proti DHRS8 (ab113490) v 3% mléku

Roztok primární protilátky byl vytvořen z 3% roztoku sušeného mléka v PBS-T pufru. Koncentrace protilátky byla zvolena nejprve dle návodu výrobce 1:1000. Poté bylo ředění upravováno.

Králičí primární protilátka proti DHRS8 (ab113490, ab 103087) v 3% BSA

Dále byla vyzkoušena změna prostředí pro protilátky. Prostředí bylo tvořeno z 3% roztoku hovězího sérového albuminu v TBS-T pufru. Počáteční koncentrace protilátky byla zvolena dle návodu výrobce 1:1000 a poté bylo ředění upravováno.

Myší primární protilátka proti β -aktinu v 3% BSA

Pro kontrolu stability vzorků byla zvolena primární protilátka proti β -aktinu v prostředí 3% roztoku hovězího sérového albuminu v TBS-T pufru. Počáteční koncentraci protilátky jsme zvolili dle návodu výrobce 1:10 000.

Prasečí sekundární protilátka proti králičím protilátkám v 3% mléce

Roztok sekundární protilátky, který detekoval primární králičí protilátku, byl složen z 3% sušeného mléka v PBS-T (případně TBS-T pufru). Počáteční koncentrace protilátky byla zvolena dle návodu výrobce 1:20 000.

Prasečí sekundární protilátka proti králičím protilátkám v 3% BSA

Jako u primárních protilátek, taktéž u sekundárních protilátek, byla zkoušena změna prostředí. Z 3% sušeného mléka byl přechod na 3% roztok hovězí sérový albumin v PBS-T (případně TBS-T) pufru. Koncentrace byla zvolena dle návodu výrobce 1:20 000.

Králičí sekundární protilátka proti myší primární protilátce β -aktinu v 3 % BSA

Roztok sekundární protilátky proti β -aktinu, obsaženém v myší primární protilátce, byl složen z 3% hovězího sérového albuminu v prostředí TBS-T pufru. Koncentrace protilátky

byla zvolena dle návodu výrobce 1:20 000.

5.6.2 Nanášení protilátek

Takto připravené primární protilátky byly nality do menších nádob společně s vloženou membránou, uzavřeny a položeny na kývačku. Na kývačce byly přes noc inkubovány za chladu.

Další den byla primární protilátka slita, membrána byla krátce 3x propláchnuta v PBS-T (případně TBS-T) pufru a poté 3x po 10 minutách taktéž v tomto pufru. Optimální množství pufru zaujímal 4 ml/cm² membrány. V dalším kroku byly aplikovány roztoky sekundárních protilátek.

Připravený roztok sekundární protilátky byl nalit na membránu a dle výrobce byl ponechán 1,5 hodiny na kývačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok sekundární protilátky slit do nádobky a uložen do mrazáku. Tento roztok bylo možné využít až 3x. Jako u primární protilátky, tak i u sekundární byla membrána 3x krátce propláchnuta PBS-T (TBS-T) pufrům a dále 3x po 10 minutách znovu PBS-T (TBS-T).

5.7 Vizualizace a vyhodnocení

K vizualizaci byl využit detekční systém (Amersham ECL Prime Western Blotting), který je kompatibilní ke zvolené sekundární protilátce. Jelikož je závěrečná reakce citlivá na světlo, byl celý proces uskutečněn v temné komoře. Detekční systém byl složen z roztoku A a B v poměru 1:1, dle návodu výrobce kitu. Objem detekčního systému byl takový, aby cca 0,05 ml tohoto roztoku bylo nanášeno na 1 cm² membrány.

➤ *Detekční roztok*

Detekční roztok I	1 ml
Detekční roztok II	1 ml

Co nejrychleji byl tento roztok rozprostřen po celé membráně tak, aby se membrána zbytečně nevysoušela. Po cca 5 min expozice byla membrána pomocí pinzety jemně vložena mezi potravinářskou fólii. Na fólii s membránou, byl položen film o velikosti membrány a ponechán exponovat od 1 minuty až po 1,5 hodiny.

Film byl vyvolán tím, že byl přenesen do nádobky s vývojkou (ředěna vodou 1:10), kde byl za jemného kroužení ponechán až do zobrazení proužků patřícím kontrolám.

Dále byl film přenesen do vody, kde byl rychle opláchnut a přenesen do nádobky s ustalovačem (ředěn vodou dle návodu výrobce 1:5).

Film byl následně opět opláchnut ve vodě a usušen na vzduchu.

5.8 Měření koncentrace proteinu metodou BCA

Stanovení celkové koncentrace proteinů ve vzorcích bylo uskutečněno metodou BCA (reagent je kyselina bicinchoninová) pomocí komerčně dostupného kitu (postup stanovení dle doporučení výrobce). Množství proteinu bylo měřeno spektrofotometrem při vlnové délce 592 nm. Standardem pro vytyčení kalibrační křivky byl BSA (100-1000 µg/ml) (Štambergová, 2013).

5.9 Stripování, znovupoužití membrány

U některých membrán byla provedena opakovaná imunodetekce s využitím jiných primárních protilátek. Pro tyto účely musí být membrána nejdříve zbavena původně navázaných protilátek. Po chemiluminiscenční reakci je potřeba membránu pečlivě zabalit do potravinářské fólie a dát do lednice (takto upravená vydrží i několik týdnů).

Membrána byla opláchnuta ve 30 ml stripovacím pufru po dobu 30 min při 50 °C.

Membrána byla dále 3x opláchnuta TBS-T puftrem po 15 minutách. Po propláchnutí byla membrána uložena na 1,5 hodiny do 5% blokovacího mléka. Následně byla aplikována primární a sekundární protilátka. Dále se postupuje klasicky až do vyvolání na film.

E. VÝSLEDKY

Expresce proteinu DHRS8 ve vzorcích lidských tkání (4 lidé, 16 druhů tkání, mužského pohlaví) byla zaznamenána metodou Western blotting a následnou imunodetekcí. Před samotným stanovením enzymu byla provedena optimalizace podmínek pro pokus- ředění primární protilátky, změna metody přenosu proteinu, změna prostředí pro protilátku a jako poslední změna samotné primární protilátky. Expresce byla potvrzena u jaterní tkáně, nadledvin, plicích, ledvinách, varlatech, tenkém a tlustém střevě.

Jelikož je enzym DHRS8 zmiňován častěji v dřívějších publikacích s pozitivním nálezem v lidských tkáních, byl pro naše účely k potvrzení nebo vyvrácení výskytu ideální. Výzkum byl proto zaměřen více na optimalizaci podmínek pro enzym DHRS8 než DHRS12, o kterém v publikacích není téměř žádná zmínka.

Enzym DHRS12 byl testován také, ale v menší míře. Expresce proteinu v testovaných lidských tkáních u DHRS12 prokázána nebyla.

6 DHRS8

6.1 Optimalizace detekce proteinu DHRS8

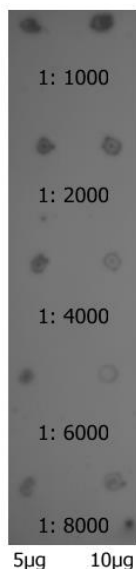
Často se stává, že při aplikaci protilátek je doporučeno ředění zbytečně malé. Proto byla nejprve provedena optimalizace ředění primární králičí protilátky proti DHRS8.

6.1.1 Optimalizace ředění králičí protilátky proti DHRS8

Optimalizace byla uskutečněna pomocí Dot blot metody (viz kapitola 5.1). Jako vzorky byly použity *Sf9*-Mi-DHRS8 (*Sf9* mikrosomy obsahující nadměrně exprimovaný DHRS8). Vzorky byly nanášeny ve dvou koncentracích (5 a 10 µg bílkoviny na spot) na nitrocelulosovou membránu pro všechna ředění. Pro zkoušku citlivosti primární protilátky proti DHRS8 (ab 113490) bylo zvoleno ředění 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000. Jako sekundární protilátka byla použita prasečí protilátka proti králičí s ředěním 1:20 000 ve 3% mléce. Ředění bylo zvoleno na základě dlouhodobých zkušeností s touto protilátkou na našem pracovišti.

Vzhledem k tomu, že použitá sekundární protilátka je konjugována s křenovou peroxidasou, byl pro detekci zvolen Amersham ECL Prime Western Blotting detekční systém.

Tento reakční systém se skládá z roztoku A (roztok luminolu) a roztoku B (roztok peroxidu). Smícháno v poměru 1:1. Vzniklá chemiluminiscence byla zachycena na fotopapír. Výsledek je na Obrázek 17.

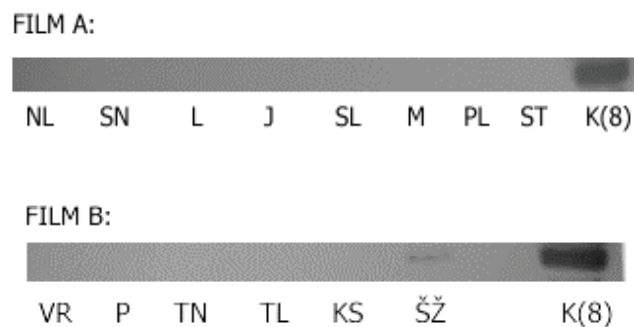


Obrázek 17: Optimalizace koncentrace primární králičí protilátky (ab 113490) pomocí metody Dot blot. Byly použity 2 různé koncentrace *Sf9*-Mi-DHRS8 (5 a 10 µg) a primární králičí protilátka proti DHRS8 v ředění 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000 v 3% mléce, doba inkubace přes noc. Sekundární prasečí protilátka proti králičím protilátkám v ředění 1: 20 000 v 3% mléce, doba inkubace 1,5 hodiny. Expozice 5 min.

Na Obrázku 17 je zřejmé, že při ředění 1: 1000 primární králičí protilátkou je DHRS8 detekována dostatečně. U většího ředění 1: 2000 už je detekce slabší, proto bylo zvoleno raději ředění 1:1000, které je doporučeno i výrobcem.

6.1.2 Zkouška zvoleného ředění protilátky na reálných vzorcích

Jako testovací vzorek byl k dispozici homogenát z lidských tkání. Množství proteinu z každého typu tkáně bylo 40 µg bílkovin. Bílkoviny byly separovány pomocí SDS elektroforézy. Na nitrocelulosovou membránu přeneseny semi-dry přenosem (viz kap 5.3.1). Jako primární protilátka byla použita králičí protilátka proti DHRS8 (ab 113490) v ředění 1: 1000 ve 3% mléce. Sekundární protilátkou byla prasečí protilátka proti primární králičí protilátce v ředění 1: 20 000 ve 3% BSA. Detekce proběhla v temné komoře za působení detekčního systému ponechaného na vzorcích 5 minut. Expozice poté trvala 1 minutu (Obrázek 18).



Obrázek 18: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 2.

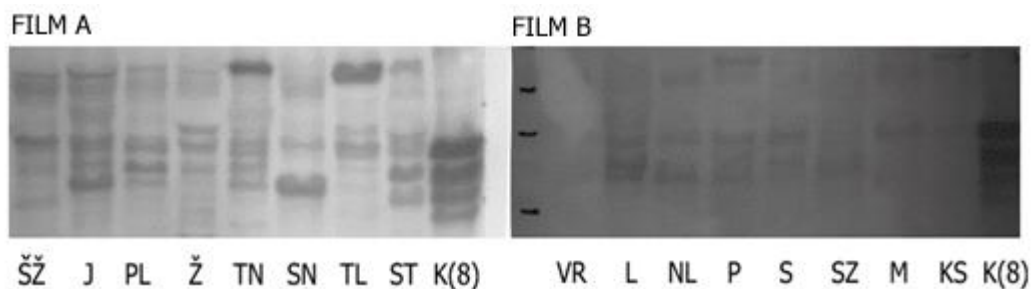
Primární králičí protilátka proti DHRS8 (ab 113490) v ředění 1:1000 ve 3% mléce. Inkubace přes noc. Sekundární prasečí protilátka proti primární králičí protilátce v ředění 1:20 000 v 3% BSA. Doba inkubace 1,5 hodiny. Expozice trvala 1 minutu.

Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, SL-slezina, M-mozek, PL-plíce, ST- sítnice, K(8)- kontrolní roztok DHRS8, Film B: VR-varle, P-prostat, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ŠŽ-štítná žláza, K(8)- kontrolní roztok DHRS8

U filmu A nebyl hledaný protein DHRS8 detekován u žádného ze vzorků homogenátu z tkání člověka 2. Kontrolní roztok, který má potvrdit správnost celého postupu, byl však detekovaný dobře. Stejný nález byl i u filmu B. Výsledek byl vyhodnocen jako pravděpodobně nedostatečné množství přenesených proteinů na membránu. Proto byla dále používána účinnější metoda (wet přenos), která je ovšem časově náročnější.

6.1.3 Zvýšení účinnosti přenosu proteinů na membránu

K dalšímu pokusu byl použit homogenát z tkání člověka 1. Na základě předešlého výsledku při zkoušce ředění protilátky na reálných vzorcích, bylo zvýšeno množství bílkovin ve vzorcích z původních 40 µg na 50 µg. Jako separační metoda byla využita SDS PAGE. Semi dry přenos byl nahrazen wet přenosem (viz kap 5.3.2). DHRS8 byl detekován pomocí primární králičí protilátky (ředění 1: 1000 v 3% BSA, přes noc v chladu) a sekundární prasečí protilátky (ředění 1:20 000 ve 3% BSA, 1,5 hodiny). Expozice trvala 5 minut.



Obrázek 19: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 1.

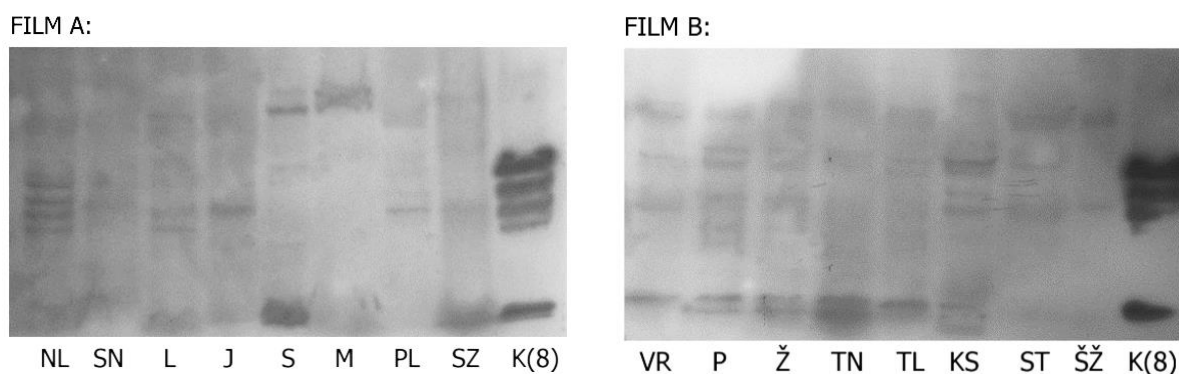
Separace proběhla pomocí SDS PAGE, podmínky: 12,5% separační polyakrylamidový gel, 100 V prvních 15 min, poté 160 V dalších cca 45 min, wet přenos na PVDF membránu. Primární králičí protilátka proti DHRS8 (ab 113490) byla v ředění 1: 1000 v 3% BSA (inkubace přes noc v chladu) a jako sekundární prasečí protilátka proti králičí protilátce (1,5 hodiny inkubace). Expozice 5 minut.

Legenda: Film A: ŠŽ-štítná žláza, J-játra, PL-plíce, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, SN-slinivka, TL-tlusté střevo, ST-sítnice, K(8)-kontrolní roztok DHRS8, Film B: VR-varlata, L-ledviny, NL-nadledvina, P-prostata, S-srdce, SZ-slezina, M-mozek, KS-kosterní sval, K(8)- kontrolní roztok DHRS8

Na Obrázku 19 je vidět, že byly detekovány bílkoviny na úrovni 37 kDa, ale bohužel se ukázaly i další nespecifické vazby u jiných velikostí proteinů a kontrola se čtyřmi pruhy. Tento výsledek mohl být způsobený tím, že byla použita příliš koncentrovaná primární protilátka.

6.1.4 Úprava ředění primární protilátky

Z předchozích experimentů bylo zjištěno, že koncentrace bílkovin ve vzorku 40 µg bílkovin nestačí, proto bylo zvoleno opět 50 µg bílkovin. Vzorek byl homogenát ze tkání člověka 3. Celé testování bylo zopakováno obdobně jako je to v kapitole předchozí (viz kap.6.1.3) s tím rozdílem, že ředění primární králičí protilátky proti DHRS8 (ab 113490) bylo změněno z ředění 1:1000 na 1:5000 v 3% BSA. Expozice byla 50 min (Obrázek 20).



Obrázek 20: Testování na vzorcích homogenátu člověka 3, změna koncentrace primární protilátky z 1:1000 na 1:5000 v 3% BSA.

Separací technika SDS PAGE elektroforéza, wet metoda (jednopufrový systém, podmínky: PVDF) 2 µm (15 minut v methanolu) 3 silné pruhy, 80 mV přes noc, 100 mA 4 hodiny během dopoledne. Blokace v 5% mléce v TBST 2 hodiny. Primární králičí protilátka proti DHRS8 (ředění 1:5000 v 3% BSA, přes noc v chladném prostředí) a dále sekundární protilátka proti králičí protilátce (ředění 1: 20 000 v 3% BSA, 1,5 hodiny). Expozice 50 minut.

Legenda: Film A: NL-nadledvina, SN-slinivka, L-ledvina, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL-plíce, SZ-slezina, K(8)- kontrolní roztok DHRS8, Film B: VR-varle, P-prostata, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ST- sítnice, ŠŽ-štítná žláza, K(8)- kontrolní vzorek DHRS8

U filmu A i B vzorků homogenátu člověka 3 byly znovu detekovány nespecifické

vazby. Hypotéza z předchozího ředění-větším ředěním primární protilátky (z 1:1000 na 1:5000) se může detekovat méně nebo žádné nespecifické vazby, byla v tomto případě mylná. Kontrola má navíc znovu 4 pruhy.

6.1.5 Úprava složení ředícího roztoku protilátky

Na základě doposud otestovaných vzorků tkání byla změněna koncentrace bílkovin ve vzorku ze 40 µg bílkovin na 50 µg. Dále bylo změněno ředění primární protilátky z 1:1000 na 1:5000.

V tomto pokusu bylo změněno prostředí primární králičí protilátky proti DHRS8 (ab 113490) z 3% BSA na 3% mléko. Toto prostředí bylo zvoleno díky větší blokovací schopnosti mléka oproti bovinnímu albuminu. Při testování jsme měli k dispozici PVDF membránu, na které byly přeneseny bílkoviny homogenátu ze tkání člověka 3. Následovala blokace 1,5 hodinu v mléce (podle kap. 5.5) a poté byly aplikovány protilátky standardním postupem. Byla použita primární králičí protilátka proti DHRS8 v ředění 1:5000 ve 3% mléce přes noc, sekundární prasečí protilátka proti králičí protilátce v ředění 1:20 000 v 3% BSA, 1,5 hodiny. Detekce proběhla v temné komoře. Expozice 45 minut (Obrázek 21).



Obrázek 21: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 3– primární králičí protilátka proti DHRS8 v ředění 1:5000 ve 3% mléce.

Separace pomocí SDS-PAGE elektroforézy a wet přenos. Podmínky: PVDF membrána (15 min v methanolu), 2µm; 3 filtrační papíry (silné), vše v pufru TRIS, glycin; 80 mA, cca 50 V (přes noc); blokace 5% mlékem v TBS-T 2 hodiny. Využití primární králičí protilátky proti DHRS8 v ředění 1:5000 ve 3% mléce přes noc, sekundární prasečí protilátka proti králičí v ředění 1:20 000 v 3% BSA, 1,5 hodiny. Expozice fotofilmu s membránou 45 minut.

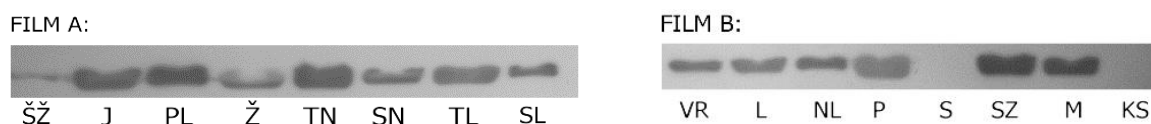
Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL-plíce, SZ-slezina, K(8)- kontrolní roztok DHRS8, Film B: VR-varle, P-prostata, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ŠŽ- štítná žláza, K(8)-kontrolní roztok DHRS8

Ačkoliv prostředí bylo změněno z bovinního sérového albuminu na více blokovací mléčné, nebylo přesto docíleno požadovaného výsledku. Na rozdíl od předchozího pokusu s BSA, kde byly detekovány téměř všechny proteiny na membráně, v prostředí mléka byly

velmi špatně viditelné i samotné kontroly obsahující značný nadbytek DHRS8.

6.1.6 Ověření stability vzorků

Na základě dosavadních výsledků byla dosud používaná protilátka vyhodnocena jako nekvalitní. Pro jistotu ještě byla ověřena stabilita vzorků pomocí detekce β -aktinu. Na ověření stability vzorků (homogenát- 50 μ g bílkovin) byla použita metoda stripování (viz kap. 5.9) za znovupoužití membrány. Po ostripování a blokaci mlékem, byla membrána inkubována s myší primární protilátkou proti β -aktinu v ředění 1:10 000 (dle doporučení výrobce) v 3% BSA (v chladu přes noc). Dále následovalo přidání sekundární králičí protilátky proti primární myší protilátce v ředění 1:20 000 v 3% BSA (1,5 hodiny). Vizualizaci jsme prováděli v temné komoře za použití detekčního systému (5 minut). Expozice 1 minutu (Obrázek 22).



Obrázek 22: Detekce β -aktinu u homogenátu z tkání člověka 1, za účelem zjištění stability vzorku.

Stripování membrány-opláchnutí ve 30 ml stripovacím pufrem 30 min při 50 °C (příprava stripovacího pufru viz kap.4.3). 3x po 15 min v TBS-T a blokace v 5% mléce v TBS-T 1,5 hod. Primární myší protilátka proti β -aktinu v ředění 1:10 000 v 3% BSA (chlad, přes noc), sekundární myší protilátka proti primární v ředění 1:20 000 v 3% BSA (1,5 hodiny). Vizualizace v temné komoře. Detekční systém na 5 min, expozice 1 minuta.

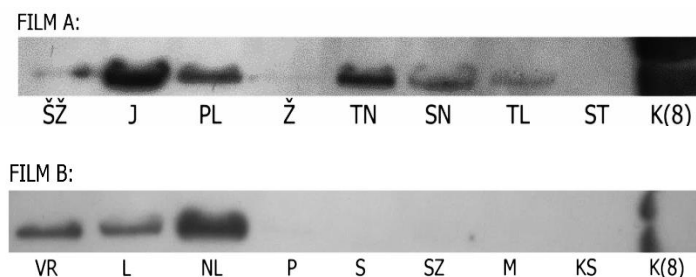
Legenda: Film A: ŠŽ- štítná žláza, J-játra, PL-plíce, Ž-žaludek TN-tenké střevo, SN-slinivka, TL-tlustí střevo, SL-slezina, Film B: VR-varle, L-ledviny, NL-nadledviny, P-prostata, S-srdce, SZ-slezina, M-mozek, KS-kosterní sval

Na filmu A a filmu B byl detekován β -aktin ve všech tkáních homogenátu člověka 1 až na tkáň srdeční a kosterního svalu obsahující jiný typ β -aktinu, který dostupná protilátka nedetekuje. Až na tyto dvě tkáně, lze říci, že vzorky byly v pořádku.

6.1.7 Optimalizace „nové“ primární protilátky (ab 103087)

Po zkoušení různých alternativ v ředění a změně prostředí pro protilátky byla původní protilátka (ab 113490) vyreklamována, náhradou nám byla zaslána jiná protilátka proti DHRS8 (ab 103087). Tato protilátka byla rovnou otestována na vzorcích lidských tkání v ředění doporučeném výrobcem. Testovací vzorek byl homogenát z tkání člověka 1 v koncentraci 50 μ g bílkovin. Jako metoda pro separaci proteinů byla použita SDS-PAGE, následující metodu Western blotting-wet přenos. Aplikovaná primární protilátka byla králičí

proti DHRS8 (ab 103087) v ředění 1:1000 v 3% BSA (podle doposud provedené optimalizace z kapitoly 6.1.3) a sekundární prasečí proti králičí primární v ředění 1:20 000 taktéž v 3% BSA. Vizualizace proběhla v temné komoře. Expozice proběhla na 5 minut (Obrázek 23).



Obrázek 23: Detekce DHRS8 na homogenátu čl. 1, nová primární králičí protilátka proti DHRS8 (ab 103087).

Separáčnı metoda SDS-PAGE, WET přenos. Podmıny: PVDF membrána, tloušťka 2µm, 3 silné filtrační papıry, Na vše se využíval TRIS, glycin. 80 mA, cca 50 V 19 hodin (přes noc). Dále blokace 5% mlékem v TBS-T. Primární králičı protilátka proti DHRS8 (ab 103087) v ředění 1:1000 v 3% BSA, propláchnutı TBS-T, sekundární protilátka prasečí proti králičı v ředění 1:20 000 v 3% BSA, propláchnutı TBS-T. Vizualizace v temné komoře. Expozice 5 minut.

Legenda: Film A: ŠŽ: štıtná žláza, J-játro, PL-plíce, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, ST-sıtнице, K(8)- kontrolní roztok, Film B: VR-varlata, L-ledviny, NL-nadledviny, P-prostata, S-srdce, SZ-slezina, M-mozek, KS-kosternı sval, K(8)- kontrolní roztok DHRS8

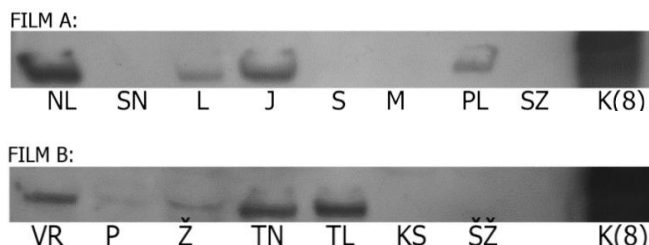
Po změně primární protilátky za novou (ab 103087) bylo dosaženo konečně dosaženo přijatelného výsledku. Na filmu A i B jsou vidět zřetelné silné proužky námi hledané DHRS8 bez nespecifických vazeb. K expozici na film postačilo 5 minut. Expres DHRS8 na bílkovinné úrovni byla zachycena u tkáně jaternı, nadledvin, varlat, ledvin, plic, slinivky, tenkého a tlustého střeva. Nejvyšší koncentrace byla detekována v játrech, plicích, tenkém střevě, varleti, ledvin a nadledvin. Slabší koncentrace ve tkáni štıtné žlázy, slinivky a tlustého střeva.

6.2 Optimalizované stanovenı exprese DHRS8 ve vzorcích

Vzhledem k tomu, že s novou protilátkou bylo docıleno požadované detekce při prvnım zkoušenım ředění, bylo toto ředění použito na samotné stanovenı exprese proteinu DHRS8 v lidských tkáních. V následujících pokusech byla tedy používána králičı protilátka proti DHRS8 (ab103087) ředěná 1:1 000 v 3% BSA. Sekundární protilátkou zůstala prasečí protilátka proti králičı v ředění 1:20 000 v 3% BSA. Proteiny byly přenášeny na PVDF membránu wet metodou.

6.2.1 Homogenát z tkání člověka 3

Stejně jako při prvním zkoušení protilátky byla použita koncentrace 50 µg bílkovin u homogenátu člověka 3. Vizualizace se uskutečnila v temné komoře. Expozice 5 minut (Obrázek 24).



Obrázek 24: Detekce DHRS8 na homogenátu čl. 3, nová primární králičí protilátka proti DHRS8 (ab 103087) v 3% BSA.

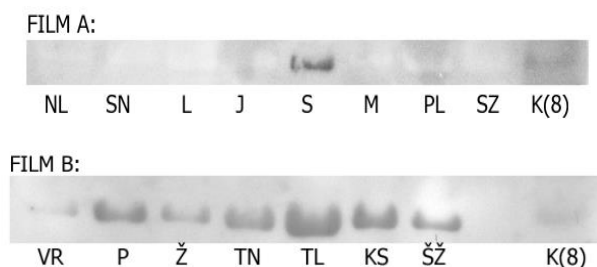
Separáčn1 metoda SDS-PAGE, WET přenos. Podm1nky: PVDF membrána, tloušťka membrány 2µm. Na vše se využíval TRIS, glycin. 80 mA, cca 50 V (přes noc). Dále blokace 5% mlékem v TBS. Primární králičí protilátka (ab 103087) v ředění 1:1000 v 3% BSA, propláchnutí TBS-T, sekundární protilátka prasečí proti králičí v ředění 1:20 000 v 3% BSA, propláchnutí TBS-T. Vizualizace v temné komoře. Expozice 5 minut.

Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL-plíce, SZ-slezina, K(8)- kontrolní roztok DHRS8, Film B: VR-varlata, P-prostata, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ŠŽ-štitná žláza, K(8)-kontrolní roztok DHRS8

Při opakování podmínek z předchozího úspěšného pokusu (viz. kap.6.1.7) byl enzym DHRS8 nalezen taktéž v homogenátu z tkání člověka 3. Vyšší koncentrace byla nalezena u tkání nadledvin, jater, tenkého a tlustého střeva. Nižší koncentrace pak u tkání ledvin, plic, varlat a žaludku.

6.2.2 Mikrosomy z tkání člověka 4

V dřívějších vzorcích byl použit homogenát, v případě člověka 4 byly využity mikrosomální frakce v koncentraci 30 µg bílkovin. Expozice proběhla na 7 minut (Obrázek 25).



Obrázek 25: Detekce DHRS8 na mikrosomech čl. 4 za použití nové primární králičí protilátky proti DHRS8 (ab 103087) ředěná na 1:1000 v 3% BSA.

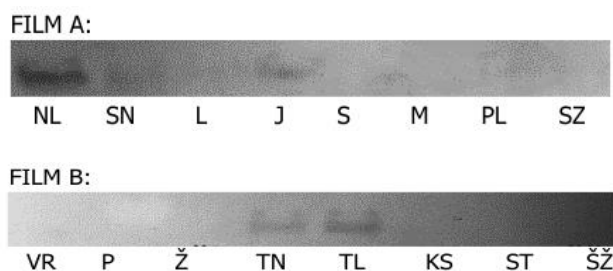
SDS-PAGE, WET přenos. Podmínky: PVDF membrána (15 min v methanolu), tloušťka membrány byla 2 μ m. Na vše se využíval TRIS, glycin. 80 mA, cca 50 V (ponecháno přes noc). Dále blokace 5% mlékem v TBS-T 2 hodiny. Primární králičí protilátka v ředění 1:1000 v 3% BSA, propláchnutí TBS-T, sekundární protilátka prasečí proti králičí v ředění 1:20 000 v 3% BSA, propláchnutí TBS-T. Vizualizace v temné komoře. Expozice 7 minut.

Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL-plíce, SZ-slezina, K(8)- kontrolní roztok s DHRS8, Film B: VR-varlata, P-prostata, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ŠŽ-štítná žláza, K(8)- kontrolní roztok s DHRS8

Při použití mikrosomů, tedy frakce, kde je přítomnost DHRS8 očekávána, neboť se jedná o membránově vázaný enzym endoplazmatického retikula byl nález DHRS8 velmi výrazný. Ve vzorcích z člověka 4 byl detekován v prostatě, žaludku, tenkém a tlustém střevě, kosterním svalu a štítné žláze. Slabší nález byl u tkáně z varlete a srdce.

6.2.3 Mikrosomy z tkání člověka 5

Na další testování byly k dispozici taktéž mikrosomy z tkání člověka 5. Tentokrát byly vzorky aplikovány v koncentraci 20 μ g místo předešlé 30 μ g. Expozice trvala 2 hodiny díky slabému svícení detekčního systému (Obrázek 26).



Obrázek 26: Detekce DHRS8 na mikrosomech čl. 5 v koncentraci 20 μ g bílkovin, nová primární králičí protilátka (ab 103087) v ředění 1:1000 v 3% BSA.

SDS-PAGE, WET. Podmínky: PVDF membrána (15 min v methanolu), tloušťka 2 μ m. Na vše se využíval TRIS, glycin. 80 mA, cca 50 V 19 hodin (v chladu, přes noc). Dále blokace 5% mlékem v TBS-T 2 hodiny. Primární králičí protilátka (ab 103087) v ředění 1:1000 v 3 % BSA, sekundární protilátka prasečí proti králičí v ředění 1:20 000 v 3 % BSA, propláchnutí TBS-T. Vizualizace v temné komoře. Expozice 2 hodiny

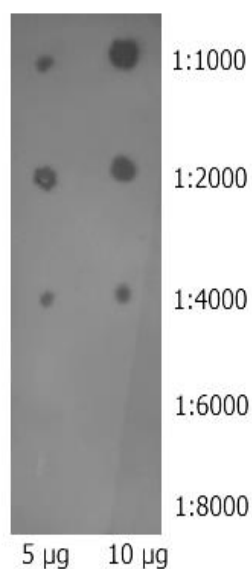
Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL-plíce, SZ-slezina., Film B: VR-varlata, P-prostata, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ST- sítnice, ŠŽ- štítná žláza

Za využití mikrosomů ze tkání člověka 5 v koncentraci 20 μg bílkovin byl enzym DHRS8 detekován pouze lehce a to u tkáně nadledvin, jater, tlustého a tenkého střeva. Jak v případě člověka 4, tak člověka 5 byly použity mikrosomy. Nález nebyl ovšem tak viditelný díky menší koncentraci, která byla 20 μg bílkovin na rozdíl od předešlého měření u člověka 4, kde byl výskyt detekovaný u koncentrace 30 μg bílkovin.

7 DHRS12

7.1 Optimalizace detekce proteinu DHRS12

Jako u enzymu DHRS8, tak u enzymu DHRS12 byla optimalizace realizována pomocí metody Dot blot (viz. kap. 5.1). Vzorky k dispozici byly *Sf9* mikrosomy obsahující rekombinantní DHRS12 (příprava viz kap. 4.7). Vzorky byly nanášeny na nitrocelulosovou membránu ve dvou různých koncentracích (5 a 10 μg bílkovin na spot) pro všechna ředění stejným způsobem. Zvolené ředění pro primární králičí protilátku (P0217) bylo 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000. Primární protilátka byla v prostředí 3% mléka. Sekundární protilátka, která se navazovala na primární králičí protilátku, byla prasečí v ředění 1:20 000 také v prostředí 3% mléka. Ředění sekundární protilátky bylo zvoleno na základě dlouhodobých zkušeností s touto protilátkou na našem pracovišti. Vzniklá chemiluminiscence byla detekována v temné komoře na fotografický papír. Expozice 5 minut (Obrázek 27).



Obrázek 27: Optimalizace koncentrace primární králičí protilátky proti *Sf9* mikrosomům s rekombinantní DHRS12 pomocí metody Dot blot.

Primární králičí protilátka proti *Sf9* mikrosomům s rekombinantní DHRS12 v ředění 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000, doba inkubace přes noc. Sekundární prasečí protilátka proti králičím protilátkám v ředění 1: 20 000 v 3% mléce, doba inkubace 1,5 hodiny. Expozice trvala cca 5 min.

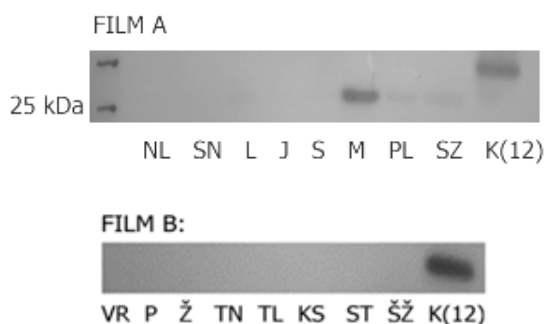
*Legenda: 5 a 10 µg- dva typy zvolených koncentrací bílkovin. 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000- typy ředění primární králičí protilátky proti *Sf9* mikrosomům.*

Na Obrázku 27 je zřejmé, že při ředění 1:1000, 1:2000, 1:4000 primární králičí protilátkou je DHRS12 detekována dostatečně. U většího ředění 1: 6000 už je detekce nulová, proto bylo zvoleno ředění maximálně do 1:4000.

7.2 Testování na lidských tkáních

7.2.1 Homogenát z tkání člověka 1

K testování dalšího vzorku byl použit homogenát ze tkání člověka 1 v koncentraci 40 µg bílkovin. Jako separační metoda byla aplikována SDS PAGE (viz. kap.3.2; 5.2) a dále Western blotting, semi-dry přenos. Primární protilátka byla použita králičí proti DHRS12 v ředění podle předešlé optimalizace 1:4000 (viz. kap.7.1) v 3% BSA. Navazující sekundární protilátka proti primární králičí protilátce byla použita prasečí v ředění 1:20 000 v prostředí 3% BSA. Jako kontrolní roztok byla použita rekombinantní forma čistého DHRS12 (vyrobená podle kap.4.7). Filmy byly vyvolávány v temné komoře při expozici 5 minut (Obrázek 28).



Obrázek 28: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 1 v koncentraci 40 µg bílkovin. SDS-PAGE elektroforézy, Western blotting semi-dry přenos. Blokace 1,5 hod v 5% mléce v PBS-T. Aplikace primární králičí protilátky proti DHRS12 v ředění 1:4000 v 3% BSA přes noc, sekundární prasečí protilátka proti králičí v ředění 1:20 000 v 3% BSA, 1,5 hodiny. Detekční systém aplikovaný na 5 minut. Expozice fotofilmu s membránou 5 minut.

Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL- plíce, SZ-slezina, K(12) -kontrolní roztok DHRS12, Film B: VR-varle, P-plíce, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ST..., ŠŽ-štítná žláza, K(12)-kontrolní roztok DHRS12

Nález enzymu DHRS12 u homogenátu z tkání člověka 1 nebyl potvrzen, jak je patrné z filmu A a B. Na filmu A můžeme vidět u mozkové tkáně nález proteinu na jiné molekulové úrovni (25 kDa) než je DHRS12, ale se stejnou antigenní specifitou.

7.2.2 Mikrosomy z tkání člověka 5

Jako další objekt testování byly tentokrát mikrosomy z tkání člověka 5. Vzorky byly napipetovány v koncentraci 20 µg bílkovin. Separační metoda byla znovu SDS PAGE a dále Western blotting, semi-dry přenos. Díky předešlému testování na člověku 1 (viz kap.7.2.1) a výrazné detekci kontrolního roztoku byla znovu zvolena primární králičí protilátka proti DHRS12 v ředění 1:4000 v prostředí 3% BSA. Sekundární protilátkou proti primární králičí protilátce byla použita prasečí v ředění 1:20 000 taktéž v 3% BSA. Expozice proběhla na 5 minut (Obrázek 29).



Obrázek 29: Testování na vzorcích lidských tkání mikrosomů člověka 5 v koncentraci 20 µg bílkovin. SDS-PAGE a Western blotting, semi-dry přenos. Blokace 1,5 hod v 5% mléce v PBS-T. Využití primární králičí protilátky proti DHRS12 v ředění 1:4000 v 3% BSA přes noc, sekundární prasečí protilátka proti primární králičí v ředění 1:20 000 v 3% BSA, 1,5 hodiny. Detekční systém aplikovaný

na 5 minut. Expozice fotofilmu s membránou 5 minut.

Legenda: Film A: NL-nadledviny, SN-slinivka, L-ledviny, J-játra, S-srdce, M-mozek, PL-plíce, SZ-slezina, K(12)- kontrolní roztok DHRS(12), Film B: VR-varle, P-plíce, Ž-žaludek, TN-tenké střevo, TL-tlusté střevo, KS-kosterní sval, ST..., ŠŽ-štítná žláza, K(12)-kontrolní roztok DHRS12

Ani v případě mikrosomů z tkání člověka 5 nebyl enzym DHRS12 detekován v dostupných tkáních. Vzhledem k tomu, že správnost celého procesu ověřuje výrazná kontrola, lze usuzovat nulovou expresi proteinu DHRS12 v testovaných tkáních.

F. DISKUZE

Pro identifikaci specifických proteinů ze složité směsi bílkovin extrahovaných z buněk se nejčastěji používá imunodetekce pomocí specifických protilátek. Obvykle jí předchází separace proteinů podle velikosti a převedení proteinů na pevný nosič (membránu) (Mahmood et al., 2012).

Aby metoda byla aplikovatelná, musí se nejdříve optimalizovat veškeré podmínky.

Nejprve je důležité zvolit správné ředění primárních i sekundárních protilátek. Při nadměrném ředění protilátky by detekce nebyla dostatečně viditelná, ne-li žádná. Naopak při menším ředění by byla detekce v pořádku, ale pokus by byl zbytečně ekonomicky náročnější (Mahmood et al., 2012). Proto byla v této práci provedena nejprve optimalizace ředění protilátky s využitím metody Dot blot. Jako optimalizovaná koncentrace primární králičí protilátky proti DHRS8 (ab 113490) bylo posouzeno ředění 1:1000. Zvolené ředění v případě enzymu DHRS8 bylo otestováno na reálných vzorcích s neuspokojivým výsledkem, kdy nebylo téměř nic detekováno i kontrola byla velmi málo viditelná.

U metody Western blotting jsou známy dva druhy přenosu proteinů. Nejprve byl používán časově méně náročný semi-dry přenos, který je ovšem méně účinný. Proto v dalších pokusech již byl používán wet přenos, který je sice časově náročnější, ale také účinnější. Tímto přechodem se předchází vysušení membrány a také je metoda vhodnější pro přenos větších proteinů (Mahmood et al., 2012).

Po neúspěšné optimalizaci byla provedena změna složení ředěného roztoku pro protilátky z 3% BSA na sušené odtučněné mléko. Mléko má výhodnou vlastnost, která zapříčiňuje obecně vyšší blokaci epitopů. Změnou prostředí byla snaha zabránit detekci nespecifických vazeb, které nám znesnadňovali odečtení výsledku. Z výsledku bylo však patrné, že blokace byla nadměrná a tudíž nebyly dobře detekovatelné ani kontrolní vzorky (Mahmood et al., 2012).

Důležitou součástí pokusu je také kontrola stability vzorků pomocí primární protilátky proti β -aktinu. Tato kontrola byla provedena z důvodu vyloučení chyby na straně zpracování vzorků a potvrzení nevhodnosti dosud používané primární protilátky proti DHRS8 (ab 113490). Stabilita tkání tak byla potvrzena. Bohužel, jsme nemohli zcela říct, že všechny testované vzorky jsou v pořádku, protože zvolená primární protilátka (ab8226) není kompatibilní s detekcí β -aktinu srdečního a kosterního svalu.

Všechny doposud provedené optimalizace na jednotlivých stupních detekce byly provedené lege artis, tudíž zbývala poslední možnost ve změně primární protilátky z ab 113490 na nově objednanou ab103087. Po aplikaci nové protilátky byl detekován enzym DHRS8 v lidských tkáních úspěšně.

Jak bylo pojednáno dříve, enzymy dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodiny) člen 8 (DHRS8, SDR16C2) a dehydrogenasa/reduktasa (SDR rodiny) člen 12 (DHRS12, SDR40C1) jsou nedostatečně popsány. Tyto enzymy se podílejí na redoxních reakcích a ovlivňují dílčí metabolické pochody organismu. Na základě zjištění jejich exprese v lidských tkáních se může předpovídat, jaké všechny fáze metabolismu ovlivňují.

Když porovnáme doposud zachycené nálezy DHRS8, na kterých pracovali další vědecké skupiny ze světa, tak je exprese tohoto enzymu známá na úrovni mRNA. Výskyt je zaznamenán u jaterní tkáně, nadledvin, plicích, ledvinách, varlately, tenkém a tlustém střevě, vaječnicích, děloze, placentě, mozku, srdci a prostatě (Li et al, 1998; Chai et al., 2003; Steckelbroeck et al., 2003).

Nicméně protein, jako takový, je zodpovědný za funkci enzymu, ne mRNA. Proto je potřeba znát enzym na úrovni proteinu. Už kvůli tomu, že existují velké rozdíly mezi mRNA úrovní a úrovní proteinu (Bray et al., 2009).

Výsledky dosažené v této práci, za použití metody Western blotting na úrovni bílkoviny jako takové, potvrzují expresi u jaterní tkáně, nadledvin, plicích, ledvinách, varlately, tenkém a tlustém střevě.

Naopak výskyt enzymu DHRS8 nebyl prokázán v mozku, srdci a prostatě.

Díky tomu, že byly používané vzorky odebrány od lidí mužského pohlaví nebylo možno potvrdit ani vyvrátit nález u tkáně vaječníku, dělohy a placenty. V těchto ženských tkáních byl enzym nalezen za použití jiné imunochemické metody, než jaká byla využita v této práci (Brereton et al., 2001).

Všechny orgány, u kterých byl enzym detekován, se podílejí na biotransformaci v organismu nebo jsou hormonální steroidogenní orgány.

Právě ovlivnění hladiny tohoto enzymu může mít dalekosáhlé důsledky. Jak můžeme vidět, enzymy byly exprimovány v orgánech, které se podílejí na biotransformaci různých látek v organismu. Od endogenních až po xenogenní. Nedostatkem nebo naopak nadbytkem se může změnit homeostáza organismu a může vyvolat různé druhy metabolických

onemocnění nebo hormonální dysbalanci (Keildson et al., 2014).

Na objasnění možných důsledků na organismus bude nutno ještě počkat. Nyní jsou předmětem dalších studií.

Enzym DHRS12 byl také imunochemicky stanovován v lidských tkáních metodou SDS-PAGE a následně Western blotting za použití příslušných protilátek. Taktéž na úrovni bílkoviny. Tento enzym byl testován na 16 lidských tkáních 2 různých subjektů mužského pohlaví.

Při detekci byl zaznamenán nález v mozkové tkáni, který podle kontrolního vzorku nebyl zcela totožný s molekulovou hmotností DHRS12 (50 kDa). Z toho důvodu můžeme uvažovat o podobnosti nálezu proteinu s DHRS12, ačkoliv jej jiné velikosti, která může být způsobena různými posttranslačními modifikacemi.

Záznamů o výskytu DHRS12 je málo. Doposud jsou publikované dvě studie, které vypovídají o expresi DHRS12 na mRNA úrovni. MRNA byla zachycena původně u jiného živočišného druhu, u ryby „zebrafish“, která patří do nadřádu Kostnatí. Tento enzym byl nalezen společně s dalšími bílkovinami uvnitř myelinových buněk. Po porovnání aminokyselinové sekvence vykazují podobnost s lidskou DHRS12, která byla nalezena v oligodendrocytech a neuronech mozkové kůry dospělého člověka. (Moll et al., 2003; Morris et al., 2004). Můžeme se proto domnívat, zda právě náš nalezený protein s molekulovou hmotností 50 kDa netvoří další skupinu enzymů podobných DHRS12.

Samotný enzym DHRS12 se nepodařilo v testovaných tkáních zachytit. Specifickou protilátkou proti DHRS12 byl však v mozkové tkáni zachycen protein jiné velikosti.

Pro další studie by bylo určitě dobré mít větší spektrum vzorků tkání a více subjektů k testování (jak ženského tak mužského pohlaví).

G. ZÁVĚR

Za použití metody Western blotting a imunodetekce se postupnou optimalizací podmínek podařilo blíže charakterizovat expresi proteinů DHRS8 a DHRS12 v lidských tkáních.

Od prvotní změny ředění primární protilátky proti DHRS8, přes změnu způsobu přenosu bílkovin ze semi-dry na metodu wet, dále obměnu prostředí pro protilátku, kontrolu stability testovaných vzorků až po úplnou změnu primární protilátky z ab113490 na novou ab103087.

Nález enzymu DHRS8 byl zaznamenán v jaterní tkáni, nadledvinách, plicích, ledvinách, varlatech, tenkém a tlustém střevě.

Naopak exprese enzymu DHRS12 v lidských tkáních nebyla zachycena.

Tato práce přispěla v charakterizaci námi doposud částečně odhalené oblasti enzymů dehydrogenas/reduktas (SDR rodiny). Mimo jiné, tato práce může poukazovat na důležitost optimalizace všech podmínek (koncentrace protilátky, použité metody, prostředí pro protilátku a kvalitu protilátek), které mohou ovlivňovat vzniklý výsledek celého pokusu.

H. POUŽITÉ ZKRATKY

AA	Akrylamid
ADH	Alkoholdehydrogenasa
AEBSF	4-(2-Aminomethyl)benzensulfonyl fluorid hydrochlorid
ALDH	Aldehyddehydrogenasa
APS	Persíran amonný
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
BDH	Hydroxybutyrátdehydrogenasa
bisAA	Bisakrylamid
BSA	Bovinní sérový albumin
C12E8	Octoethylen glykol monododecyl ether
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
cDNA	Komplementární DNA, vzniklá reverzní transkripcí z RNA do DNA
C-konec, C-terminus	Konec bílkoviny s karboxylovou skupinou
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
DHB	Dihydroxybenzoát

DHRS12	Krátko řetězcová dehydrogenasa/reduktasa 12
DHRS8	Krátko řetězcová dehydrogenasa/reduktasa 8
DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina
f.e.	For electroforesis, pro elektroforézu
GDP	Guanosindifosfát
HCl	Chlorovodíková kyselina
HepG2	Buněčné linie hepatocytárního karcinomu
HMM	Hidden Markov model
HSD	Kortikosteroid
UniprotKB	Elektronická databáze proteinů
KCl	Chlorid draselný
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
LDR	Dehydrogenasa/reduktasa s dlouhým řetězcem
Lys	Lysin
MDR	Dehydrogenasa/reduktasa se středně dlouhým řetězcem
MeOH	Methanol

mMrna	Mediátorová ribonukleotidová kyselina
NADH	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADP(H)	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
Na ₂ HPO ₄	Hydrogenfosforečnan sodný
NaCl	Chlorid sodný
N-konec, N-terminus	Konec bílkoviny s aminoskupinou
p.a.	Per analysis, pro analýzu
PDB	Paradichlorbenzen
PCR	Polymerázová řetězcová reakce
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVDF	Polyvinyliden difluoridová membrána
QR	Chinonreduktasa
RDH	Retinaldehydrogenasa
RDHE	Epidermální retinoldehydrogenasa
RetSDR	retinal dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem
SDR	Short-chain dehydrogenase/reduktase; krátko řetězcové dehydrogenasy/reduktasy
SDS	Dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE	SDS polykralamidová gelová elektroforéza
<i>Sf9</i> -Mi-DHRS8	<i>Sf9</i> mikrosomy obsahující nadměrně exprimovaný DHRS8 hmyzí buňky <i>Spodoptera frugiperda</i>
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridindifosfát

I. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Přehled enzymů redukujících sloučenin s karbonylovou skupinou (upraveno dle Oppermann et al., 2000).....	9
Obrázek 2: Vývoj charakterizovaných SDR rodin od roku 2010 po rok 2012 (upraveno dle Persson et al, 2013).	11
Obrázek 3: Zastoupení SDR rodin u organismů (upraveno podle Persson et al., 2013).....	11
Obrázek 4: Názvosloví SDR nadrodiny (převzato z Štambergová H., 2013).....	12
Obrázek 5: Sedm typů enzymů SDR rodiny známých v roce 2012 (převzato dle Persson et al., 2013).....	13
Obrázek 6: 3D porovnávací model klasických SDR, prodloužených SDR, MDR a LDR enzymů (Kavanagh et al., 2008).....	14
Obrázek 7: Příklad metabolismu retinoidů, do kterého zasahují enzymy z nadrodiny SDR (upraveno z Haeseeler et al., 1998; Billings et al., 2013).....	16
Obrázek 8: Metabolická aktivita DHRS8 (Brereton et al., 2001).	18
Obrázek 9: Vyobrazení katalytické aktivity DHRS8- oxidační reakce (upraveno dle Lundova et al., 2016).....	20
Obrázek 10: Elektroforetická aparatura (Šmarda et al., 2005).....	22
Obrázek 11: Princip použití laurylsíranu sodného (SDS) u metody SDS-PAGE (upraveno dle Šmarda et al., 2005).....	23
Obrázek 12: Sendvičové uspořádání u semi-dry přenosu (upraveno dle Internet 4)	24
Obrázek 13-Znázornění poskládaného sendviče při blottingu, wet metoda (upraveno dle Mahmood et al., 2012).	25
Obrázek 14: Nákres nitrocelulóзовé membrány se znázorněnými vzorky pro dot blot	37
Obrázek 15: Metoda SEMI-DRY přenos-Sestavený sendvič pro transport proteinů z gelu na membránu (upraveno dle Internet 3).	42
Obrázek 16: Metoda WET přenos-Sestavený sendvič pro transport proteinů z gelu na membránu (upraveno dle Internet 3).	43
Obrázek 17: Optimalizace koncentrace primární králičí protilátky (ab 113490) pomocí metody Dot blot.....	48
Obrázek 18: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 2.....	49
Obrázek 19: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 1.....	49
Obrázek 20: Testování na vzorcích homogenátu člověka 3, změna koncentrace primární	

protilátky z 1:1000 na 1:5000 v 3% BSA.	50
Obrázek 21: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 3– primární králičí protilátka proti DHRS8 v ředění 1:5000 ve 3% mléce.....	51
Obrázek 22: Detekce β -aktinu u homogenátu z tkání člověka 1, za účelem zjištění stability vzorku.....	52
Obrázek 23: Detekce DHRS8 na homogenátu čl. 1, nová primární králičí protilátka proti DHRS8 (ab 103087).....	53
Obrázek 24: Detekce DHRS8 na homogenátu čl. 3, nová primární králičí protilátka proti DHRS8 (ab 103087) v 3% BSA.....	54
Obrázek 25: Detekce DHRS8 na mikrosomech čl. 4 za použití nové primární králičí protilátky proti DHRS8 (ab 103087) ředěná na 1:1000 v 3% BSA.....	55
Obrázek 26: Detekce DHRS8 na mikrosomech čl. 5 v koncentraci 20 μ g bílkovin, nová primární králičí protilátka (ab 103087) v ředění 1:1000 v 3% BSA.....	55
Obrázek 27: Optimalizace koncentrace primární králičí protilátky proti <i>Sf9</i> mikrosomům s rekombinantní DHR12 pomocí metody Dot blot.	57
Obrázek 28: Testování na vzorcích lidských tkání homogenátu člověka 1 v koncentraci 40 μ g bílkovin.....	58
Obrázek 29: Testování na vzorcích lidských tkání mikrosomů člověka 5 v koncentraci 20 μ g bílkovin.....	58

J. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příprava polyakrylamidového gelu	39
Tabulka 2: Příprava vzorkového pufru obsahujícího 2- merkaptoethanol.	40
Tabulka 3: Příprava kontrolního roztoku k porovnání zkoušených vzorků.	40

K. LITERATURA

ALBERTS, B. A KOL, *Molecular biology of the cell*, 5. vydání, *Garland Science, New York*, . (2008), 1392 stran, ISBN 978-0-8153-4106-2

BHATIA, C., OERUM, S., BRAY, J., KAVANAGH, K. L., SHAFQAT, N., YUE, W., & OPPERMANN, U., Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure-activity relationships, *Chemico-Biological Interactions* (2015), 234, 114–25

BILLINGS SE, PIERZCHALSKI K, BUTLER TJADEN NE, PANG XY, TRAINOR PA, KANE MA, MOISE AR., The retinaldehyde reductase DHRS3 is essential for preventing the formation of excess retinoic acid during embryonic development. *FASEB J.*, (2013), 27(12):4877-89

BRAY, J. E., MARSDEN, B. D., & OPPERMANN, U., The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary, *Chemico-Biological Interactions*, (2009), 178(1-3), 99–109

BRERETON, P., SUZUKI, T., SASANO, H., LI, K., DUARTE, C., OBEYESEKERE, V., KROZOWSKI, Z., Pan1b (17HSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol*, (2001), 171(1-2), 111–117

DRAPER, N., STEWART, P.M., 11Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase and the Pre-Receptor Regulation of Corticosteroid Hormone Action. *J. Endocrinol.*, (2005) 186, 251–71

GATZEVA-TOPALOVA, P. Z., WARNER, L. R., PARDI, A., & CARLOS, M.. *NIH Public Access*, (2011), 18(11), 1492–1501

HAESELEER F, HUANG J, LEBIODA L ET AL, Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal., *J Biol Chem*, (1998), 273:21790–21799

HAESELEER F, PALCZEWSKI K , Short-chain dehydrogenase/ reductase in retina., *Methods Enzymol*, (2000), 316:372–383

HORIGUCHI, Y., ARAKI, M., MOTOJIMA, K., Identification and characterization of the ER/lipid droplet-targeting sequence in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11. *Arch. Biochem. Biophys*, (2008), 479, 121–30

CHAI, Z., BRERETON, P., SUZUKI, T., SASANO, H., OBEYESEKERE, V., ESCHER, G., KROZOWSKI, Z. ,17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology*, (2003), 144(5), 2084–2091

JÖRNVALL, H., LANDREH, M., & ÖSTBERG, L. J, Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chemico-Biological Interactions*, (2014), 234, 75–79

KAVANAGH, K. L., JÖRNVALL, H., PERSSON, B., & OPPERMANN, U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The SDR superfamily:

Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (2008). 65(24), 3895–3906

KASSNER, N., HUSE, K., MARTIN, H.-J., GÖDTEL-ARMBRUST, U., METZGER, A., MEINEKE, I., BROCKMÖLLER, J., KLEIN, K., ZANGER, U.M., MASER, E., WOJNOWSKI, L.,. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver., *Drug Metab. Dispos.* (2008), 36, 2113–20

KEILDSON, S., FADISTA, J., LADENVALL, C., HEDMAN, A. K., ELGZYRI, T., SMALL, K. S., HANSSON, O. Expression of phosphofructokinase in skeletal muscle is influenced by genetic variation and associated with insulin sensitivity. *Diabetes*, (2014). 63(3), 1154–1165

KELLER, B., GROTE, K., & ADAMSKI, J., In silico Northern blot, an automated method to determine expression patterns from EST databases, reveals tissue specificity of murine 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (2006), 248(1-2), 242–245

KOVÁŘOVÁ, H., Proteomika v postgenomové době. *Chemické Listy*, (2005), 99(12), 886–889

LABRIE F, LUU-THE V, LIN S ET AL, The key role of 17bhydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology, *Steroids*, (1997), 62:148–158

LI KXZ, SMITH RE, KROZOWSKI ZS, Cloning and expression of a novel tissue specific 17b-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocr Res*, (1998), 24:663–667

LUNDOVÁ, T., ŠTAMBERGOVÁ, H., ZEMANOVÁ, L., SVOBODOVÁ, M., HAVRÁNKOVÁ, J., ŠAFR, M., & WSÓL, V., Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8 (DHRS8): a description and evaluation of its biochemical properties, *Mol Cell Biochem*, (2016), 411(1-2), 35–42

MCBRIDE, M.W., MCVIE, A J., BURRIDGE, S.M., BRINTNELL, B., CRAIG, N., WALLACE, A M., WILSON, R.H., VARLEY, J., SUTCLIFFE, R.G., Cloning, expression, and physical mapping of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human, *Genomics*, (1999), 61, 277–84

MAHMOOD, T., & YANG, P. C., Western blot: Technique, theory, and trouble shooting, *North American Journal of Medical Sciences*, (2012), 4(9), 429–434

MOLL, W., LANWERT, C., STRATMANN, A, STRELAU, J., & JESERICH, G., Molecular cloning, tissue expression, and partial characterization of the major fish CNS myelin protein 36k., *Glia*, (2003), 44(1), 57–66

MORRIS, J. K., WILLARD, B. B., YIN, X., JESERICH, G., KINTER, M., & TRAPP, B. D. The 36K Protein of Zebrafish CNS Myelin Is a Short-Chain Dehydrogenase, *Glia*, (2004), 45(4), 378–391

MOTOJIMA K., 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11 is a major peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene in mouse intestine. *Eur J Biochem.*, (2004), 271(20):4141-6

PARÉS X1, FARRÉS J, KEDISHVILI N, DUESTER G., Medium- and short-chain

dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism.. *Cell Mol Life Sci.*, (2008); 65(24):3936-49

PARKER, R.O., CROUCH, R.K., Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp. Eye Res*, (2010), 91, 788–92

PERSSON, B., & KALLBERG, Y. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact*, (2013), 202(1-3), 111–115

PERSSON, B., KALLBERG, Y., BRAY, J. E., BRUFORD, E., DELLAPORTA, S. L., FAVIA, A. D., OPPERMANN, U., The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact*, (2009), 178(1-3), 94–98

ROTINEN, M., CELAY, J., ALONSO, M. M., ARRAZOLA, A., ENCIO, I., & VILLAR, J. Estradiol induces type 8 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression: Crosstalk between estrogen receptor α and C/EBP β *Journal of Endocrinology*, (2009), 200(1), 85–92

STECKELBROECK, S., STOFFEL-WAGNER, B., REICHELT, R., SCHRAMM, J., BIDLINGMAIER, F., SIEKMANN, L., & KLINGMÜLLER, D., Characterization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in brain tissue: testosterone formation in the human temporal lobe. *Journal of Neuroendocrinology*, (1999), 11(6), 457–64

ŠTAMBERGOVÁ, H., ZEMANOVÁ, L., LUNDOVÁ, T., MALČEKOVÁ, B., SKARKA, A., ŠAFR, M., & WSÓL, V., Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (2016), 155(Pt A), 112–9

TANG, N. T., & LE, L.. Comparative Study on Sequence-Structure-Function Relationship of the Human Short-chain Dehydrogenases/Reductases Protein Family. *Evol Bioinform Online*, (2014), 10, 165–176

LUKACIK P, KAVANAGH KL, OPPERMANN U Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, (2006), 248:61–71

OPPERMANN, U.: Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, (2007), 47, 293–322.

OPPERMANN, U. C. T., MASER, E., Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes: Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions, *Toxicology*, (2000), 144(1), 71-81

STECKELBROECK S, WATZKA M, REISSINGER A ET AL Characterisation of estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β HSD) activity in the human brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, (2003), 86:79–92

ŠMARDA, JAN, JIŘÍ DOŠKAŘ, ROMAN PANTUŮČEK, VLADISLAVA RŮŽIČKOVÁ A JANA KOPTÍKOVÁ. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, (2005), 194 s. 1. vydání

Internet 1:

<http://www.sdr-enzymes.org/>

Internet 2: Western blotting

<https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>

Internet 3: sendvičový systém, wet metoda

http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/protein_electrophoresis_blotting_and_imaging/western_blotting/technology_detail/pet21_gel_membrane_setup.gif

Internet 4: sendvičový systém, semi-dry metoda

<http://www.nature.com/protocolexchange/system/uploads/2863/original/Semi-dry-Fig2c.jpg?1387365997>

Internet 5: semi-dry

<http://www.benchfly.com/video/95/how-to-use-a-semi-dry-transfer-apparatus/>

Internet 6: semi-dry

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/western-blot-protocol/western-blotting-using-the-novex-semi-dry-blotter.html>

Internet 7: DHRS12

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DHRS12>