

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Dizertačná práce

Steroidné dehydrogenázy u kura (*Gallus gallus*): rekombinantná expresia enzýmu 20 β -hydroxysteroid dehydrogenáza v *Escherichia coli*

Marek Kučka

Vedúci dizertačnej práce: Doc. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Praha 2007

Moje poďakovanie patrí celému vedeckému kolektívu Oddelenia fyziológie epitelu Fyziologického ústavu AV ČR za poskytnutie pomocnej ruky a množstva neoceniteľných rád počas celého obdobia vzniku tejto práce.

Predovšetkým si vysoko vážim odbornú pomoc a ľudský prístup školiteľa Doc. RNDr. Jiřího Páchu, DrSc., ktorého stály záujem a pripomienky ma posúvali dopredu. Ďakujem kolegyniam RNDr. Jane Bryndovej, PhD. a Ing. Karle Mazancovej, PhD. ktoré mi pomáhali pri mojich prvých krôčikoch na poli molekulárnej biológie a boli ochotné kedykoľvek poradiť a pomôcť.

Ďakujem kolegyni Mgr. Petre Klusoňovej za hodnotné rady a spoluprácu a laborantkám Bc. Ivane Mezekovej a Ivane Muricovej za ich zručnosť a technickú pomoc pri spracovaní komplexnejších biochemických pokusov. S analýzou steroidných látok mi pomohol Ing. Ivan Mikšík DrSc., vedúci Oddelenia pre analýzu biologicky významných látok Fyziologického ústavu AV ČR, a laborant Miroslav Smrž, ktorým aj touto cestou ďakujem.

V neposlednej rade ďakujem mojej rodine a všetkým mojim blízkym, ktorí vždy verili v moje schopnosti a boli mi morálnou oporou pri písaní tejto práce i v každodennom živote.

Prehlasujem, že som celú prácu vypracoval samostatne pod vedením školiteľa Doc. RNDr. Jiřího Páchu, DrSc. a všetky použité pramene som riadne citoval v zozname použitej literatúry. Ďalej prehlasujem, že táto práca ani jej podstatná časť neboli doposiaľ predložené k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa 31.1.2007

Marek Kučka

1. ÚVOD

Steroidné hormóny sú lipofilné nízkomolekulové zlúčeniny odvodené od cholesterolu, ktoré zabezpečujú množstvo významných fyziologických funkcií. Sú syntetizované a do krvného obehu vylučované endokrinnými žľazami ako sú pohlavné žľazy (semenníky, vaječníky), kôra nadobličiek a počas gestácie aj fetoplacentárny systém. Významnou funkciou steroidných hormónov je predovšetkým koordinácia fyziologických a behaviorálnych odpovedí na zabezpečenie špecifických biologických procesov, napr. reprodukcie. Steroidné hormóny pohlavných žliaz ovplyvňujú diferenciáciu pohlavných orgánov a mozgu, určujú vznik sekundárnych pohlavných znakov a pohlavného správania počas vývinu a dospievania a prispievajú k udržaniu ich funkčnosti v dospelosti.

Glukokortikoidy a mineralokortikoidy sú steroidné hormóny pochádzajúce predovšetkým z kôry nadobličiek. Získali svoje pomenovanie na základe ich prvotne identifikovaných funkcií v organizme cicavcov. U glukokortikoidov kortizolu a kortikosterónu bola ako prvá identifikovaná ich účasť na glykogenolýze v pečeni; u mineralokortikoidu aldosterónu to bola jeho úloha v regulácii minerálnej rovnováhy kontrolou vstrebávania iónov v obličke. Dnes je známe, že okrem týchto funkcií, glukokortikoidy sprostredkovávajú stresovú odpoveď, majú významnú úlohu v procese učenia, potláčajú imunitnú odpoveď a zápal a zabezpečujú aj niektoré procesy pôvodne pripisované mineralokortikoidom, ako je napríklad rovnováha solí v organizme. Mineralokortikoid aldosterón sa okrem svojej primárnej úlohy v obličkách, na úrovni mozgu zúčastňuje regulácie krvného tlaku, potenia, chuti na slané a objemu telesných tekutín. V srdci bol dokázaný regulačný účinok aldosterónu pri vzniku fibrózy a hypertrofie srdca.

Aj napriek relatívne jednoduchej chemickej štruktúre je u steroidných hormónov možné pozorovať vysokú variabilitu v ich biologicky aktívnych formách. Okrem rozmanitých zlúčenín vylučovaných steroidogénnymi tkanivami, prispieva k tejto variabilite značný periférny metabolizmus cirkulujúcich steroidných hormónov, predovšetkým v pečeni a steroidných cieľových tkanivách. V mnohých prípadoch je periférna konverzia hormónu nevyhnutná pre zabezpečenie maximálneho biologického účinku hormónu. Napríklad, k výraznému zosilneniu účinku estrogénu estrónu dochádza v tkanivách, ako sú prsná žľaza a maternica, jeho redukciou v polohe C₁₇ na estradiol. V prípade androgénov, enzým 5 α -reduktáza redukuje dvojnú väzbu testosterónu a vznikajúci 5 α -dihydrotestosterón (androstanolón) tak u cicavcov predstavuje jeho 10-krát účinnejší derivát. Glukokortikoidy majú tiež enzýmy modulujúce ich lokálny biologický účinok. Jedna z izoforiem enzýmu

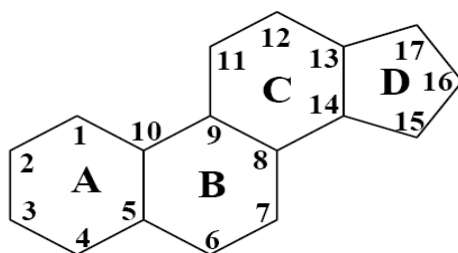
11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy oxiduje glukokortikoidy kortizol a kortikosterón na uhlíku C₁₁ a bráni tým ich väzbe s mineralokortikoidným receptorom. Druhá izoforma tohto enzýmu naopak zabezpečuje spätnú aktiváciu glukokortikoidov a tak lokálne zosilňuje ich biologický účinok v tkanivách. Zdá sa preto, že pre každý steroidný hormón existuje súbor enzýmov (steroidné dehydrogenázy) významne ovplyvňujúcich výsledný steroidný efekt hormónu. Poruchy vo funkcií týchto enzýmov hrajú významnú úlohu v patofyziológii niektorých ochorení u ľudí, ako aj hospodársky významných zvierat. To je jeden z hlavných dôvodov prečo sa v súčasnosti venuje steroidným dehydrogenázam značná pozornosť vedcov na celom svete.

V tejto práci sa venujem štúdiu steroidných dehydrogenáz v tkanivách kura domáceho (*Gallus Gallus f. domestica*). Veľký doraz kladiem na sledovanie aktivity enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme glukokortikoidov v kuracích tkanivách a na rozdiely v mechanizmoch zabezpečujúcich ochranu mineralokortikoidného receptora pred nešpecifickou väzbou s inými steroidnými hormónmi u vtákov a iných stavovcov. Avšak hlavným prínosom je úspešná identifikácia a klonovanie kuracieho enzýmu 20 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (20 β -HSD), zúčastňujúceho sa okrem modulácie účinku glukokortikoidov, aj modulácie účinku ďalších steroidných hormónov.

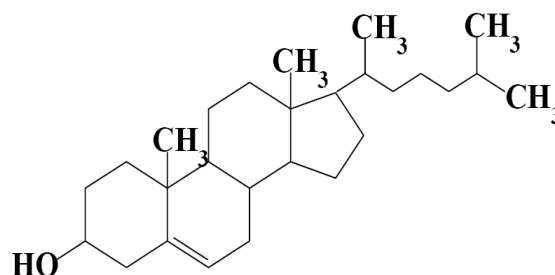
2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1. BIOSYNTÉZA STEROIDNÝCH HORMÓNOV

Všetky steroidné hormóny kôry nadobličiek, gonád a placenty (aj vitamín D), sú derivátmi cyklopentanoperhydrofenantrénového jadra, ktoré sa skladá z jadier A, B, C a D. Základnou zlúčeninou, z ktorej sa odvodzuje štruktúra steroidných hormónov je cholestan. Do tejto skupiny patrí aj cholesterol.



Cyklopentanoperhydrofenantrén



Cholesterol

27-uhlíkový cholesterol predstavuje spoločný prekursor všetkých steroidných hormónov nadobličiek a gonád, ktoré možno rozdeliť do troch skupín:

1. **C₂₁-kortikosteroidy** sú odvodené od pregnánu s metylovými skupinami na 10. a 13. uhlíku a dvojuhlíkovým bočným reťazcom na 17. uhlíku (Kreze *et al.*, 1993). Patria medzi ne predovšetkým gluko- a mineralokortikoidy (kortizol, kortikosterón, aldosterón, 11-deoxykortikosterón) a progestíny ((progesterón a 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnén-3-ón (17,20 β -dihydroxyprogesterón)). Gluko- a mineralokortikoidy sú sekretované kôrou nadobličiek, ale u necicavčích druhov tiež semenníkmi a vaječníkmi. Okrem iného sa zúčastňujú regulácie minerálnej rovnováhy, sprostredkovávajú stresovú odpoveď, potláčajú imunitnú odpoveď a zápal. U rýb sú tiež zodpovedné za adaptáciu na život v slanej a sladkej vode. Progestíny sú predovšetkým sekretované vaječníkmi, ale v niektorých prípadoch tiež semenníkmi. U cicavcov sú zodpovedné za udržiavanie tehotenstva a dozrievanie oocytov. U nižších stavovcov majú kortizol, 11-deoxykortizol a ďalšie hydroxylované deriváty progesterónu úlohu v regulácii procesov spermatogenézy, spermioogenézy a maturácie oocytov (Kime *et al.*, 1992; Chester-Jones *et al.*, 1987).

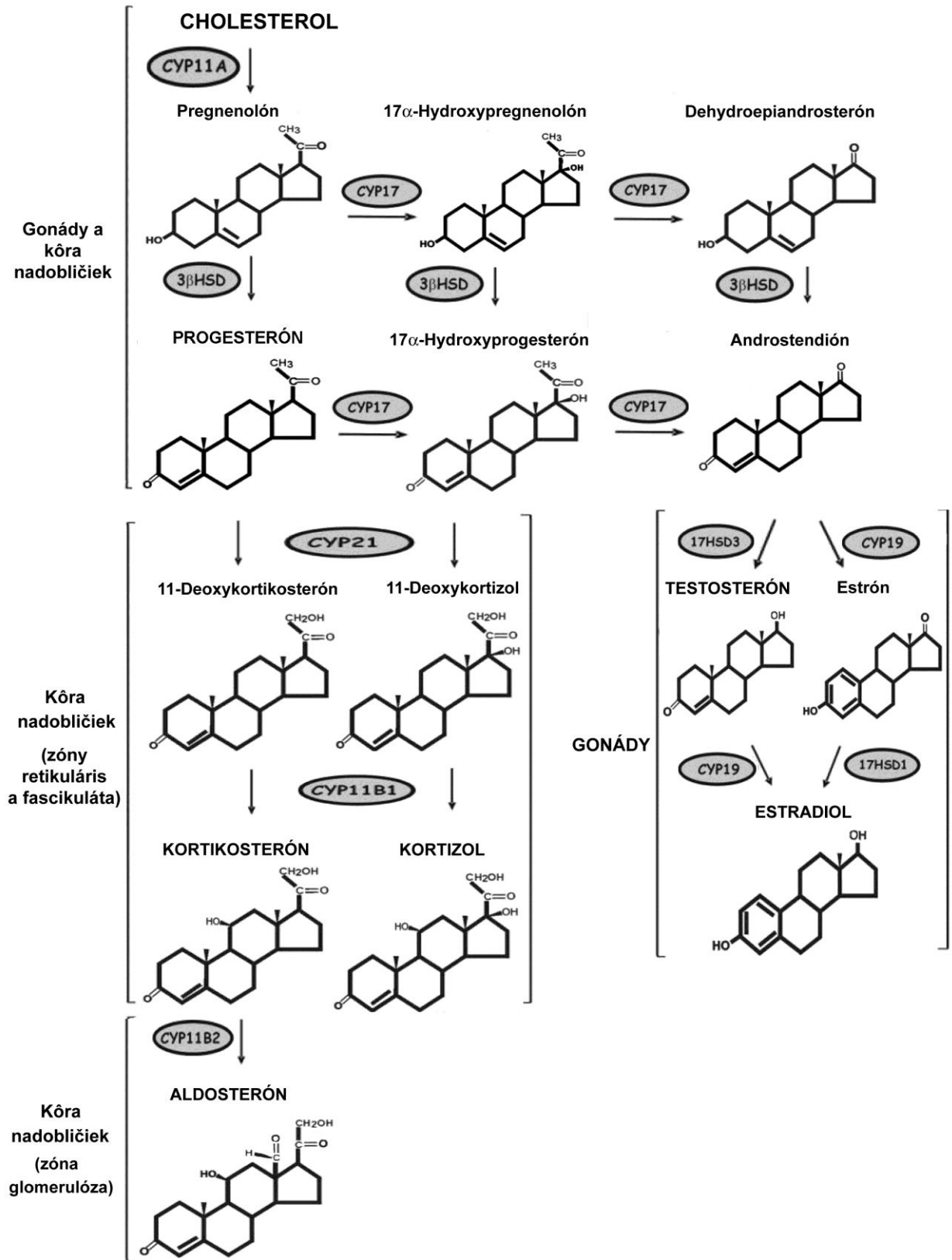
2. **C₁₉-steroidy** sú odvodené od androstánu s dvoma metylovými skupinami taktiež na 10. a 13. uhlíku a bez postranného reťazca. Patria sem androgény (testosterón, 5 α -dihydrotestosterón a 11-ketotestosterón) (Kreze *et al.*, 1993). Sú sekretované hlavne semenníkmi, v niektorých prípadoch aj vaječníkmi a nadobličkami a sú zodpovedné za prejavy sexuálneho správania samcov a vývin sekundárnych pohlavných znakov, u nižších stavovcov majú pravdepodobne tiež vplyv na rozmnožovanie u samíc.
3. **C₁₈-steroidy** sú odvodené od estránu s jednou metylovou skupinou na 13. uhlíku a bez postranného reťazca. Patria sem estrogény (estradiol, estrón). Tieto hormóny sú vylučované predovšetkým vaječníkmi a počas tehotenstva sú tiež vo veľkom množstve syntetizované placentou z cirkulujúceho dehydroepiandrosterónu (DHEA). Zabezpečujú vývin sekundárnych pohlavných znakov a estrálneho cyklu cicavcov. Hrajú významnú úlohu v pohlavnej diferenciácii mozgu a zúčastňujú sa na procese tvorby vaječného žltka u nižších stavovcov (Siiteri, 2005; Chester-Jones *et al.*, 1987).

Hoci je tvorba týchto hormónov vo všeobecnosti prisudzovaná vždy určitej žľaze ako sú napr. semenníky, vaječníky či kôra nadobličiek, tieto žľazy sú schopné v obmedzenom množstve syntézy aj viacerých steroidných hormónov. Tak napríklad steroidný hormón semenníkov, testosterón, je prekursorom ovariálnych estrogénov, a preto sa u mnohých zástupcov rýb stretávame s vyššou sekréciou tohto hormónu u samíc než je tomu u samcov. Taktiež u samíc cicavcov sú vaječníky jedným zo zdrojov androgénov (Chester-Jones *et al.*, 1987). Vzájomné prepojenie v biosyntéze rôznych steroidných hormónov je znázornené na **obrázku 1**. V obrázku sú taktiež uvedené niektoré enzýmy zúčastňujúce sa biosyntézy steroidných hormónov. Tieto enzýmy je možné rozdeliť do dvoch skupín: hem obsahujúce proteíny cytochrómu P450 a hydroxysteroid dehydrogenázy (3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (3 β -HSD) a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (17 β -HSD)) (Payne a Hales, 2004). Enzýmy cytochrómu P450 vykonávajú väčšinu enzymatických premien od cholesterolu až po biologicky účinné steroidné hormóny. Nachádzajú sa v lipofilných membránach endoplazmatického retikula a mitochondriálnych prepážkach, medzi ktorými sa steroidné molekuly presúvajú počas biosyntézy. Tak napríklad z piatich stupňov biosyntézy kortizolu, prvý a posledný sa odohrávajú na mitochondriách, kým tri medzi stupne prebiehajú v endoplazmatickom retikule. Zdrojom vodíka pre činnosť enzýmov cytochrómu P450 je NADPH vznikajúci pri oxidácii početných substrátov (Kreze *et al.*, 1993). Steroidné dehydrogenázy zabezpečujú oxidáciu alebo redukciu steroidných hormónov za využitia

oxidovaných alebo redukovaných foriem kofaktorov $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$. Hlavným rozdielom medzi enzýmami cytochrómu P450 a steroidnými dehydrogenázami je ten, že každý enzým cytochrómu P450 je produktom jedného génu, kým u steroidných dehydrogenáz existuje často viacero izoforiem. Množstvo izoforiem enzýmov je rôzne u jednotlivých druhov organizmov a vzájomne sa líšia v distribúcii v tkanivách, katalytickou aktivitou, substrátovou špecificitou a bunkovou lokalizáciou (Payne a Hales, 2004).

Premena cholesterolu na pregnenolón je určujúcim krokom v biosyntéze všetkých steroidov. Prebieha postupnou 20- a 22-hydroxyláciou účinkom mitochondriálneho enzýmového komplexu, ktorého súčasťou je cytochróm P-450_{SCC} (CYP11A, 20,22-dezmozoláza) s následným odštiepením šesťuhlíkového bočného reťazca C₂₂-C₂₇. Pregnenolón a progesterón (vznikajúci oxidáciou a izomeráciou pregnenolónu enzýmom 3 β -HSD1 a 3 β -HSD2) sú v ďalšom kroku, v závislosti na prítomných cytochrómoch, buď:

- hydroxylované cytochrómom P-450_{C17} (CYP17, 17 α -hydroxyláza/17,20-lyáza) na uhlíku C₁₇ a následne štiepené za vzniku C₁₉ steroidov (DHEA a androsténdión). Táto cesta vedie k testosterónu účinkom enzýmu 17 β -HSD3 a v ďalšom kroku môže byť testosterón účinkom cytochrómu P450_{C19} (aromatáza prítomná vo vaječníkoch a placentе) premenený na estradiol. Alternatívnou cestou vzniku estrogénov je priama aromatizácia androsténdiónu cytochrómom P450_{C19} na estrón, ktorého keto-skupina na 17. uhlíku je účinkom enzýmu 17 β -HSD1 redukovaná za vzniku estradiolu.
- alebo je v nadobličkách biosyntéza usmernená v smere tvorby glukokortikoidov a mineralokortikoidov, a to tak, že progesterón a 17 α -hydroxyprogesterón sú hydroxylované na uhlíku C₂₁ cytochrómom P-450_{C21}(CYP21,21-hydroxyláza) za vzniku 11-deoxykortikosterónu a 11-deoxykortizolu. Tento cytochróm je prítomný len v kôre nadobličiek a to vo všetkých jej zónach a je nevyhnutný pre syntézu gluko- a mineralokortikoidov. Cytochróm P450_{C11} (CYP11B1, 11 β -hydroxyláza) v ďalšom kroku hydroxyluje tieto 11-deoxy-zlúčeniny na glukokortikoidy kortizol a kortikosterón. V *zona glomerulosa* kôry nadobličiek je kortikosterón, vďaka prítomnému cytochrómu P-450_{C18} (CYP11B2, aldosterón-syntáza) hydroxylovaný a následne oxidovaný na aldosterón (**obrázok 1**).



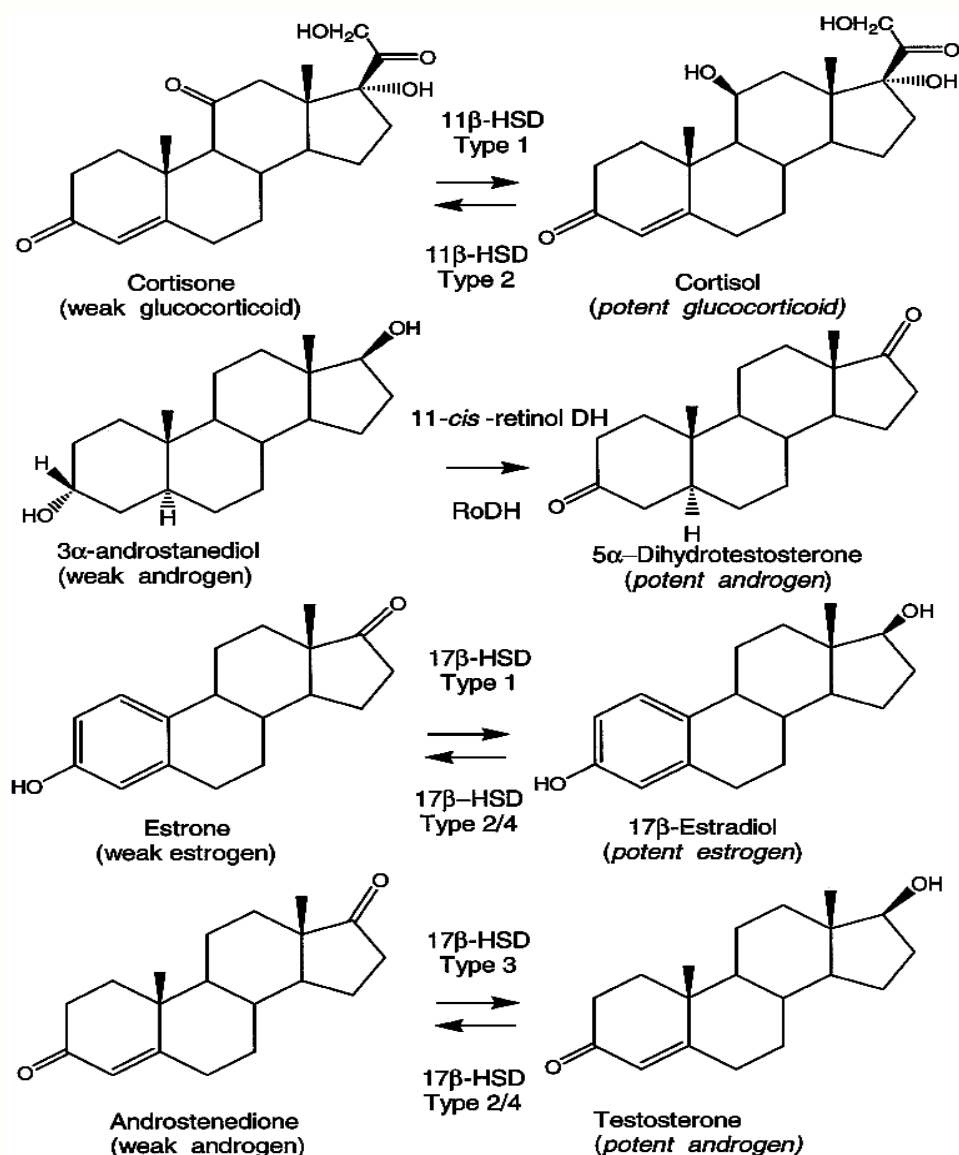
Obrázok 1. Zjednodušená schéma biosyntézy steroidných hormónov.

Enzýmy potrebné pre biosyntézu steroidných hormónov sú prítomné aj v iných, nie len tradičných tkanivách syntézy steroidných hormónov. Väčšina biologicky aktívnych steroidných hormónov má dvojnú väzbu v polohe 4. Táto väzba môže byť saturovaná enzýmami 5α - alebo 5β -reduktázou, čo má za následok zmenu konformácie molekuly hormónu spojenú s výraznou zmenou aktivity. 5β -deriváty vo všeobecnosti predstavujú biologicky neaktívne formy hormónu a 5α -deriváty, ako napríklad 5α -dihydrotestosterón (5α -DHT, androstanolón), majú často vyššiu aktivitu, než prekursor z ktorých vznikli. S 5β -redukciou sa preto často stretávame v pečeni, keďže tento orgán je miestom inaktívácie a katabolizmu steroidných hormónov (Chester-Jones *et al.*, 1987). Mnohé tkanivá exprimujú 3β -HSD, 17β -HSD a aromatázu, a preto sú schopné z cirkulujúcich prekursorov syntetizovať niektoré z hormónov. Má to napríklad veľký význam u človeka, keďže ľudské nadobličky vylučujú vysoké koncentrácie DHEA a jeho sulfátu. Tieto steroidy môžu byť v periférnych tkanivách konvertované enzýmom 3β -HSD1 na androsténdión a následne buď na testosterón niektorou z izoformiem enzýmu 17β -HSD, alebo aromatázou na estrón alebo estradiol (Payne a Hales, 2004). Enzým 17β -HSD1 je vo veľkom množstve prítomný v tkanive prsnej žľazy a endometriu maternice, kde katalyzuje konverziu cirkulujúceho estrónu na estradiol, ktorý má niekoľkonásobne vyššie estrogénne účinky (Penning, 1997). Syntéza aktívnych steroidných hormónov zo sekretovaných adrenálnych prekursorov tak umožňuje lokálnu tvorbu špecifických steroidných hormónov v cieľovej bunke (Payne a Hales, 2004). V organizme človeka a iných živočíchov existuje mnoho ďalších typov a izoformiem steroidných dehydrogenáz, ktoré upravujú periférnu koncentráciu steroidných hormónov pre správne fungovanie jednotlivých tkanív.

Odbúravanie steroidných hormónov prebieha predovšetkým v pečeni a v menšej miere aj v obličkách. Postupné degradačné reakcie zahŕňajú redukciu dvojnej väzby za vzniku príslušných dihydroderivátov, následnú oxidáciou ketónovej skupiny na pozícii 3 za vzniku tetrahydroderivátov. Tieto látky môžu byť konjugované s kyselinou glukurónovou a vylúčené močom. Počas odbúravania môže dôjsť k redukcii ketónovej skupiny na pozícii 20 za vzniku 20α -kortolov alebo 20β -kortolov a následnej oxidácii hydroxylovej skupiny na pozícii 21 za vzniku polárnych kortolových a kortolónových kyselín (Stewart a Krozowski 1999).

2.2. DEHYDROGENÁZY METABOLIZMU STEROIDNÝCH HORMÓNŮV

Ako bolo už naznačené v predchádzajúcej kapitole, steroidné dehydrogenázy hrajú kľúčovú úlohu v biosyntéze a inaktivácii steroidných hormónov. V steroidogénnych tkanivách katalyzujú posledné stupne v biosyntéze androgénov, estrogénov a progestínov. V periférnych tkanivách zasa premieňajú aktívne steroidné hormóny na neaktívne metabolity, a tak regulujú množstvo hormónu, ktoré sa môže viazať s receptormi. Výsledkom tejto aktivity je účinná regulácia expresie génov (Penning, 1997). Predpokladá sa, že pre každý steroidný hormón

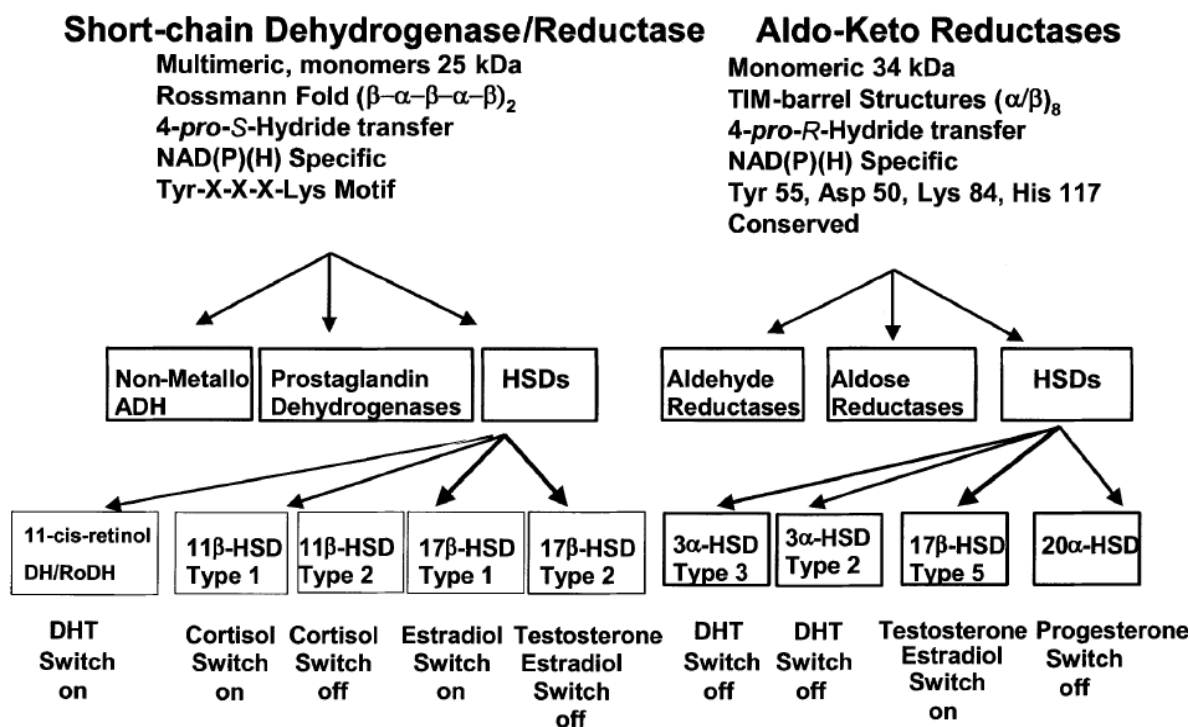


Obrázok 2. Príklad párov steroidných dehydrogenáz zúčastňujúcich sa reverzibilnej aktivácie a inaktivácie steroidných hormónov. 11-cis-retinol DH = 11-cis-retinol dehydrogenáza; RoDH = retinol dehydrogenáza (3α-HSD-podobná dehydrogenáza) (Penning, 2003).

existuje pár steroidných dehydrogenáz, z ktorých jedna premieňa aktívny steroid na jeho neaktívnu formu a naopak (**obrázok 2**). Vo väčšine prípadov k tomu dochádza redukciou keto-skupiny steroidu na hydroxylovú (reduktázová aktivita), alebo oxidáciou hydroxylovej skupiny na keto-skupinu (oxidázová aktivita). Oxidázová a reduktázová aktivita dehydrogenáz umožňujú rôznym izoformám týchto enzýmov fungovať ako molekulárne spínače, ktoré účinne ovplyvňujú mieru obsadenia receptora ligandom. Niekoľko príkladov takýchto dehydrogenáz je zobrazených v **obrázkoch 2 a 3** (Penning, 2003).

Steroidné dehydrogenázy je možné rozdeliť do dvoch proteínových super-rodín: SDR „short-chain alcohol dehydrogenases“ a AKR „aldo-keto reductases“. Zástupcov super-rodín SDR a AKR je pritom možné od seba pomerne jednoducho odlíšiť.

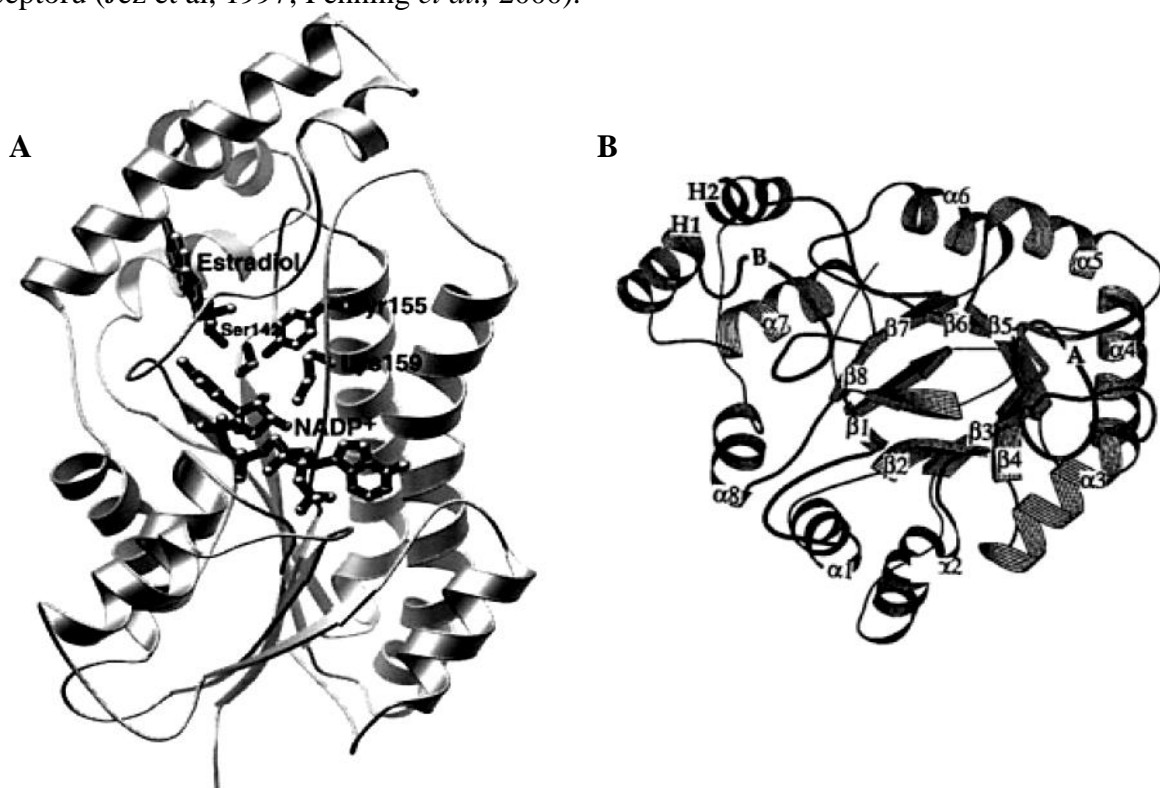
SDR sú prevážne multimerne oxidoreduktázy využívajúce ako kofaktor NAD(P)(H) s monomérom o veľkosti približne 27 kDa. Často sú súčasťou bunkových membrán a aj napriek veľmi nízkej sekvenčnej aminokyselinovej homológii členov super-rodiny (< 25 %) sa všetci členovia vyznačujú prítomnosťou charakteristických proteínových motívov. Tvoria ich sedem centrálne umiestnených β -skladaných listov s postranne umiestnenými skupinami α -hélixov (Ghosh et al, 1995). Vyznačujú sa tiež prítomnosťou motívu pre väzbu kofaktora NAD(P), tzv. Rossmannov záhyb (Gly-X-X-Gly-X-X-Gly), a konzervovaného



Obrázok 3. Super-rodiny steroidných dehydrogenáz. ADH = alkoholdehydrogenáza, HSD = hydroxysteroid dehydrogenáza, RoDH = retinol dehydrogenáza, DHT = 5 α -dihydrotestosterón (Penning, 2003).

katalytického motívu Tyr-X-X-(Ser)-Lys, kde aminokyselina tyrozín predstavuje hlavnú katalytickú jednotku (**obrázok 4A**) (Chen *et al.*, 1993). Medzi SDR patria napríklad 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (11 β -HSD) regulujúce prístup hormónov k mineralokortikoidnému (MR) a glukokortikoidnému receptoru (GR), 3 β -HSD/izomerázy a väčšina izoforiem enzýmu 17 β HSD, ktoré kontrolujú prístup ligandov k androgénovému a estrogénovému receptoru (Krozowski, 1994; Peltoketo *et al.*, 1999).

AKR enzýmy tvoria v cytoplazme rozpustné monoméry a využívajú ako kofaktor NAD(P)(H). Zástupcovia tejto skupiny často vykazujú vysoký stupeň aminokyselinovej sekvenčnej homológie (zástupcovia AKRC1 rodiny > 67 %). Proteínovú štruktúru tvorí katalytická doména zložená z ôsmich paralelných β -vláken tvoriacich vnútorný β -barel obklopený z vonku ôsmimi α -hélixami. Tento motív sa nazýva (α/β) $_8$ -barel alebo TIM-barel (**Obrázok 4B**) (Farber a Petsko, 1990). Do super-rodiny AKR dehydrogenáz patrí početná skupina izoforiem enzýmov 3 α -HSD a 20 α -HSD, ktoré vykazujú rôznu úroveň 3-, 17- a 20-ketosteroid reduktázovej aktivity a tiež rôznu úroveň 3 α -, 17 β - a 20 α -hydroxysteroid oxidázovej aktivity. Tieto dehydrogenázy sa preto môžu zúčastňovať regulácie prístupu rôznych ligandov k androgénovému (AR), estrogénovému (ER) a progesterónovému (PR) receptoru (Jez *et al.*, 1997; Penning *et al.*, 2000).



Obrázok 4. A. Zástupca super-rodiny SDR, 17 β -HSD izoforma 1 so siedmimi centrálnymi umiestnenými β -skladanými listami a postrannými α -hélixami (Breton *et al.*, 1996). B. Štrukturálne motívy enzýmu 3 α -HSD, zástupcu super-rodiny AKR, s α/β barelovou štruktúrou „ α/β barrel fold“ (Hoog *et al.*, 1994).

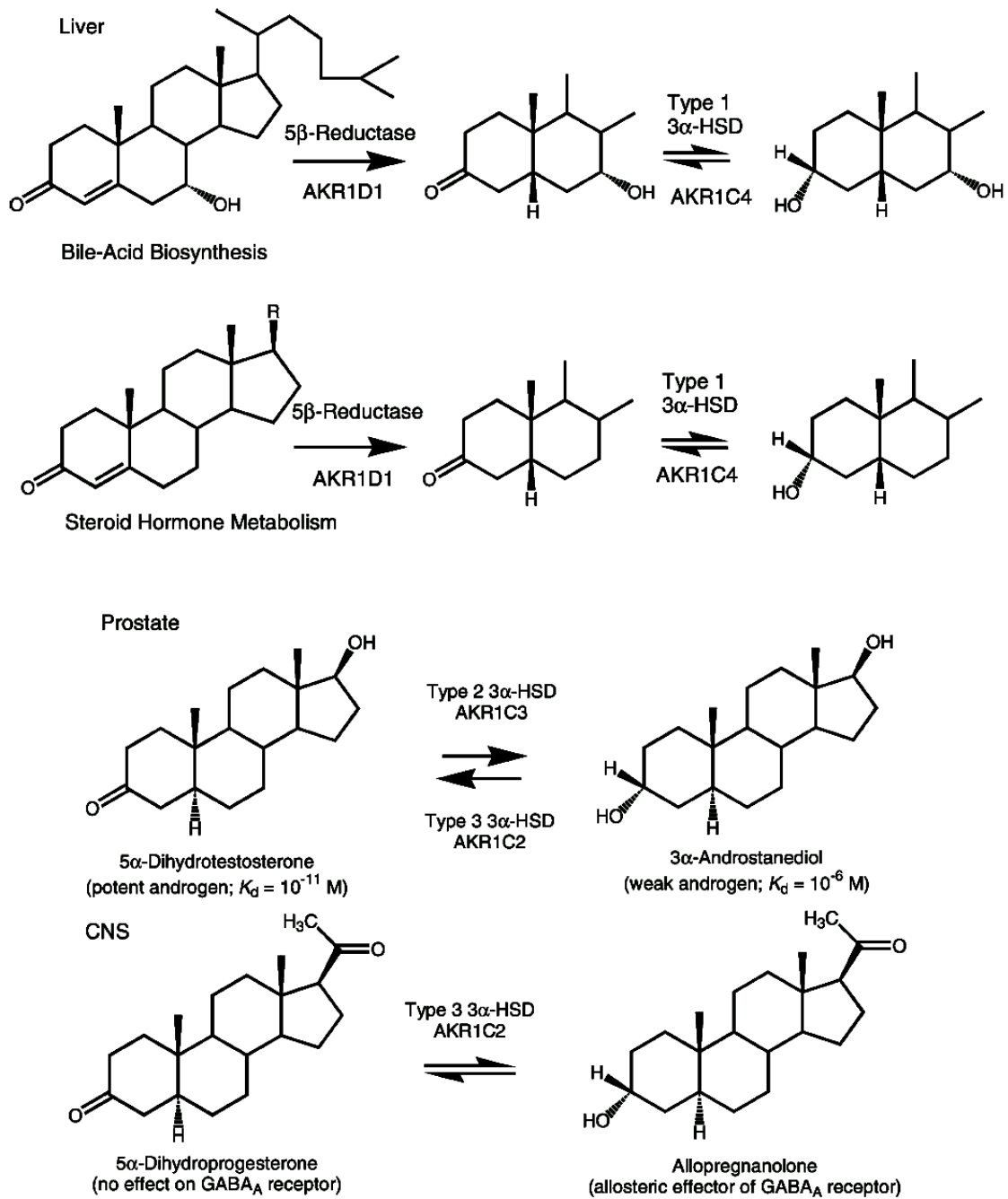
2.2.1. 3 α -hydroxysteroid dehydrogenáza

Enzým 3 α -hydroxysteroid dehydrogenáza (3 α -HSD), s monomérom o hmotnosti približne 37k Da, patrí medzi najlepšie charakterizovaných zástupcov super-rodiny AKR. V súčasnosti je známa jedna izoforma tohto cytozolárneho enzýmu u potkana (AKR1C9) a 5 izoformami u človeka: typ 1 (AKR1C4), typ 2 (AKR1C3, tiež známa ako typ 5 17 β -HSD), typ 3 (AKR1C2, tiež známa ako proteín viažuci žlčové kyseliny) a 20 α /3 α -HSD (AKR1C1) (Penning *et al.*, 2003).

Cicavčie enzýmy v spolupráci s 5 β -reduktázou (AKR1D1), ktorá taktiež patrí medzi AKR dehydrogenázy a redukuje dvojnú väzbu medzi uhlíkmi 4 a 5, redukovávajú v pečeni 3-ketosteroidy, a tak produkujú dôležité medziprodukty pre biosyntézu žlčových kyselín. V periférnych tkanivách regulujú lokálnu koncentráciu 5 α -DHT. Isoformy tohto enzýmu premieňajú 5 α -DHT (K_d pre AR približne 10^{-11}) na 3 α -androstándiol (K_d pre AR približne 10^{-6}) v prostate, čím znižujú afinitu 5 α -DHT k AR až 100-tisíckrát. 20 α /3 α -HSD zabezpečuje predovšetkým redukcii progesterónu na 20 α -hydroxyprogesterón, ktorý má nízku afinitu k PR (Penning, 1997; Penning *et al.*, 2003).

Okrem toho, izoformy 3 α -HSD v centrálnom nervovom systéme konvertujú 5 α -DHT na allopregnanolón, ktorý je alosterickým efektorom GABA receptora (Griffin a Mellon, 1999). Allopregnanolón zvyšuje afinitu GABA_A receptora a zvyšuje tok chloridových iónov, čoho výsledkom sú anxiolytické a anestetické účinky (Lambert *et al.*, 1995) (**obrázok 5**). Každá z piatich izoformami ľudského enzýmu 3 α -HSD bola naklonovaná a rekombinantne exprimovaná v baktérii *E. coli*. Bolo zistené, že tieto enzýmy zdieľajú vysokú aminokyselinovú sekvenčnú homológiu (typ1:typ5=84%, typ3:typ5=86%, typ1:20 α -HSD=84%, typ3:20 α -HSD=97,8%) a každý z nich vykazoval vysokú plasticitu svojej aktivity (Dufort *et al.*, 2001). Väčšina enzýmov bola schopná redukcie ako aj spätnej oxidácie steroidov v polohe 3, 17 a 20 (5 α -DHT \leftrightarrow 3 α -androstándiol, Δ^4 -androstán-3,17dión \leftrightarrow testosterón, estrón \leftrightarrow 17 β -estradiol, progesterón \leftrightarrow 20 α -hydroxyprogesterón) (Penning *et al.*, 2000).

Zjavné sú medzidruhové rozdiely v aktivite týchto enzýmov. Zatiaľ čo u ľudského enzýmu 3 α /20 α -HSD bola jedinou významnou aktivitou zaznamenaná 20 α -redukcia progesterónu, tak u ostatných skupín cicavcov má tento enzým aj významnú 17 β -HSD a 3 α -HSD aktivitu. Preto sa dá predpokladať, že v závislosti na ich katalytickej účinnosti,

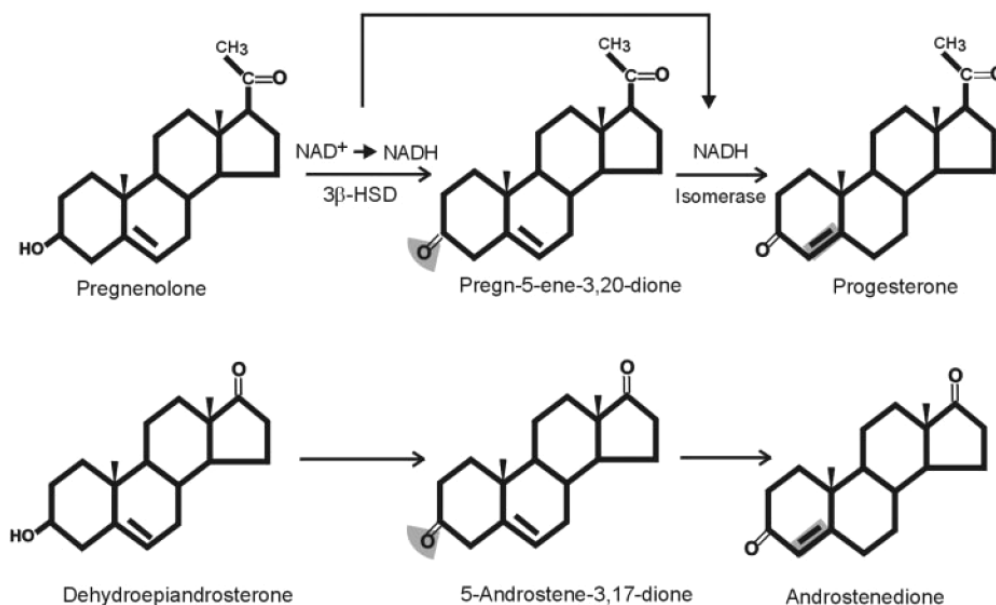
Fig. 1. Reactions catalyzed by human 3 α -HSD isoforms.

Obrázok 5. Reakcie katalyzované izoformami ľudského enzýmu 3 α -HSD (Penning *et al.*, 2003).

rôznej schopnosti fungovať v rámci bunky ako reduktázy či oxidázy a odlišnej distribúcie v tkanivách, sú tieto enzýmy schopné významne regulovať obsadenie AR, ER a PR receptorov (Penning *et al.*, 2003).

2.2.2. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

Membránovo viazaný enzým 3 β -HSD využívajúci ako kofaktor NAD⁺ bol po prvý krát popísaný v roku 1951 (Samuels *et al.*, 1951). Tento enzým je lokalizovaný v membráne endoplazmatického retikula a mitochondrií a katalyzuje 3 β -dehydrogenáciu Δ^5 -steroidov (pregnenolón, 17 α -hydroxypregnenolon, DHEA a androstán-5-én-3 β ,17 β -diol) s ich následnou izomeráciou na Δ^4 -steroidy (progesterón, 17 α -hydroxyprogesterón, Δ^4 -androsténdión) (**obrázok 6**). Zástupcovia rodiny 3 β -HSD enzýmov okrem toho katalyzujú syntézu alebo degradáciu 5 α -androstánov a 5 α -pregnánov ako sú 5 α -DHT a dihydroprogesterón (Simard *et al.*, 2005). Pri biosyntéze steroidných hormónov katalyzuje enzým 3 β -HSD prvé stupne premeny cholesterolu, a preto je nevyhnutný pre biosyntézu všetkých skupín steroidných hormónov: glukokortikoidov, mineralokortikoidov, progesterónu, androgénov a estrogénov (**obrázok 1**) (Cherradi *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 1994).



Obrázok 6. Príklad reakcií katalyzovaných izoformami 1 a 2 ľudského, alebo izoformami 1 a 4 myšieho enzýmu 3 β -HSD (Payne a Hales, 2004).

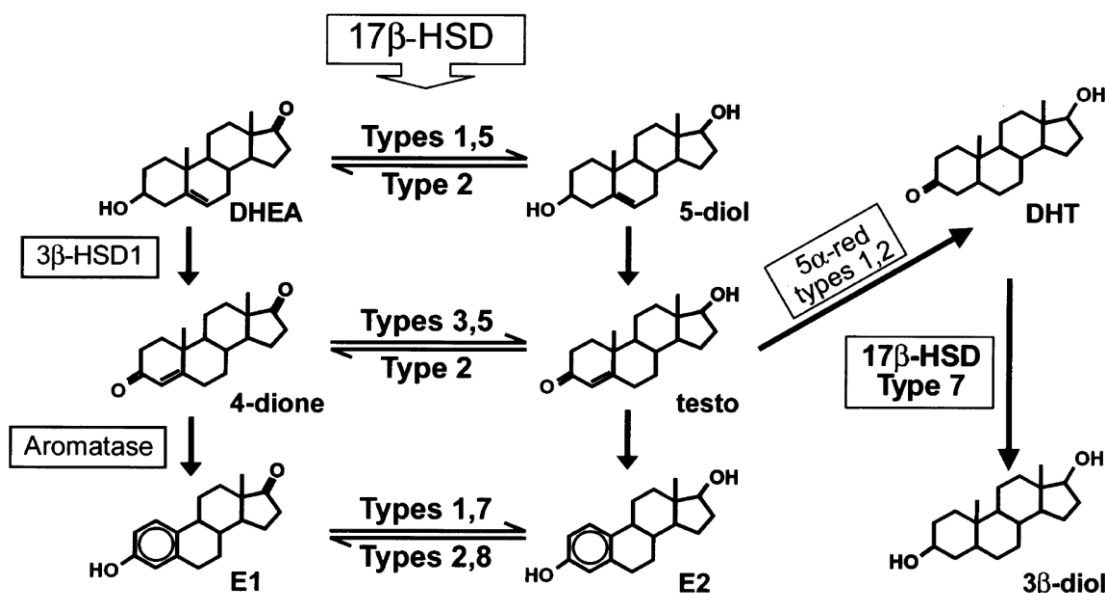
Prítomnosť na glycín bohatého segmentu Gly-X-X-Gly-X-X-Gly na N-konci molekuly (Rossmannov fold) a katalytického motívu Tyr-X-X-X-Lys zaraďuje tieto enzýmy do superrodiny SDR steroidných dehydrogenáz (Thomas *et al.*, 2003). V súčasnosti bolo identifikovaných niekoľko izoformiem 3 β -HSD u človeka a ďalších druhov stavovcov.

Izoforma 1 bola izolovaná z ľudskej placenty (Luu-The *et al.*, 1988) a izoforma 2 z kôry nadobličiek (Rheume *et al.*, 1991). Izoforma 1 (s proteínom o veľkosti 372 aminokyselín) je predovšetkým exprimovaná v placente a periférnych tkanivách, ako sú koža, prsná žľaza, prostata. Purifikovaný proteín má pre DHEA $K_m = 3,7 \mu\text{M}$ a $V_{\max} = 43 \text{ nmol/min.mg}$ a pre izomerizačnú reakciu substrátu 5-androstan-3,17-diónu $K_m = 28 \mu\text{M}$ a $V_{\max} = 598 \text{ nmol/min.mg}$. Izoforma 2 (s proteínom o veľkosti 371 aminokyselín) zdieľa s izoformou 1 93,5 % sekvenčnej homológie a je u človeka exprimovaná takmer výhradne v kôre nadobličiek, vaječníkoch a semenníkoch ($K_m = 47 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 82 \text{ nmol/min/mg}$ pre konverziu DHEA; $K_m = 88 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 970 \text{ nmol/min/mg}$ pre izomerizáciu) (Thomas *et al.*, 2001; Luu-The *et al.*, 1988). Predpokladá sa, že vyššia afinita izoformy 1 k substrátu zabezpečuje účinnejšiu tvorbu steroidov zo substrátov, ktoré sa vo všeobecnosti vyskytujú v periférnych tkanivách v nižších koncentráciách. U ostatných skupín stavovcov je ľudská izoforma 2 označovaná ako izoforma 1 a izoforma 1 ako 2. U myši bolo identifikovaných 6 a u potkana 4 izoformy, pričom napríklad izoforma 3 u potkana účinkuje predovšetkým ako 3-ketosteroid reduktáza a je výhradne exprimovaná v pečeni samcov (Zhao *et al.*, 1990). Izoforma 4 potkana zdieľa 90,9 %, 87,9 % a 78,8 % podobnosť s izoformami 1, 2 a 3 a je hlavnou izoformou exprimovanou v koži a placente potkanov. Okrem toho, izoformy 1 a 4 vykazujú aj 17 β -HSD aktivitu špecifickú pre 5 α -androstan-17 β -ol steroidy, čím hrajú dôležitú úlohu v kontrole dostupnosti aktívneho androgénu 5 α -DHT v tkanivách (Sanchez *et al.*, 1994).

2.2.3. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

Už v 50. rokoch 20. storočia, Ryan a Engel (1953) pozorovali, že mnohé ľudské tkanivá metabolizovali estrón na estradiol. Niekoľko rokov neskôr bol čiastočne purifikovaný enzým 17 β -HSD z ľudskej placenty (Langer a Engel, 1958) a následne bola 17 β -HSD aktivita imunohistochemicky pozorovaná aj u iných stavovcov, ako sú vtáky (Bhujle a Nadkami, 1978), plazy (Gouder *et al.*, 1975), obojživelníky (Ozon *et al.*, 1974) a ryby (Eckstein a Azoury, 1979). Podobne ako 3 β -HSD, aj 17 β -HSD hrá významnú úlohu v steroidogéze, pretože katalyzuje posledné kroky v biosyntéze aktívnych pohlavných hormónov estradiolu a testosterónu. Tento enzým sa v bunke vyskytuje buď ako membránovo viazaný, alebo rozpustný proteín (Payne a Hales, 2004). V súčasnosti je u cicavcov známych 12 typov 17 β -HSD, ktoré medzi sebou vykazujú nízku sekvenčnú homológiu, líšia sa distribúciou

v tkanivách, lokalizáciou v rámci bunky a mechanizmom enzýmovej katalýzy. Väčšina z nich patrí do super-rodiny SDR steroidných dehydrogenáz, okrem typu 5 (známa tiež ako izoforma 2 3α -HSD), ktorá patrí medzi AKR. SDR typy sú väčšinou multimérne (monomér o molekulovej hmotnosti približne 30 kDa) a AKR monomérne (monomér 37 kDa) enzýmy (Mindnich *et al.*, 2004a). U necicavčích druhov bolo naklonovaných len niekoľko z týchto enzýmov, a to typ 1 u kura (Wajima *et al.*, 1999) a typ 1 a 3 u rýb (Kazeto *et al.*, 2000; Mindnich *et al.*, 2004b). Mnohé práce dokazujú, že každá z izoformiem tohto enzýmu je schopná *in vitro* fungovať ako oxidáza aj reduktáza, avšak v neporušených bunkách *in vivo*, v závislosti od preferovaného kofaktora (NAD^+ alebo NADPH), konvertujú substrát len v jednom smere, buď 17-ketosteroidy na ich 17-hydroxylované formy, alebo opačne. Preto napríklad typy 1, 3, 5 a 7 fungujú *in vivo* ako reduktázy, kým typy 2, 4 a 8 ako oxidázy (obrázok 7, tabuľka 1) (Peltoketo *et al.*, 1999; Luu-The, 2001, Labrie *et al.*, 2000).



Obrázok 7. Reakcie katalyzované jednotlivými izoformami enzýmu 17β -HSD. DHEA = dehydroepiandrosterón, testo = testosterón, E1 = estrón, E2 = estradiol, 5-diol = 5-androsten- $3\alpha,17\beta$ -diol, 4-dión = 4-androsten- $3,17$ -dión, 3β -diol = 5α -androstán- 3β - 17β -diol, 5 α -red = 5 α -reduktáza (Luu-The, 2001).

V cieľových tkanivách účinku estrogénov, ako sú placenta, vaječníky a prsná žľaza, typy 1 a 7 zaisťujú, redukciou estrónu, vysokú lokálnu koncentráciu estradiolu. V semenníkoch typ 3 konvertuje 4-androstendión na testosterón, kým vo vaječníkoch a periférnych tkanivách je táto konverzia katalyzovaná typom 5 17β -HSD (Luu-The, 2001). Na rozdiel od ľudského

typu 1 17 β -HSD, ktorý predovšetkým konvertuje estrón na estradiol, tento typ u hlodavcov účinne konvertuje aj 4-androstendión na testosterón (Puranen *et al.*, 1997) (tabuľka 1).

Type/protein family	Species cloned	Preferred cofactor	17HSD/KSR activity <i>in vitro</i> ^a	activity <i>in vivo</i> ^b / catalytic preference	Substrate specificity	Putative function
1/SDR	Human	NADH, NADPH	Dehydrogenase< reductase	Reductase	Estrogens	E2 production
	Rat					
	Mouse					
2/SDR	Human	NAD ⁺	Dehydrogenase> reductase	Dehydrogenase	Estrogens, androgens, (progestins) ^c	E2, T inactivation (20 α P activation)
	Mouse					
3/SDR	Human	NADPH	Only reductase activity measured	Not tested/ reductase	Androgens, estrogens	T production
	Mouse					
4/SDR/MFE	Porcine	NAD ⁺	Dehydrogenase>> reductase	Dehydrogenase	Fatty acyl-CoA, estrogens	β -oxidation of fatty acids, E2 inactivation
	Human					
	Mouse					
	Rat					
	Chicken					
5/AKR	Guinea pig	NADPH	Dehydrogenase< reductase	Reductase	Steroids, cholic acids, xenobiotics	T production, detoxification
	Mouse					
6/SDR	Rat	NAD ⁺	Only dehydrogenase activity measured	Dehydrogenase	Androgens, (estrogens)	T production, 20 α P activation, bile acid production, detoxification DHT inactivation
7/SDR	Mouse	NADPH	Dehydrogenase< reductase	Reductase	Estrogens	E2 production
	Rat					
8/SDR	Mouse	NAD ⁺ / NADH	Dehydrogenase> reductase	Not tested/ dehydrogenase	Estrogens, androgens	E2 inactivation (E2 production), androgen inactivation
	Human					

Tabuľka 1. Vybrané charakteristiky izoformiem enzýmu 17 β -HSD. SDR = „short-chain dehydrogenase/reductase“, AKR = „aldo-keto reductase“, E2 = estradiol, T = testosterón, DHT = dihydrotestosterón, P = progesterón, 20 α P = 20 α -dihydroprogesterón, MFE = peroxizomálny multifunkčný enzým (Peltoketo *et al.*, 1999)

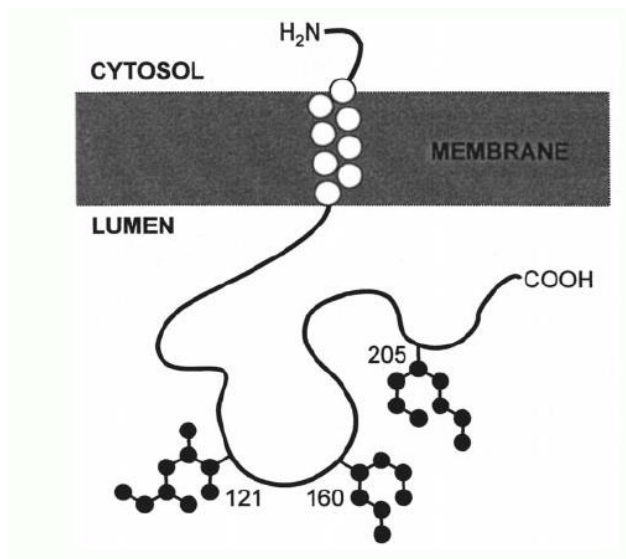
2.2.4. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

Už v roku 1953 Amelung *et al.* (1953) poukázali na prítomnosť enzýmu oxidujúceho u ľudí kortizol na kortikosterón a u hlodavcov kortikosterón na 11-dehydrokortikosterón. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázová aktivita bola následne identifikovaná v placente a obličkách (Bernal *et al.*, 1980; Jenkins *et al.*, 1966) a oxidázová aktivita v pečeni (Bush *et al.*, 1968). V súčasnosti sú známe a podrobne popísané dve izoformy tohto enzýmu, ktoré sú

produktmi rôznych génov a zdieľajú iba 21 % sekvenčnej homológie. Obidve však patria do SDR super-rodiny steroidných dehydrogenáz (Tannin *et al.*, 1991; Albiston *et al.*, 1994).

2.2.4.1. Izoforma 1 enzýmu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (11 β -HSD1)

11 β -HSD1 z pečene potkana bola jednou z prvých naklonovaných hydroxysteroid dehydrogenáz, s mRNA sekvenciou s otvoreným čítacím rámcom o dĺžke 861 bázových párov a proteínom dlhým 287 aminokyselín (hmotnosť 34 kDa) (Lakshmi a Monder, 1988; Agarwal *et al.*, 1989). Predstavuje NADP(H) závislý nízko-afinitný enzým, schopný redukcie 11-keto steroidov kortizolu a kortikosterónu, ako aj ich spätnej oxidácie. Mnohé práce však dokazujú, že *in vivo* tento enzým funguje predovšetkým ako reductáza (Jamieson *et al.*, 1995; Bujalska *et al.*, 1999; Hundertmark *et al.*, 1995), čo sa dáva do súvislosti s intracelulárnou lokalizáciou enzýmu v membráne endoplazmatického retikula a orientáciou katalytickej časti enzýmu 11 β -HSD1 do lumen tejto organely (**obrázok 8**). Jednosmernosť enzýmu 11 β -HSD1 *in vivo* pravdepodobne určujú enzýmy prítomné v lumen endoplazmatického retikula, predovšetkým však hexóza-6-fosfát dehydrogenázy, ktorá vytvára vysoké koncentrácie redukovaného kofaktora NADPH v endoplazmatickom retikule neporušených buniek (Draper a Stewart,



Obrázok 8. Schematické znázornenie enzýmu 11 β -HSD1 ukotveného v membráne endoplazmatického retikula (Blum *et al.*, 2001).

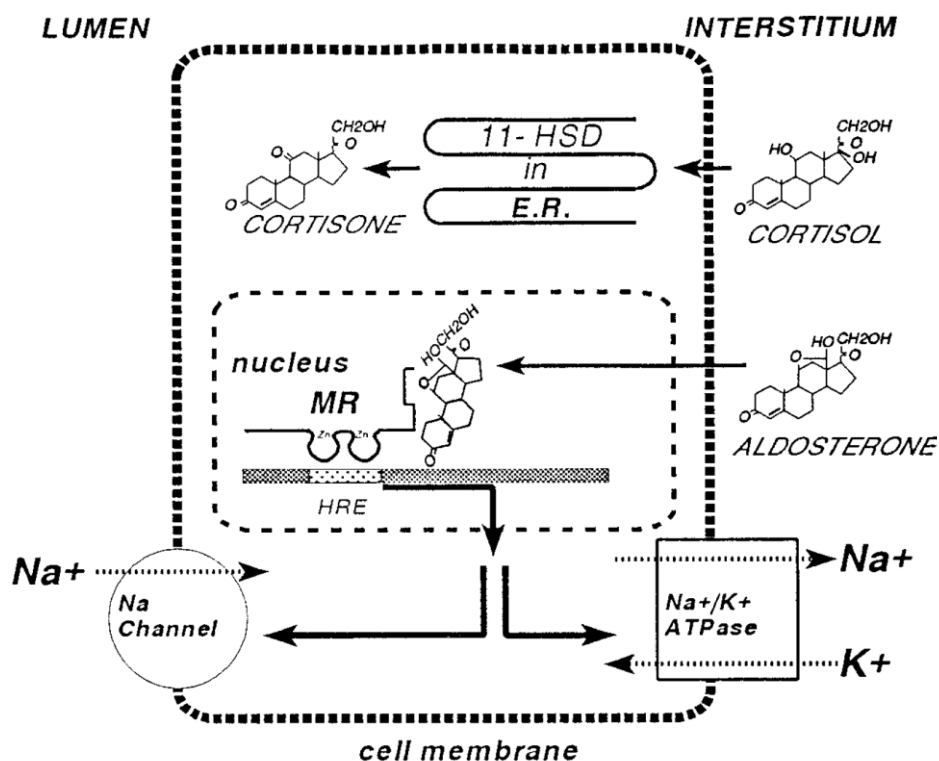
2005). Enzým je intracelulárne lokalizovaný v mikrozómoch buniek a exprimovaný v glukokortikoidných cieľových tkanivách (pečeň, pľúca, pohlavné orgány, tukové tkanivo, hypofýza, mozog), kde zvyšovaním lokálnej koncentrácie aktívnych glukokortikoidov

stimuluje účinky glukokortikoidov cez GR. Na rozdiel od neporušených buniek, purifikovaný enzým vykazoval predovšetkým oxidázovú aktivitu a preferoval NADP⁺ ako kofaktor, s K_M pre oxidáciu kortikosterónu približne 1,83 μM a pre oxidáciu kortizolu 17,3 μM (Ozols, 1995; Lakshmi a Monder., 1988). Maser *et al.*, 2002 purifikovali ľudský enzým 11 β -HSD1 z pečene a zistili, že enzým je aktívny v podobe diméru. Okrem človeka (Tannin *et al.*, 1991) a potkana (Agarwal *et al.*, 1989) je v súčasnosti cDNA sekvencia tohto enzýmu známa aj u ďalších druhov cicavcov: myš (Rajan *et al.*, 1995), primát *Saimiri sciureus* (Moore *et al.*, 1993), ovca (Yang *et al.*, 1992), králik (Ozols, 1995), prasa (Klemcke *et al.*, 2003), krava (Tetsuka *et al.*, 2003), morča (Pu a Yang, 2000), avšak nie je známa u žiadneho zástupcu z necicavčích skupín stavovcov.

2.2.4.2. Izoforma 2 enzýmu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (11 β -HSD2)

Izoforma 2 enzýmu 11 β -HSD je u cicavcov predovšetkým exprimovaná v placentе a mineralokortikoidných cieľových tkanivách ako sú epitel obličiek, hrubého čreva a slinných žliaz. V obličkách bola najväčšia aktivita 11 β -HSD2 zistená v zberných kanálikoch, kde kolokalizovala s MR. Jej primárnou funkciou je ochrana MR pred väzbou s glukokortikoidmi na zabezpečenie špecifického účinku mineralokortikoidu aldosterónu pre reguláciu vstrebávania H₂O a iónov sodíka a sekrécie iónov draslíka (Stewart a Krozowski, 1999; Sandeep a Walker., 2001). Ľudský enzým 11 β -HSD2 má vysokú afinitu ku kortizolu ($K_M= 60$ nM) a kortikosterónu ($K_M= 13$ nM) (Stewart *et al.*, 1994) a katalyzuje ich jednosmernú oxidáciu na kortizón a 11-dehydrokortikosterón za využitia kofaktora NAD⁺. Vzniknuté 11-keto deriváty kortizolu a kortikosterónu majú nízku afinitu k MR (Albiston *et al.*, 1994). Význam ochrany MR pred väzbou s glukokortikoidmi v týchto tkanivách je zjavný pri pohľade na výsledky získané z afinitných štúdií. Tieto štúdie poukazujú na to, že *in vitro* majú aldosterón a glukokortikoidy podobnú afinitu k MR (0,5-1 nM) (Krozowski a Funder, 1983; Arriza *et al.*, 1988). K zaujímavým výsledkom vo svojich pokusoch dospeli Grubb a Bentley (1992) u vtákov a Hierholzer *et al.*, (1990) u cicavcov. Zistili, že kortikosterón aj aldosterón sú schopné cez MR stimulovať vstrebávanie sodíkových iónov Na⁺-kanálmi epiteliálnych buniek. Kortikosterón bol pritom približne 10-krát menej účinný než aldosterón, avšak tento rozdiel bolo možné potlačiť inhibíciou enzýmu 11 β -HSD2 inhibítorom karbenoxolonom. Tým dokázali, že kortikosterón *in vitro* má podobné účinky ako aldosterón, avšak *in vivo* je špecificita MR k aldosterónu zabezpečovaná enzýmom 11 β -HSD2 (**obrázok 9**).

Mutácie enzýmu 11 β -HSD2 majú v mnohých prípadoch za následok nešpecifickú väzbu vysokých cirkulujúcich koncentrácií glukokortikoidov s MR. Tento stav sa nazýva AME „apparent mineralocorticoid excess“ (zdanlivý mineralokortikoidný nadbytok) a prejavuje sa nízkymi koncentraciami renínu, aldosterónu, hypertenziou a hypokalémiou (White *et al.*, 1997).

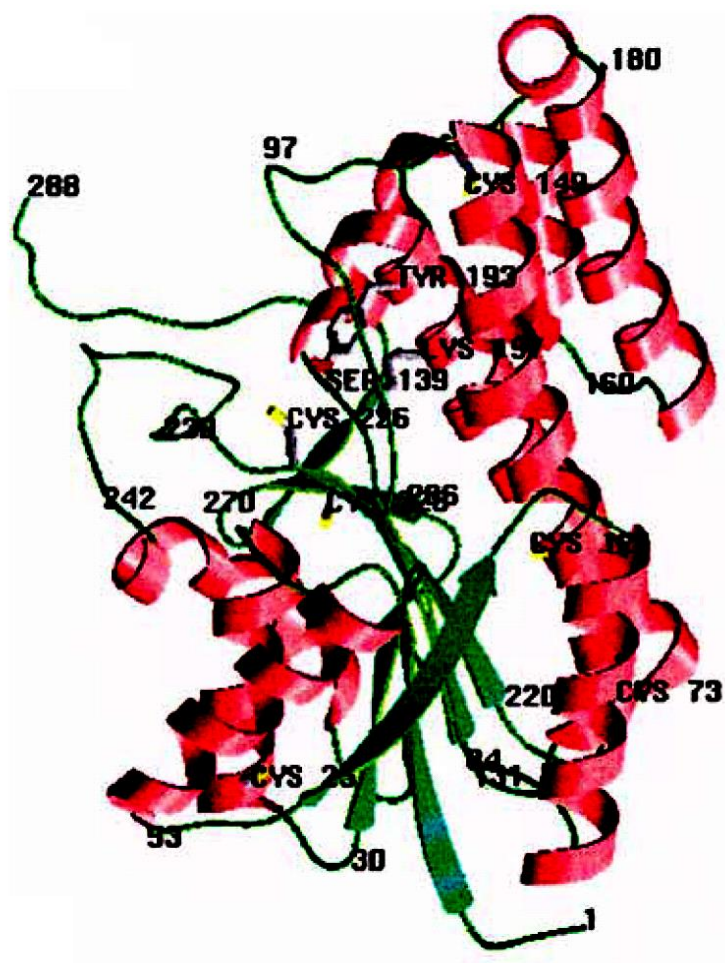


Obrázok 9. Zjednodušená schéma účinku mineralokortikoidu aldosterónu a úloha enzýmu 11 β -HSD1 v ochrane MR pred väzbou s glukokortikoidom kortizolom v bunkách zberných kanálov obličiek. E.R. = endoplazmatické retikulum, MR = mineralokortikoidný receptor, HRE = „hormon response element“ (White *et al.*, 1997)

Viacere práce tiež poukazujú na význam expície enzýmu 11 β -HSD2 v placentе počas tehotenstva, kedy tento enzým inaktíváciou glukokortikoidov v krvi matky bráni ich negatívne mu účinku na vývin plodu. Preto podanie inhibítorov 11 β -HSD2 počas tehotenstva malo u potkanov za následok spomalenie vnútromaternicového vývinu a v dospelosti vznik hypertenzie a glukózovej intolerancie (Lindsay *et al.*, 1996a; Lindsay *et al.*, 1996b; Saegusa *et al.*, 1999).

2.2.5. 3 α / β -20 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (karbonyl reduktáza 1)

Najlepšie charakterizovaný je tento enzým u prasiat (u prasiat tiež známy ako karbonyl reduktáza semenníkov). Enzým bol po prvý krát izolovaný zo semenníkov a metabolizoval rôzne progestíny a androgény (Nakajin *et al.*, 1988a). Prvé pokusy poukazovali na to, že enzým 3 α / β -20 β -HSD by sa mohol zúčastňovať regulácie koncentrácie progestínov a androgénov v semenníkoch počas ontogenetického vývinu. Neskoršie štúdie však dokázali prítomnosť 3 α / β -20 β -HSD aj v ďalších tkanivách ako sú obličky, pečeň, mozog, pľúca, týmus, srdce, slezina a kôra nadobličiek, čo poukazovalo na širšiu úlohu tohto enzýmu v metabolizme steroidov (Kobayashi *et al.*, 1996).



Obrázok 10. Terciárna štruktúra enzýmu 3 α / β -20 β -HSD prasiat (Sugiyama *et al.*, 2004).

Po naklonovaní a sekvenácii 3 α / β -20 β -HSD u prasiat v roku 1992 bol tento enzým zaradený do super-rodiny SDR dehydrogenáz/reduktáz. Naklonovaný proteín vykazoval vysokú sekvenčnú homológiu s monomérnymi karbonyl reduktázami (CBR) človeka (až 85% aminokyselinovej sekvenčnej homológie s CBR1), potkana, myši a zajaca (Tanaka *et al.*, 1992;

Wermuth, 1981; Wermuth *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 1995). V súčasnosti je preto tento enzým, v internetovej proteínovej databáze ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003) zaradený medzi karbonyl reductázy so synonymom karbonyl reductáza 1 (CBR1).

3 α / β -20 β -HSD predstavuje monomérený proteín, na rozdiel od väčšiny členov tejto super-rodiny, ktorí vykonávajú svoje funkcie v podobe dimérov alebo tetramérov (Nakajin *et al.*, 2001). O tom, že tento enzým patrí do super-rodiny SDR dehydrogenáz/reductáz, svedčí aj prítomnosť na glycín bohatého segmentu Gly-X-X-Gly-X-X-Gly na N-konci molekuly (Rossmannov fold) a triády aminokyselín Tyr(193), Lys(197) a Ser(139), zúčastňujúcich sa katalytického procesu u enzýmov tejto super-rodiny (**obrázok 10**). V súčasnosti sú známe 4 typy karbonyl reductáz (CBR1-4) (**tabuľka 2A**) a nukleotidová sekvencia enzýmu 3 α / β -20 β -HSD/CBR1 je známa u 7 druhov cicavcov a 3 druhov rýb (**tabuľka 2B**).

Synonymum:	
CBR1	20 β -hydroxysteroid dehydrogenase NADPH-dependent carbonyl reductase 1 Prostaglandin-E(2) 9-reductase Prostaglandin 9-ketoreductase 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NADP ⁺]
CBR2	Lung carbonyl reductase [NADPH] NADPH-dependent carbonyl reductase 2
CBR3	NADPH-dependent carbonyl reductase 3
CBR4	NADPH-dependent carbonyl reductase/NADP-retinol dehydrogenase Peroxisomal short-chain alcohol dehydrogenase NADPH-dependent retinol dehydrogenase/reductase

Tabuľka 2A. V súčasnosti známe typy karbonyl reductáz (CBR) a ich synonymá používané v literatúre (podľa databázy serveru ExPASy, www.expasy.org).

CICAVCE:

Prasa:	CBR1	<u>M80709</u>	Tanaka <i>et al.</i> 1992
	CBR2	<u>D16511</u>	Nakanishi <i>et al.</i> , 1993
	CBR4	<u>AB062757</u>	Usami <i>et al.</i> , 2003
Človek	CBR1	<u>J04056</u>	Wermuth <i>et al.</i> , 1988
	CBR3	<u>AB004854</u>	Watanabe <i>et al.</i> , 2000
	CBR4	<u>AB045131</u>	Furukawa <i>et al.</i> , 2000
Myš	CBR1	<u>U31966</u>	Wei <i>et al.</i> , 1996
	CBR2	<u>D26123</u>	Nakanishi <i>et al.</i> , 1995
	CBR4	<u>AB045132</u>	Furukawa <i>et al.</i> , 2000
Potkan	CBR1	<u>X84349</u>	Wermuth <i>et al.</i> , 1995
	CBR4	<u>AB062758</u>	Hara <i>et al.</i> , 2001
Zajac	CBR1	<u>U07051</u>	Gonzalez <i>et al.</i> , 1995
	CBR4	<u>AB045133</u>	Furukawa <i>et al.</i> , 2000
Orangután	CBR1	<u>CR858173</u>	Ottenwaelder <i>et al.</i> , 2004
	CBR4	<u>CR858312</u>	
Krava	CBR1	<u>BC102943</u>	Moore <i>et al.</i> , 2005b
	CBR4	<u>AF487454</u>	
Chrček	CBR1	<u>AB043541</u>	Terada <i>et al.</i> , 2001
	CBR2	<u>AB043542</u>	
	CBR3	<u>AB043543</u>	
RYBY:			
<i>Danio rerio</i>	CBR1	<u>BC054914</u>	Strausberg <i>et al.</i> , 2005
<i>Plecoglossus altivelis</i>	CBR1	<u>D82967</u>	Tanaka <i>et al.</i> , 2002
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CBR1	<u>AF100931</u>	Guan <i>et al.</i> , 1999

Tabuľka 2B. Zoznam známych karbonyl reductáz spolu s ich prístupovým kódom do databázy GeneBank.

Podobne ako CBR1 človeka, aj $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD prasiat metabolizuje steroidy, prostaglandíny a rôzne xenobiotika obsahujúce karbonylovú skupinu (Wermuth, 1981; Nakajin *et al.*, 1997).

Terada *et al.*, (2001) identifikovali 3 izoformy monomérskej karbonyl reduktázy u čínskeho škrečka, z ktorých karbonyl reduktáza 1 vykazovala najvyššiu sekvenčnú homológiu (81,3%) s $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD prasiat. U týchto rekombinantne exprimovaných izoforiem bola zistená 3-keto reduktázová a 20-keto reduktázová aktivita, avšak žiadna 17-keto reduktázová aktivita. Nakajin *et al.*, 2001 exprimovali $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD prasiat v *Escherichia coli* a u purifikovaného proteínu určili niektoré jeho charakteristiky. Enzým konvertoval testosterón hlavne na 3α -hydroxytestosterón a v menšom množstve na 3β -hydroxytestosterón, kým progesterón bol predovšetkým metabolizovaný na 20 β -hydroxyprogesterón a v malom množstve aj na 3α -hydroxyprogesterón.

V roku 2001 Imamura *et al.* poukázali na pohlavné rozdiely v aktivite enzýmu $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD nachádzajúceho sa v mikrozómoch izolovaných z obličiek potkanov. Podľa ich výsledkov bola aktivita enzýmu $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD v tkanive pod kontrolou hormónu testosterónu, a preto bola vysoká v obličkách samcov a veľmi nízka u samíc.

Viacere práce tiež poukazujú na význam enzýmu $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD pri tvorbe dôležitého maturačného hormónu 4-pregnen-17 α ,20 β -diol-3-ónu (17 α ,20 β -dihydroxyprogesterón) u rýb (Nagahama, 1997). Tento hormón vzniká redukciou 17 α -hydroxyprogesterónu enzýmom $3\alpha/\beta$ -20 β -HSD, ktorý bol naklonovaný u rýb *Oncorhynchus mykiss* (pstruh dúhový) a *Plecoglossus altivelis* v rokoch 1999 a 2002 (Guan *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002).

Už v roku 1989 DiBattista *et al.* zaznamenali u vtákov redukciu 20-ketoskupiny kortikosterónu enzýmom prítomným v bunkách sliznice hrubého čreva. Počas pokusu vznikajúci 20 β -dihydrokortikosterón mal nízku afinitu k MR, a preto autori predpokladali, že redukciou kortikosterónu v polohe 20 by bolo možné vysvetliť väzbu aldosterónu s MR aj pri vysokej koncentrácii glukokortikoidov v krvnej plazme vtákov. Podrobnejšiemu štúdiu redukcie kortikosterónu na uhlíku 20 u vtákov sa však nevenovala pozornosť až do roku 1998, kedy Vylitova *et al.* sledovali metabolizmus kortikosterónu v segmentoch hrubého a tenkého čreva vtákov (*Gallus gallus*). V čreve kura, okrem prítomnosti enzýmu 11 β -HSD2, opäť zistili tvorbu 20-dihydrokortikosterónu. Kortikosterón bol metabolizovaný na 20-dihydrokortikosterón a 11-dehydrokortikosterón na 11-dehydro-20-dihydrokortikosterón. V prítomnosti $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ kofaktorov bol kortikosterón metabolizovaný na 11-dehydrokortikosterón, kým pri použití kofaktoru NADPH na 20-dihydrokortikosterón a 11-dehydro-20-dihydrokortikosterón. Na rozdiel od enzýmu 11 β -HSD2, ktorého aktivita korelovala s citlivosťou jednotlivých častí čreva k mineralokortikoidu aldosterónu, aktivita enzýmu zodpovedného za 20-redukciu kortikosterónu bola približne rovnaká vo všetkých segmentoch čreva. Kortikosterónu bol pri nanomolárnych koncentráciách predovšetkým

metabolizovaný enzýmom 11β -HSD2 a pri mikromolárnych koncentráciách prevládali 20-dihydroderiváty kortikosterónu. Autori preto predpokladali, že enzým zodpovedný za 20-redukciu kortikosterónu je na NADPH-závislý enzým s K_M pre substrát pohybujúcou sa v mikromolárnych koncentráciách (Vylitova *et al.*, 1998).

2.3. STEROIDNÉ HORMÓNY A ICH METABOLIZMUS U CICA VCOV A OSTATNÝCH SKUPÍN STAVOVCOV

2.3.1. Androgény

Testosterón ako produkt semenníkov je prítomný u všetkých skupín stavovcov, avšak v mnohých prípadoch nepatrí medzi jediný produkt tohto orgánu. Často je v semenníkoch a periférnych orgánoch konvertovaný na deriváty, ktoré sú v niektorých prípadoch biologicky aktívnejšie. U nižších stavovcov sa tiež stretávame s produkciou testosterónu vaječníkmi. Tento steroid môže byť z pregnenolónu biosyntetizovaný dvomi odlišnými cestami zvanými 4-én (Δ^4) a 5-én (Δ^5) cesta. Metabolická 4-én cesta vedie cez progesterón a androsténdión (4-én-3-ón steroidy), kým 5-én cesta cez 17-hydroxypregnenolón a DHEA (5-én-3 β -ol steroidy). Zastúpenie týchto dvoch ciest biosyntézy testosterónu sa u rôznych druhov živočíchov môže značne líšiť (Chester-Jones, 1987). S testosterónom sa stretávame už u mihulí a sliznatiek, zástupcov bezčelústnatých kruhoústych rýb. Semenníky týchto rýb veľmi rýchlo metabolizujú testosterón na rôzne hydroxylované deriváty. U sliznatiek je to predovšetkým testosterón hydroxylovaný na uhlíku 6 a 7, u mihulí sú to pozície 15α , 15β a 11β . Zvýšenie koncentrácie testosterónu bolo u mihulí pozorované počas rozmnožovania a dáva sa do súvisu s tvorbou sekundárnych pohlavných znakov. Presný biologický význam testosterónu a jeho hydroxylovaných derivátov však nie je známy (Kime a Rafter, 1981; Lowartz *et al.*, 2003, Lowartz *et al.*, 2004).

2.3.1.1. Ryby

U širokej skupiny kostnatých rýb sa, vďaka prítomnosti enzýmov 11β -hydroxylázy a 11β -hydroxysteroid dehydrogenázy 2 (11β -HSD2), stretávame s tvorbou 11β -hydroxy a 11-ketotestosterónu (Arai a Tamaoki, 1967; Ma *et al.*, 2005). 11-ketotestosterón vykazuje u rýb 10-krát silnejšie androgénne účinky ako testosterón. Na rozdiel od cicavcov, u ktorých plazmatické koncentrácie testosterónu u samíc zriedka dosahujú desatinu hodnoty u samcov, je

testosterón u kostnatých rýb syntetizovaný aj vaječníkmi, a to v množstve presahujúcom koncentráciu tohto hormónu u samcov (Borg, 1994). Význam testosterónu u samíc nie je presne známy, ale predpokladá sa jeho úloha pri dozrievaní oocytov (Chester-Jones *et al.*, 1987).

2.3.1.2. Obojživelníky

Hlavnými androgénmi obojživelníkov sú testosterón a DHT. Podobne ako u kostnatých rýb sú sezónne plazmatické hladiny testosterónu tvoreného vaječníkmi samíc obojživelníkov (Wibbels *et al.*, 1990; Dubowsky a Smalley, 1993) a plazov (McPherson *et al.*, 1982; Licht *et al.*, 1979) vysoké. Koncentrácia androgénov u samíc môže v určitom období dosahovať koncentráciu estrogénov, a taktiež môže dosiahnuť koncentráciu androgénov u samcov. Predpokladá sa, že androgény samíc necicavčích druhov slúžia ako prekursor pre tvorbu estrogénov (Staub a DeBeer, 1997). Syntéza androgénov u obojživelníkov prebieha prevažne 5-én cestou, kým u väčšiny cicavcov prevláda v biosyntéze 4-én cesta. Testosterón je u obojživelníkov ďalej metabolizovaný predovšetkým na 11-ketotestosterón, okrem skupiny radu Anura (žaby) s vysokou aktivitou 5 α -reduktázy a 3 α -HSD, u ktorých prevládajú 5 α - a 3 α -redukované deriváty testosterónu: 5 α -DHT, 5 α -androstán-3 β ,17 β -diol a 5 α -androstán-3,17-diól (Kime *et al.*, 1978, Canosa *et al.*, 2003). U samcov obojživelníkov majú androgény význam v tvorbe sekundárnych pohlavných znakov, avšak ich úloha v regulácii sexuálneho správania nebola jednoznačne dokázaná (Canosa *et al.*, 2003). V mozgu obojživelníkov sú, podobne ako je tomu u ostatných skupín stavovcov, prítomné hlavné enzýmy biosyntézy steroidných hormónov (3 β -HSD, 17 β -HSD), a preto je toto tkanivo schopné endogénnej syntézy rôznych neurosteroidov. Medzi hlavné identifikované neurosteroidy u žiab patria testosterón, 5 α -DHT, DHEA-sulfát a pregnenolón sulfát, ako aj progesterón a 17-hydroxyprogesterón (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999; Mensah-Nyagan *et al.*, 2001). Presná úloha neurosteroidov v mozgu nie je dodnes objasnená, predpokladá sa však ich modulačný vplyv na aktivitu neurónov a úloha pri ontogenetickom vývine mozgu a správania obojživelníkov (Moore *et al.*, 1994; Erulkar *et al.*, 1981)

2.3.1.3. Plazy

U malého množstva skúmaných zástupcov plazov bol ako hlavný steroid semenníkov zistený testosterón. Podobne ako tomu bolo u zástupcov obojživelníkov radu Anura, aj semenníky plazov sú schopné v menšom množstve tvorby 5 α -derivátov androgénov

a progestínov. Je potrebné spomenúť, že u rýb, obojživelníkov a plazov má na produkciu steroidných hormónov významný vplyv teplota prostredia a dĺžka dňa (Chester-Jones, 1987).

2.3.1.4. Vtáky

Tvorba steroidných hormónov v semenníkoch vtákov je podobná cicavcom a plazom, a preto je hlavným androgénom testosterón. U voľne žijúcich vtákov sa koncentrácia testosterónu v krvnej plazme dáva do súvisu s prejavmi teritoriality a agresívneho správania, tvorbou sekundárnych pohlavných znakov a je nevyhnutný pre tvorbu spermií (Soma, 2006; Ketterson a Nolan, 1994). Zdá sa však, že k aktivačnému účinku testosterónu na reprodukciu dochádza v mozgu vtákov cez jeho aromatizáciu na estradiol účinkom aromatázy (Silverin *et al.*, 2004). V mozgu vtákov bola zistená tvorba 5 α - a 5 β -dihydrotestosterónu a estradiolu z testosterónu, poukazujúc tak na prítomnosť 5 α - a 5 β -reduktáz a aromatázy. Na rozdiel od obojživelníkov sa u vtákov väčšinou stretávame len s veľmi nízkou aktivitou 5 α -reduktázy. 5 β -redukcia má oproti 5 α -redukcii za následok tvorbu biologicky neaktívnych zlúčenín (Soma *et al.*, 2003). Zdá sa preto, že 5 β -redukcia testosterónu pravdepodobne bráni jeho maskulinizačnému účinku na mozog samíc a má tak významný vplyv na pohlavný dimorfizmus vo vývine syrinxu u spevavcov (Balthazart *et al.*, 1986). Yoshida *et al.* (1996) zaznamenali vo vaječníkoch a semenníkoch kura domáceho konverziu progestínov na androgény účinkom enzýmu 17 α -hydroxyláza (CYT P450_{C17}), pričom androgény boli vzápätí konvertované aromatázou na estrogény. Informácii o metabolizme steroidných hormónov u vtákov je však doposiaľ veľmi málo. Väčšina dostupnej literatúry pojednáva len o ich metabolizme vo vaječníkoch a v menšej miere v mozgu vtákov.

2.3.1.5. Cicavce

19-uhlíkový steroid DHEA patrí medzi najhojnejšie steroidné hormóny cirkulujúce v krvnej plazme ľudí, ktorý slúži ako jeden z prekursorov pohlavných hormónov, testosterónu a estrogénov. Na lokálnej biosyntéze testosterónu z cirkulujúceho 4-androstén-3,17-diónu, vznikajúceho z DHEA účinkom izoforiem 1 a 2 3 β -HSD, sa u cicavcov podieľajú izoforma 3 a 5 enzýmu 17 β -HSD (Labrie *et al.*, 1997). Za spätnú reakciu sú zodpovedné izoforma 2 a 4 tohto enzýmu (Adamkis *et al.*, 2001). Lokálny efekt testosterónu môže byť ďalej výrazne zosilnený jeho premenou enzýmom 5 α -reduktáza na 5 α -DHT, ktorý má veľmi silné androgénne účinky a je nevyhnutný pre rast, diferenciáciu a funkciu prostaty u cicavcov (Bruchovsky *et al.*, 1968; Rizner *et al.*, 2003). Inaktiváciu 5 α -DHT zabezpečujú izoforma 1 a 2 enzýmu 3 α -HSD a izoformy enzýmu 3 β -HSD, ktoré konvertujú 5 α -DHT na slabé androgény

3 α a 3 β -androstándioly. Spätnú konverziu 3 α -androgénu na 5 α -DHT (androstanolón) zabezpečuje izoforma 3 enzýmu 3 α -HSD (Hsing, 2001). Modifikáciou molekuly testosterónu tak dochádza k účinnej regulácii jeho účinku v tkanive, a preto je zjavne, že vzájomná súhra týchto aktivačných a inaktivačných enzýmov v tkanivách má významný vplyv na výsledný androgénny efekt. Veľký význam sa taktiež pripisuje úlohe aromatázy pri konverzii androgénov na estrogény v periférnych tkanivách napr. v tukovom tkanive a kostiach žien po menopauze a u mužov v období staroby (Simpson *et al.*, 2002). DHEA okrem toho, že slúži ako prekursor pohlavných hormónov, je v pečeni hydroxylovaný cytochrómom P450-7B1 na 7 α -hydroxy-DHEA (Schwarz *et al.*, 1997). V posledných rokoch sa venuje veľká pozornosť práve DHEA a jeho 7-hydroxylovaným derivátom, keďže po podaní DHEA a jeho sulfátov bol pozorovaný anti-arterosklerotický, anti-kancerogénny, neuroprotektívny a anti-glukokortikoidný účinok. Predpokladá sa, že práve 7 α -hydroxy-DHEA, ako aj 7-oxo-DHEA a 7 β -hydroxy-DHEA vznikajúce zo 7 α -hydroxy-DHEA účinkom enzýmu 11 β -HSD1, sprostredkovávajú účinky DHEA na tkanivá (Muller *et al.*, 2006; Hampl *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2003).

2.3.2. Estrogény a progestíny

Podobne ako u cicavcov, sú aj u necicavčích druhov produktom vaječníkov estrogény (C₁₈ steroidy) a progestíny (C₂₁ steroidy), avšak úloha týchto hormónov v reprodukcii je často veľmi odlišná. U väčšiny necicavčích druhov tak C₁₈ steroidy regulujú proces tvorby vaječného žĺtka, kým C₂₁ steroidy zohrávajú významnú úlohu pri praskaní folikulov počas dozrievania oocytov (Chester-Jones, 1987).

Ako už bolo spomínané v predchádzajúcom texte, u kruhoústych rýb sa s klasickými steroidnými hormónmi, progesterónom, testosterónom a estradiolom, stretávame len vo veľmi nízkych plazmatických koncentráciách. Estrogény a progestíny sú u týchto živočíšnych druhov najčastejšie prítomné v podobe 15 α a 15 β -hydroxylovaných derivátov (Kime a Callard, 1982; Kime a Rafter, 1981; Lowartz *et al.*, 2003). U sliznatiek prevažuje pri ovariálnej syntéze steroidných hormónov 6 β a 7 α -hydroxylácia a 5 α -redukcia (Kime *et al.*, 1980). Zdá sa preto pravdepodobné, že u kruhoústych rýb klasické pohlavné hormóny funkciou zastupujú predovšetkým ich 15 α -hydroxylované deriváty. Doposiaľ však neboli nájdené receptory týchto hormónov.

2.3.2.1. Ryby

Medzi hlavné progestíny kostnatých rýb patria progesterón a $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnén-3-ón ($17\alpha,20\beta$ -dihydroxyprogesterón) a hlavnými estrogénmi sú estrón a 17β -estradiol (Chester-Jones, 1987). Sezónny nárast plazmatickej koncentrácie estradiolu u samíc sa považuje za účinný stimulátor syntézy prekursora proteínov vaječného žltka - vitelinogénu v pečeni. Počas reprodukčného cyklu jeho koncentrácia dosahuje extrémne vysoké hodnoty v porovnaní s cicavcami (Callard *et al.*, 1978). Progesterón je hormón, ktorý má u cicavcov predovšetkým význam v období tehotenstva, avšak u rýb hlavne slúži ako prekursor pre vznik iných pregnánových derivátov, ktoré účinkujú ako hormóny počas dozrievania oocytov v období pred trením. Najdôležitejším z týchto derivátov u rýb je $17\alpha,20\beta$ -dihydroxyprogesterón ($17\alpha,20\beta$ -DHP) (Miura *et al.*, 1991), ktorý bol u *Salmonideae* identifikovaný ako feromón a maturáciu indukujúci (maturačný) hormón (Nagahama *et al.*, 1985). Táto japonská výskumná skupina o rok neskôr vytvorila model biosyntézy $17\alpha,20\beta$ -DHP vrstvami buniek vaječníkových folikulov. Podľa tohoto modelu vrstva thekálnych buniek exprimuje cytochróm P450_{SCC}, a tak syntetizuje 17α -hydroxyprogesterón, ktorý je následne redukovaný na $17\alpha,20\beta$ -DHP enzýmom 20β -HSD prítomným v bunkách granulóznej vrstvy (Young *et al.*, 1986). Zaujímavé je, že tento hormón nie je aktívnym progestínom u vtákov ani u cicavcov, pretože na rozdiel od rýb, u nich 17α -hydroxylácia progesterónu znižuje jeho afinitu k receptoru na 1% pôvodnej afinity (Smith *et al.*, 1974). Vysoké hladiny tohto derivátu boli taktiež zistené u samcov rýb, u ktorých okrem iného stimuluje expresiu enzýmu 11β -HSD2, ktorý reguluje syntézu hlavného androgénu 11-ketotestosterónu rýb, a tiež môže prispievať k ochrane gonád pred vysokými koncentraciami glukokortikoidu kortizolu (Ozaki *et al.*, 2006). Na rozdiel od lososovitých rýb, bol ako hlavný derivát progesterónu vo vaječníkoch, semenníkoch a spermiiach kaprovitých rýb identifikovaný $17\alpha,20\alpha$ -DHP, ktorý je, na rozdiel od $17\alpha,20\beta$ -DHP, výrazne slabším feromónom a má tiež významne slabšie maturačné účinky (Canario a Scott, 1990; Sorensen a Scott, 1994). U samcov lososovitých rýb bola syntéza $17\alpha,20\beta$ -DHP zo 17α -hydroxyprogesterónu obmedzená len na gonády, avšak u kaprovitých bola významná tvorba $17\alpha,20\alpha$ -DHP nameraná aj mimo pohlavných orgánov, a to v srdci, oku, svalu a krvi (Ebrahimi *et al.*, 1996). U niektorých zástupcov kostnatých rýb bol tento progestín vaječníkmi ďalej metabolizovaný na 5β -redukované deriváty, alebo 21 -hydroxyláciou dochádzalo k tvorbe 11-deoxykortikosterónu a 11-deoxykortizolu. Pre porovnanie, u cicavcov dochádza k 21 -hydroxylácii cytochrómom P-450_{C21} takmer výhradne v nadobličkách, len ojedinele v pohlavných orgánoch. Podobne ako u kostnatých rýb, dochádza aj u ostatných

necicavčích skupín živočíchov k 20β -redukcií progesterónu, na rozdiel od cicavcov, u ktorých je hlavným epimérom metabolizmu progesterónu 20α -progesterón (Chester-Jones, 1987).

2.3.2.2. Obojživelníky

Obojživelníky sú charakteristické prítomnosťou estradiolu, progesterónu a testosterónu ako hlavných steroidných hormónov vaječníkov. Kvôli vysokým koncentráciám testosterónu produkovaným vaječníkmi samíc obojživelníkov sa predpokladá, že by progesterón mohol svoje účinky na maturáciu oocytov vykonávať prostredníctvom konverzie na testosterón (Chester-Jones, 1987). Vo vaječníkoch dochádza okrem toho, k tvorbe 21-hydroxylovaných pregnánov (ako sú 11-deoxykortikosterón a 11-deoxykortizol) z progesterónu, pričom koncentrácia týchto derivátov dosahuje koncentrácie androgénov (Colombo *et al.*, 1977). Konverzia progesterónu na $17,20\beta$ -dihydroprogesterón a androsténdión, môže poskytovať účinný spôsob regulácie lokálnej koncentrácie progesterónu, ktorý má z týchto progestínov najsilnejšie maturačné účinky (Chester-Jones, 1987). U samcov sú významným zdrojom progesterónu semenníky. To platí predovšetkým pre obdobie mimo párenia, keďže vtedy prevláda v biosyntéze testosterónu u žiab 4-én cesta (Canosa *et al.*, 2003).

2.3.2.2. Plazy

Medzi hlavné steroidné hormóny vaječníkov plazov patria estradiol, testosterón a progesterón. Podobne ako u rýb a obojživelníkov, bola aj u plazov pozorovaná tvorba 21-hydroxylovaných derivátov 11-deoxykortikosterónu a 11-deoxykortizolu, ako aj 5β -redukovaných pregnánových derivátov vaječníkmi *in vitro*. Tieto deriváty však neboli doposiaľ identifikované v krvnej plazme. Nebola určená ani ich biologická funkcia u plazov, hoci u pregnenolónu sa predpokladá regulačná funkcia pri dostupnosti aktívneho progesterónu pre receptory. Estradiol plazov má podobne ako u rýb a obojživelníkov funkciu v procese tvorby vaječného žltka, kým progesterón u živozodých plazov vykazuje zmenu svojej funkcie z hormónu regulujúceho maturáciu oocytov k hormónu pre kontrolu tehotenstva, podobne ako je tomu u cicavcov (Chester-Jones, 1987).

2.3.2.3. Vtáky

Na rozdiel od cicavcov, má na ontogenetický vývin pohlavného správania a sexuálnych charakteristík jedinca u vtákov dominantný vplyv demaskulinizujúci (feminizačný) účinok estradiolu sekretovaného vaječníkmi (Schlinger, 1998). Grafové folikuly vtákov vo fáze tvorby vaječného žltka a počas zretia produkujú zvyšujúce sa množstvo estradiolu, pričom sekrécia

estradiolu a aktivita aromatázy sú najvyššie v období medzi tretím a štvrtým rádom zretia folikulu (Chester-Jones, 1987). Arcos *et al.* (1975) po prvý krát izolovali z vaječnikov morky domácej okrem hlavných pohlavných hormónov aj 20-hydroxyprogesterón a 17-hydroxyprogesterón. Bunky „theca interna“ preovulačných folikulov sú známe sekréciou progestínov a androgénov, ale nie estrogénov, kým bunky „theca externa“ syntetizujú predovšetkým estrogény (Velázquez *et al.*, 1991). V roku 1996 Rodriguez-Maldonado *et al.*, zaznamenali pri inkubácii buniek „theca interna“ preovulačných folikulov kura domáceho vysokú konverziu progesterónu na 20 β -hydroxyprogesterón, zatiaľ čo DHEA bol metabolizovaný na androsténdión a následne na estrón. Výsledky týchto pokusov dokazujú prítomnosť enzýmov 20 β -HSD, 3 β -HSD/ Δ^{5-4} izomerázy, 17 β -HSD a aromatázy v preovulačných folikuloch. Podobne, Tsutsiu *et al.*, (2006) dokázali prítomnosť mnohých steroidogénnych enzýmov (P-450_{SCC}, 3 β -HSD, P-450_{C17}, 17 β -HSD) v mozgu sliepok. Vo svojich pokusoch zaznamenali produkciu pregnenolónu, progesterónu, 5 β -tetrahydroprogesterónu, androsténdiónu, testosterónu a estradiolu z cholesterolu, čím dokázali *de novo* syntézu steroidov v mozgu vtákov. Okrem toho pozorovali aj tvorbu 7 α -hydroxypregnenolonu, doposiaľ nepopísaného neurosteroidu u vtákov.

2.3.2.4. Cicavce

Metabolizmu progesterónu a estrogénov u cicavcov sa na rozdiel od necicavčích druhov v minulosti venovalo omnoho viac pozornosti. Na metabolizme estrogénov sa podieľajú izoformy 1, 2, 4 a 5 enzýmu 17 β -HSD. Izoformy 1 a 5 konvertujú v tkanivách slabý estrogén estrón na 17 β -estradiol so silnými estrogénnymi účinkami, zatiaľ čo izoformy 2 a 4 zabezpečujú spätnú konverziu a tým inaktiváciu 17 β -estradiolu (Reed *et al.*, 1991; Day *et al.*, 2006; Labrie *et al.*, 1997). Na obsadenie progesterónového receptora v tkanivách cicavcov vplývajú predovšetkým enzýmy s 20-reduktázovou aktivitou, ktoré metabolizujú aktívny progestín, progesterón, na slabý progestín 20 α -hydroxyprogesterón. Enzýmom zodpovedným za túto redukciu je 20 α /3 β -HSD (Penning *et al.*, 2000) a izoforma 5 enzýmu 17 β -HSD s vysokou 20 α -dehydrogenázovou aktivitou (Dufort *et al.*, 1999). Enzýmom zabezpečujúcim spätnú reakciu, a tým tvorbu progesterónu z 20 α -redukovaného derivátu, je pravdepodobne izoforma 2 17 β -HSD (Wu *et al.*, 1993). Veľký význam sa tiež pripisuje úlohe aromatázy pri konverzii C₁₉ steroidov na estrogény v periférnych tkanivách napr. v tukovom tkanive a kostiach žien po menopauze a u mužov v období staroby (Simpson *et al.*, 2002).

Výsledky týchto a mnohých ďalších prác z oblasti metabolizmu pohlavných hormónov u cicavcov poukazujú na prítomnosť vždy minimálne páru steroidných dehydrogenáz

zodpovedných za reguláciu dostupnosti pohlavných hormónov pre ich receptory. Zjavný je aj náznak prítomnosti podobných párov dehydrogenáz u necicavčích druhov, avšak stále existuje len málo prác venujúcich sa tejto problematike.

2.3.3. Glukokortikoidy a mineralokortikoidy

U vyšších skupín stavovcov sa stretávame s presne definovanými skupinami glukokortikoidných a mineralokortikoidných hormónov. U nižších skupín stavovcov sa však podobne ako tomu bolo u pohlavných hormónoch, stretávame s tým, že napr. u rýb glukokortikoidy nahradzujú vo funkcii mineralokortikoidy. Pomenovanie glukokortikoidu alebo mineralokortikoidu pre určitý hormón preto nemusí byť univerzálne platné. Dôležitejšiu úlohu pri určovaní biologickej odpovede na steroidný hormón v týchto prípadoch skôr hrajú typy prítomných receptorov než typy samotných hormónov (Chester-Jones, 1987).

Sledovaniu hladín kortikosteroidov u *Cyclostomata* sa v minulosti venovalo len veľmi málo prác. Weisbart *et al.* v roku 1980 namerali v krvnej plazme mihulí a sliznatiek veľmi nízke koncentrácie kortizolu a kortikosterónu. Hlavným identifikovaným steroidom bol 11-dehydrokortikosterón. Keďže však u tejto skupiny živočíchov bola dokázaná prítomnosť 7 α -, 6 β -, 15 β -, 15 α -hydroxyláz a 5 α -reduktázy (Kime a Rafter, 1981), je pravdepodobné, že kortikosteroidy sú, podobne ako pohlavné hormóny, prítomné v doposiaľ neidentifikovaných 7 α -, 6 β -, 15 β -, 15 α -hydroxylovaných alebo 5 α -redukovaných derivátov.

Žraloky a raje sú charakteristické prítomnosťou nízkych až nezistiteľných koncentrácií kortikosterónu, kortizolu a 11-dehydrokortikosterónu. Ich krvná plazma však obsahuje unikátny metabolit kortikosterónu, 1 α -hydroxykortikosterón, ktorého úloha v organizme nie je presne objasnená. Predpokladá sa však, že účinkuje ako mineralokortikoid (Kime *et al.*, 1977).

2.3.3.1. Ryby

Kortizol predstavuje najčastejší cirkulujúci kortikosteroid u kostnatých rýb a je hlavným produktom inter-renálnych žliaz, ktoré sú analógom kôry nadobličiek cicavcov. Táto skupina stavovcov nie je schopná syntézy aldosterónu, keďže nedisponuje enzýmom aldosterón syntáza, potrebným pre posledný krok v biosyntéze tohto hormónu (Chester-Jones, 1987). Kortizol vykazuje u rýb glukokortikoidnú aktivitu a je považovaný za hlavný hormón nevyhnutný pre adaptáciu na život v slanej vode (Foskett *et al.*, 1983). Krvná plazma rýb okrem toho obsahuje vysoké koncentrácie steroidov 11-deoxykortizolu

a 11-deoxykortikosterónu, dosahujúce koncentráciu kortizolu (Campbell *et al.*, 1980). Pomerne nedávno boli u pstruha identifikované dva glukokortikoidné a dva mineralokortikoidné receptory (Bury *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2005). Keďže sa v pokusoch 11-deoxykortikosterón javí ako účinnejší agonista MR než kortizol, dá sa predpokladať, že 11-deoxykortikosterón by mohol predstavovať fyziologický ligand pre MR u rýb (Sturm *et al.*, 2005). Tento predpoklad podporuje aj naklonovanie enzýmu 11 β -HSD2 u rýb. Okrem tvorby hlavného androgénu rýb, 11-ketotestosterónu, je 11 β -HSD2 schopný aj oxidácie kortizolu na slabý glukokortikoid kortizón, a tak zabezpečovať ochranu vyvíjajúcich sa gonád pred inhibičnými účinkami vysokých plazmatických koncentrácií kortizolu (Kusakabe *et al.*, 2003). 11 β -HSD2 by tak mohol, podobne ako u cicavcov, brániť väzbe kortizolu s MR a tak umožňovať špecifickú väzbu 11-deoxykortikosteroidov, ako je 11-deoxykortikosterón, s týmto receptorom u rýb (Sturm *et al.*, 2005). Fyziologický význam 11-deoxykortikosterónu u rýb však dodnes nie je presne objasnený.

S prechodom a adaptáciou stavovcov na život na súši, došlo k zmenám endokrinného systému, s oddelením inter-renálnych žliaz od obličiek a postupným vývojom nadobličiek typických pre cicavce. Najdôležitejšou zmenou však bolo objavenie sa aldosterónu ako hlavného mineralokortikoidu. Hlavným glukokortikoidom obojživelníkov, plazov a vtákov je kortikosterón. Cicavce sú charakteristické predovšetkým prítomnosťou kortizolu, len u niekoľkých skupín cicavcov, napríklad niektoré hlodavce, je to kortikosterón (Chester-Jones, 1987). Enzým 11 β -HSD2, prítomný už u rýb, ale plniaci u nich predovšetkým funkciu v metabolizme androgénov, u ostatných skupín stavovcov stráca túto funkciu. Ponecháva si však schopnosť metabolizovať aktívne glukokortikoidy na neaktívne 11-dehydroderiváty. Týmto spôsobom môže enzým 11 β -HSD2, prítomný v rôznych mineralokortikoidných cieľových tkanivách, zabezpečovať špecifickú väzbu aldosterónu s MR aj pri vysokých koncentráciách glukokortikoidov (Baker, 2004). Schopnosť enzýmu 11 β -HSD2 inaktivovať glukokortikoidy a pritom nemetabolizovať aldosterón je kľúčová pre účinok aldosterónu v mineralokortikoidných tkanivách, napríklad v distálnom tubule obličiek, v ktorých aldosterón pôsobí cez MR.

2.3.3.2. Obojživelníky

Už v roku 1989, Gaeggeler *et al.*, ako prvý zistili, že po aplikácii aldosterónu, alebo kortikosterónu na mukóznú stranu močového mechúra žiab došlo k stimulácii transportu sodíkových iónov, avšak nie po aplikácii kortikosterónu na seróznú stranu. Pri použití

kortikosterónu spolu s karbenoxolonom, účinným inhibítorom enzýmu 11 β -HSD, dosiahli aj po aplikácii kortikosterónu na seróznú stranu rovnaký mineralokortikoidný efekt ako po aplikácii aldosterónu. Výsledky tohto pokusu poukazujú na prítomnosť enzýmu 11 β -HSD v močovom mechúre žiab a na jeho dôležitú úlohu v ochrane MR pred väzbou s glukokortikoidmi a pri regulácii vstrebávania vody a iónov sodíka (Brem *et al.*, 1989). Títo autori tiež zistili inhibičný účinok 11-dehydroderivátu kortikosterónu na aldosterónom vyvolaný skratovací prúd. Kortikosterón predstavoval silný inhibítor reprodukčného správania v období akútneho stresu u obojživelníkov (Moore *et al.*, 2005a). K inhibičnému účinku kortikosterónu pravdepodobne dochádzalo inhibíciou aktivity adrenálneho enzýmu Δ^5 -3 β -HSD a testikulárnej 17 β -HSD s následným poklesom plazmatickej koncentrácie testosterónu (Biswas *et al.*, 2000). Denari a Ceballos (2005) okrem toho poukazujú na to, že na tieto inhibičné účinky kortikosterónu môžu mať u žiab významný vplyv sezónne zmeny v expresii enzýmu 11 β -HSD2.

2.3.3.3. Vtáky

Hlavným glukokortikoidom vtákov je kortikosterón a jeho metabolizmus sa pomerne výrazne líši od metabolizmu u cicavcov. Už v roku 1978, Butler *et al.*, dokázali prítomnosť enzýmu 11 β -HSD v nosných, Harderianových a slzných žľazách kačíc (*Anas platyrhynchos*), kedy zaznamenali *in vitro* konverziu kortikosterónu na 11-dehydrokortikosterón. DiBattista *et al.* (1989) zistili že, počas inkubácie buniek sliznice hrubého čreva s kortikosterónom, sa tento steroid neviazal s GR, ale bol konvertovaný na 20 β -hydroxykortikosterón. Počas experimentu, 20 β -hydroxykortikosterón nekompetoval s aldosterónom o väzbové miesta, čo naznačovalo, že 20 β -hydroxykortikosterón sa neviazal s MR. Na základe týchto výsledkov autori po prvý krát poukázali na možný význam redukcie kortikosterónu na uhlíku 20 pri ochrane MR pred nešpecifickou väzbou s kortikosterónom. Podrobnejšiemu štúdiu 20-redukcie u vtákov sa však nevenovala pozornosť až do roku 1998, kedy Vylitova *et al.*, sledovali metabolizmus kortikosterónu v segmentoch hrubého a tenkého čreva vtákov (*Gallus gallus*). V čreve kura domáceho, okrem enzýmu 11 β -HSD2, opäť potvrdili aj prítomnosť 20-HSD. Kortikosterón bol metabolizovaný na 20-dihydrokortikosterón a 11-dehydrokortikosterón na 11-dehydro-20-dihydrokortikosterón. V prítomnosti NAD⁺/NADP⁺ kofaktorov bol kortikosterón metabolizovaný na 11-dehydrokortikosterón, kým pri použití kofaktoru NADPH na 20-dihydrokortikosterón a 11-dehydro-20dihydrokortikosterón. Aktivita enzýmu zodpovedného za 20-redukciu kortikosterónu bola približne rovnaká vo všetkých segmentoch čreva a nekorelovala s citlivosťou jednotlivých častí čreva k mineralokortikoidom. Z ich

výsledkov ďalej vyplýva, že kortikosterón je pri nanomolárnych koncentráciách metabolizovaný predovšetkým enzýmom 11β -HSD2, zatiaľ čo pri mikromolárnych koncentráciách substrátu prevládajú 20-dihydroderiváty kortikosterónu (Vylitova *et al.*, 1998). Metabolizmus kortikosterónu v iných tkanivách vtákov však nebol dodnes preskúmaný.

2.3.3.4. Cicavce

Metabolizmus kortikoidných hormónov je u cicavcov veľmi podrobne preskúmaný. Glukokortikoid kortizol, alebo kortikosterón (prítomný u skupiny hlodavcov), sa viažu s MR s rovnakou afinitou ako aldosterón a zároveň s vyššou afinitou než aldosterón s GR. Špecifickosť väzby aldosterónu s MR za týchto podmienok zabezpečuje už spomínaný enzým 11β -HSD2, ktorý inaktivuje kortizol na kortizón (alebo u hlodavcov kortikosterón na 11-dehydrokortikosterón) a tak znižuje jeho afinitu k MR až o 99,7% (Edwards, 1990; Funder, 1999). Najvyššia aktivita tohto enzýmu bola nameraná v tkanivách zúčastňujúcich sa transportu sodíkových iónov, ako sú distálne tubuly obličiek, hrubé črevo a slinné žľazy, kde zabezpečuje špecifický účinok aldosterónu v regulácii vstrebávania vody a iónov aj za podmienok, kedy koncentrácia glukokortikoidov v krvnej plazme často 100-krát presahuje koncentráciu aldosterónu (Funder 1988; Krozowski 1999). U placentárnych cicavcov expresia tohto enzýmu v placentе zabezpečuje kontrolu prístupu vysokých koncentrácií glukokortikoidov z krvi matky do plodu (Seckl *et al.*, 2000). Prítomnosť 11β -HSD2 v tkanivách ktoré nepatria medzi klasické miesta účinku aldosterónu, ako sú pľúca, lymfatické uzliny a steny krvných ciev, poukazuje na jeho funkciu v modulácii účinku glukokortikoidov v týchto tkanivách (Stewart a Krozowski, 1999). Spätnú aktiváciu glukokortikoidov a tým amplifikáciu glukokortikoidného účinku v tkanivách exprimujúcich GR, zabezpečuje izoforma 1 enzýmu 11β -HSD (11β -HSD1). Tento enzým redukuje 11-dehydroderiváty glukokortikoidov v mnohých nemineralkortikoidných tkanivách, ako sú pečeň, tukové tkanivo a centrálny nervový systém, späť na aktívne formy, čím hra významnú úlohu v regulácii metabolizmu týchto tkanív u cicavcov (Sandeep a Walker, 2001).

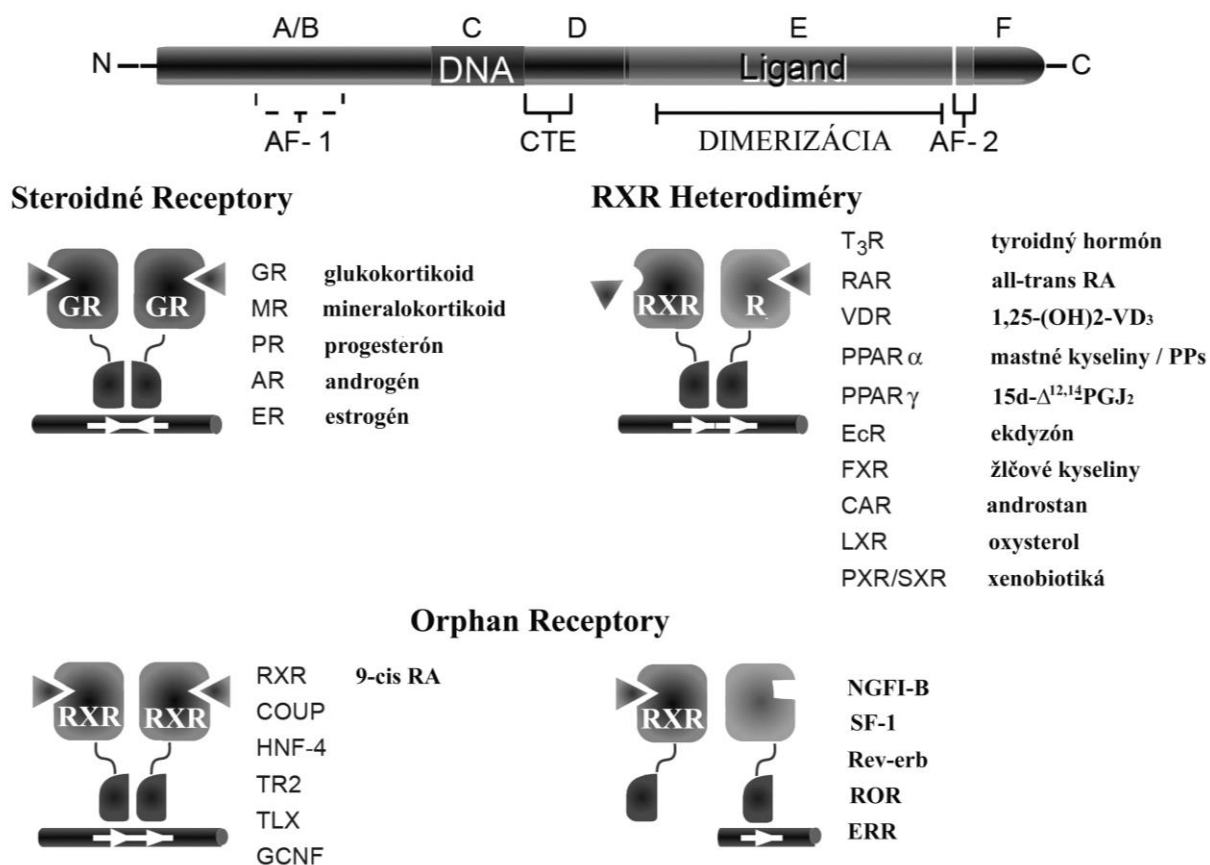
V **tabuľka 3** sú uvedené hlavné skupiny stavovcov a steroidné hormóny produkované vaječníkmi, semenníkmi, inter-renálnymi žľazami a obličkami. I keď sa jedná o tabuľku pochádzajúcu z literárneho zdroja starého približne 20 rokov (Chester-Jones, 1987), dodnes je jedinou v dostupnej literatúre, ktorá poskytuje takýto kompletný a ucelený prehľad.

	Vaječníky	Semenníky	Inter-renálne žľazy / obličky		
			F (0,1)	B (0,05-0,3)	(+?)
Cyklostomata	E2 (?) (6 β 7 α , 15 T)	T (0-4) (6 β 7 α , 15 T)	F (0,1)	B (0,05-0,3)	(+?)
Elasmobranchia	E2 (40), T (6)	T (2-10)	-	-	1 α B (1-140)
Teleostei	E2 (2-40), T (2-200), 17,20 β P (200-400)	T (1-50), KT/ β T (5- 100)	F/E (100-400)	-	-
Urodele	E2 (2), T (5-15), Prog (4- 30)	T (10-50), β T (16), DHT (2-50)	-	?	-
Anura	E2 (1-10), T (5-15), Prog (4)	T (2-50), DHT (1-10)	-	B (10-100)	Aldo (2-160)
Reptilia	E2 (1), T (5), Prog (1-5)	T (10-40)	-	B (10-100)	Aldo (1-50)
Aves	E2 (0,5), T (2), Prog (6)	T (1-40)	-	B (10-100)	Aldo (0,1-1)
Mammalia	E2 (0,1), Prog (1-20)	T (1-10)	F/B (50-200)	B (10-100)	Aldo (0,2)

Tabuľka 3. Plazmatické koncentrácie steroidných hormónov vaječníkov, semenníkov a inter-renálnych žliaz u stavovcov. Plazmatické koncentrácie sú uvedené v zátvorkách a vyjadrené v ng/ml. E2 = estradiol, T = testosterón, Prog = progesterón, KT = 11-ketotestosterón, β T = 11 β -hydroxytestosterón, DHT = 5 α -dihydrotestosterón, B = kortikosterón, F = kortizol, Aldo = aldosterón, 1 α B = 1 α -hydroxykortikosterón (Chester-Jones, 1987).

2.4. RECEPTORY STEROIDNÝCH HORMÓNOV

Receptory steroidných hormónov patria do super-rodiny jadrových receptorov, ktorá predstavuje jednu z najväčších skupín regulátorov transkripcie u mnohobunkových živočíchov. Do tejto super-rodiny patria aj receptory pre iné hydrofóbne molekuly ako sú retínové kyseliny (trans a 9-cis izoformy), tyroidné hormóny, mastné kyseliny, leukotriény a prostaglandíny (Escriva *et al.*, 2000) (**obrázok 11**). Spoločne sa zúčastňujú regulácie rôznorodých procesov, ako sú napríklad pohlavná diferenciácia, regulácia metabolizmu, metamorfóza hmyzu, regulácia embryonálneho vývinu a vývinu končatín u stavovcov. Prvými zástupcami tejto skupiny receptorov boli identifikovaní biochemicky ako receptory



Obrázok 11. Štruktúrna a funkčná organizácia super-rodiny jadrových receptorov. Prítomných je šesť domén (A-F) s konzervovanou sekvenciou a funkciou: DBD= DNA viažuca doména (oblasť C), LBD= ligand viažuca doména (oblasť E), variabilná slučka (oblasť D), variabilná N-terminálna oblasť (A/B) obsahujúca ampF-I aktivačnú funkciu. Väčšina receptorov ďalej obsahuje variabilnú C-terminálnu oblasť (oblasť F), ktorej úloha nie je dostatočne preskúmaná. Aminokyseliny zúčastňujúce sa na dimerizácii receptorov sú prítomné v DBD a LBD doménach (Olefsky, 2001).

steroidných a tyroidných hormónov a až následným klonovaním týchto receptorov sa zistilo, že predstavujú skupiny blízko príbuzných proteínov (Sluder *et al.*, 1999).

Ďalší zástupcovia boli identifikovaní na základe sekvenčnej podobnosti so známymi členmi super-rodiny, predovšetkým podľa prítomnosti konzervovaného DNA-viažuceho motívu (Mangelsdorf a Evans, 1995). Túto super-rodinu v roku 1999 tvorilo viac ako 400 naklonovaných sekvencií získaných z viac ako 60 živočíšnych druhov, predstavujúcich prinajmenšom 70 rôznych jadrových receptorov (Sluder *et al.*, 1999). V kompletnom génome drozofily ich bolo identifikovaných 21 (Adams *et al.*, 2000), u človeka 48 (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001) a až 270 u *Caenorhabditis elegans*, zástupcu hlístovcov (Sluder *et al.*, 1999). Jadrové receptory účinkujú ako ligandom aktivované transkripčné faktory, a tak poskytujú priame spojenie medzi signálnou molekulou a transkripčnou odpoveďou. Pre mnohé z identifikovaných receptorov nie je dodnes známy žiadny ligand a patria do skupiny jadrových orfán receptorov (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). Jadrové receptory fungujú ako spínače, ktoré spúšťajú špecifické genetické programy, ktoré napríklad vedú k bunkovej diferenciácii, proliferácii, apoptóze, či regulácii homeostázy. Po aktivácii správnym ligandom regulujú expresiu primárnych a sekundárnych cieľových génov. Význam jadrových receptorov vo vývine organizmu dokumentujú mnohé pokusy s „knock-out“ živočíšnymi modelmi, u ktorých „knock-out“ niektorého z jadrových receptorov spôsobí smrť v skorých obdobiach vnútromaternicového vývinu, alebo tesne po narodení (Mascrez *et al.*, 1998; Beato *et al.*, 1995).

Základné schéma signalizácie hormónu cez jadrový receptor pozostáva zo signálu (môže byť endokrinný, parakrinný, autokrinný alebo dokonca intrakrinný), transportu tohto signálu do periférnych orgánov a väzby na príslušný receptor s jeho následnou aktiváciou. Všetky jadrové receptory zdieľajú podobnú štruktúrnú organizáciu tvorenú centrálnou umiestnenou, pomerne vysoko konzervovanou DNA-viažucou doménou (DBD), známou tiež ako C-doména; variabilnou doménou na N-konci (A/B doména) a stredne konzervovanou ligand-viažucou doménou na C-konci molekuly. Aktivované receptory sa viažu so špecifickými DNA sekvenciami, zvanými „hormone response elements“ (HRE) a to buď v podobe homo- alebo heterodiméru (Escriva *et al.*, 2000). Receptory steroidných hormónov sa vo všeobecnosti viažu so svojimi HRE v podobe homodiméru, kým receptory retinových kyselín (RAR, RXR), tyroidné receptory (TR) a receptory pre vitamín D (VDR) vytvárajú po naviazaní ligandu buď homo- alebo heterodiméry (Germain *et al.*, 2003).

2.4.1. Kortikoidné receptory - mineralokortikoidný receptor

Hlavnou úlohou hormónu aldosterónu je zvyšovať resorpciu sodíkových iónov v epiteloach ako je napríklad epitel distálnych častí nefrónu, alebo hrubého čreva. Jeho účinky sú sprostredkované cez MR, ktorý patrí do super-rodiny jadrových receptorov. U cicavcov, ako aj u nižších skupín stavovcov, boli v bunkách identifikované dva typy väzbových miest pre aldosterón: vysokoafinitné miesto, typ 1, s K_d približne 0,5-2 nmol/l, a nízkoafinitné miesto, typ 2, s K_d približne 14-60 nmol/l. Tieto väzbové miesta boli následne pomenované ako MR a GR (Claire *et al.*, 1978). GR a MR sú navzájom blízko príbuzné a vykazujú až 57 % sekvenčnú homológiu ligand väzujúcej domény. MR po naviazaní aldosterónu reguluje transkripciu viacerých génov, čo vedie k aktivácii biosyntézy epiteliálnych sodíkových kanálov ENaC a Na^+/K^+ -ATP-ázy. Je známe, že MR má k aldosterónu podobnú afinitu ako ku glukokortikoidom (10^{-10} – 10^{-9} M), ktorých koncentrácia v krvnej plazme často 100 - 1000-krát presahuje koncentráciu aldosterónu (Farman *et al.*, 2001). Za týchto podmienok by mal byť MR *in vivo* neustále obsadený glukokortikoidmi a permanentne stimulovať vstrebávanie iónov sodíka. Pôvodne sa predpokladalo, že špecificitu väzby aldosterónu s MR za týchto podmienok zabezpečuje CBG „kortikosteroid binding globulín“, ktorý viaže kortizol a kortikosterón s vysokou afinitou a kapacitou, a tak znižuje cirkulujúce voľné koncentrácie týchto hormónov. Neskoršie sa však zistilo, že špecificitu účinku aldosterónu za týchto podmienok zabezpečujú enzýmy 11 β -HSD2 u cicavcov a 20 β -HSD u vtákov. Tieto enzýmy lokálne metabolizujú aktívne glukokortikoidy na 11-dehydro- a 20-dihydro-deriváty (Funder *et al.*, 1988; DiBattista *et al.*, 1989; Vylitova *et al.*, 1998). Informácii o afinite vznikajúcich 11-dehydro a 20-dihydro-derivátov k MR však je len veľmi málo. Sandor *et al.*, (1989) sa

ligand	kur	potkan
aldosterón	100	100
11-deoxykortikosterón	28	73
kortikosterón	147	106
kortizol	29	32
11-dehydrokortikosterón	10	N
kortizón	N	N

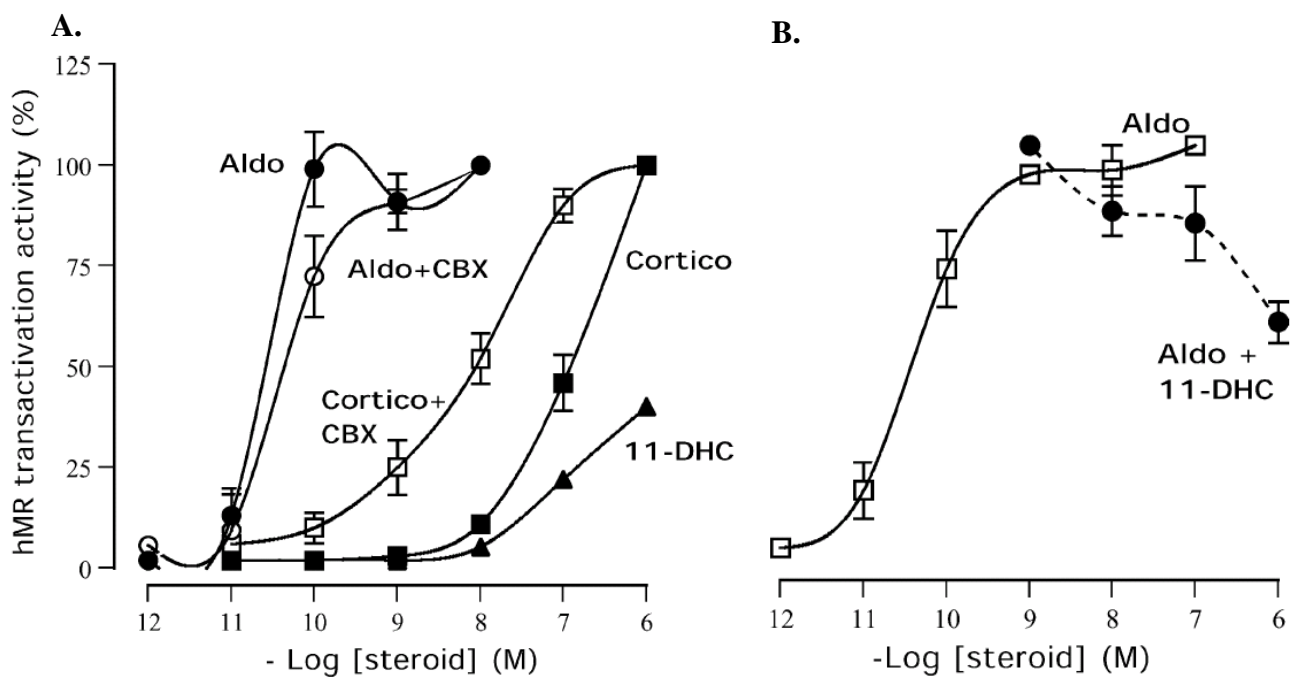
Tabuľka 4. Relatívna afinita k mineralokortikoidnému receptoru v mukóznej časti čreva vzťahnutá k aldosterónu (100 %) (Sandor *et al.*, 1989).

venovali problematike afinity glukokortikoidov a ich 11-dehydroderivátov k MR u kura a potkana (**tabuľka 4**). Afinita 11-dehydrokortikosterónu k MR bola viac ako 10-krát nižšia než u kortikosterónu a aldosterónu; u kortizónu bola dokonca pod hranicou detekcie.

Brem a Morfia, (1993) a Morris *et al.*, (2000) poukázali na možnosť, že 11-dehydrokortikosterón by mohol potláčať anti-nátriuretický efekt aldosterónu v obličke a močovom mechúre žiab, keďže samotný 11-dehydrokortikosterón nemal žiadny vplyv na transport sodíka v týchto tkanivách.

Okrem zmeny afinity substrátov k MR, napríklad enzýmom 11 β -HSD2, majú z hľadiska zachovania špecificity účinku aldosterónu cez MR, tiež veľký význam rozdiely v schopnosti jednotlivých substrátov (aldosterónu, glukokortikoidov a ich derivátov) po väzbe na MR, tento receptor aktivovať (transaktivácia). Niekoľko štúdií sa venovalo tejto problematike. U bunkovej línie C₁₈, odvodenej z buniek obličkových zberných kanálikov potkanov a exprimujúcej ľudský enzým 11 β -HSD2 a MR, bol aldosterón schopný vyvolať 50% transaktiváciu MR už pri koncentrácii 5x10⁻¹¹ M. Za rovnakých podmienok bola v prípade kortikosterónu potrebná koncentrácia 10⁻⁷ M, pričom po inhibícii enzýmu 11 β -HSD2 karbenoxolonom sa táto koncentrácia znížila na 10⁻⁸ M. To znamená, že u kortikosterónu je pri rovnakej afinite k MR pre dosiahnutie rovnakej úrovne aktivácie MR, potrebná niekoľko 100-násobne vyššia koncentrácia než v prípade aldosterónu (Arriza *et al.*, 1988; Hellal-Levy *et al.*, 1999; Lombes *et al.*, 1994; Bocchi *et al.*, 2003).

11-dehydrokortikosterón mal, podobne ako kortikosterón, veľmi nízku schopnosť aktivovať MR a v pokuse (Bocchi *et al.*, 2003) bolo potrebné pre dosiahnutie 30 % z maximálnej aktivácie MR použiť koncentráciu 10⁻⁶ M (**obrázok 12A**). Títo autori tiež sledovali schopnosť 11-dehydrokortikosterónu inhibovať aldosterónom vyvolanú maximálnu aktiváciu MR (pri 10⁻⁹ M aldosteróne) a zistili, že na 50 % inhibíciu bolo potrebné zvýšiť koncentráciu 11-dehydrokortikosterónu až na 10⁻⁶ M. Keďže cirkulujúca koncentrácia 11-dehydrokortikosterónu u človeka nepresahuje 30-50 nM, tak podľa autorov tento substrát pravdepodobne nebude významnejšie interferovať s procesom transaktivácie MR v podmienkach *in vivo* (Brem *et al.*, 1993; Bocchi *et al.*, 2003) (**obrázok 12B**).

**Obrázok 12.**

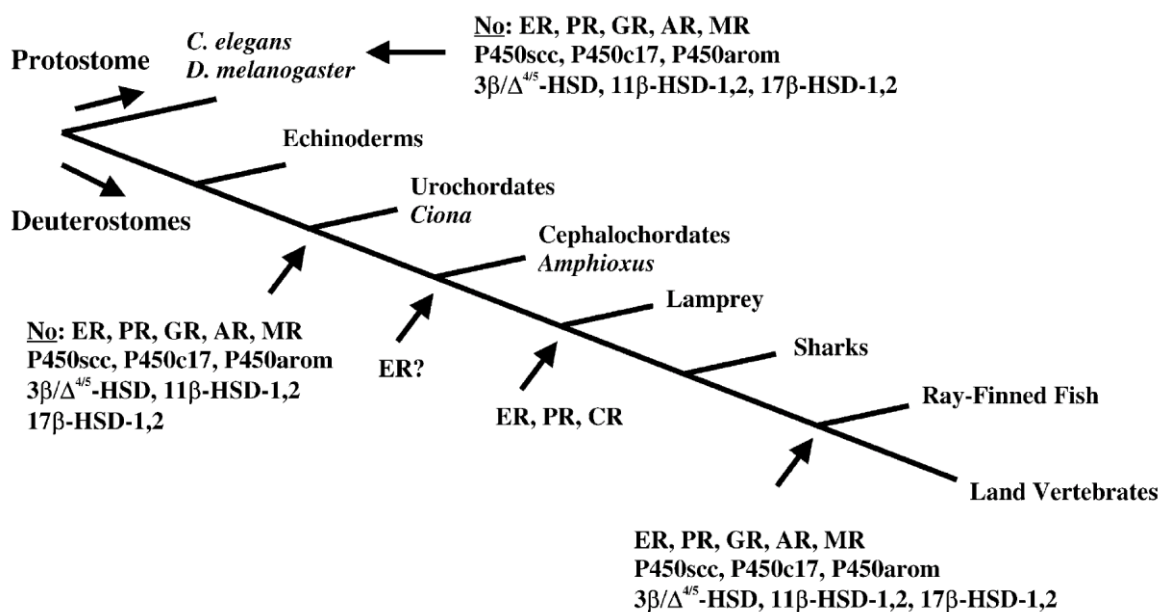
A. Graf znázorňuje schopnosť substrátov aldosterónu (Aldo), kortikosterónu (Cortico) a 11-dehydrokortikosterónu (11-DHC) aktivovať MR v prítomnosti alebo neprítomnosti inhibítora enzýmu 11β -HSD2 karbenoxolonu (CBX).

B. Priebeh inhibície aldosterónom vyvolanej aktivácie MR zvyšujúcimi sa koncentraciami 11-DHC (Bocchi *et al.*, 2003).

2.4.2. Evolúcia steroidných receptorov

Počiatky evolúcie steroidných receptorov pravdepodobne siahajú až k samým koreňom vzniku stavovcov približne pred 540 miliónmi rokov, 25 - 50 miliónov rokov po objavení sa prvých foriem bezstavovcov (Baker, 2004).

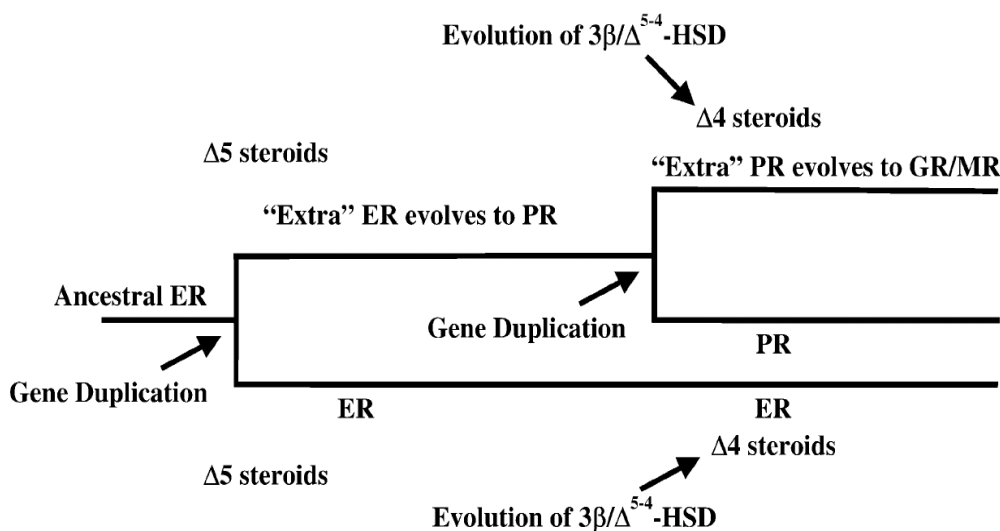
Niekoľko prác z posledných 10 rokov sa venovalo objasňovaniu pôvodu a evolúcie jadrových receptorov. Výsledky rozsiahlych PCR analýz naznačujú, že výskyt jadrových receptorov je špecifický pre stavovce a bezstavovce, pretože doposiaľ nebol žiadny z týchto receptorov nájdený u húb, rastlín a jednobunkových organizmov. Podrobnou analýzou línie živočíchov sa ďalej zistilo, že podskupina receptorov adrenálnych a pohlavných hormónov sa vyskytuje len u stavovcov a nie je prítomná u bezstavovcov (Baker, 1997). O bližšie upresnenie času vzniku receptorov adrenálnych a pohlavných hormónov sa pokúsilo niekoľko výskumných skupín. Thornton, (2001) identifikoval u mihuľe estrogénový, progesterónový a kortikoidný receptor, avšak nepodarilo sa mu dokázať AR, MR a GR receptora, z čoho usudzuje, že tieto receptory pravdepodobne vznikli až v neskoršom období génovou



Obrázok 13. Fylogenetický vývoj steroidných receptorov. Adrenálne a pohlavné hormóny sa po prvý krát objavili u chordát. U kostnatých rýb sú prítomné receptory adrenálnych a pohlavných hormónov, steroidogénne enzýmy ako aj enzýmy inaktivujúce tieto hormóny. Porovnaním genómu *Ciona intestinalis* so sekvenciami cicavcov bolo zistené, že *Ciona* nemá gény kódujúce receptory adrenálnych a pohlavných hormónov a mnohé z kľúčových enzýmov biosyntézy steroidných hormónov. Zdá sa preto, že predchodca steroidných receptorov sa po prvý krát objavil u zástupcov *Cephalochordata* ako je *Amphioxus* (Baker, 2004).

duplikáciou v línii vedúcej k čeľuštňatcom. Dehal *et al.*, (2002) a Baker, (2003) zistili, že plášťovec *Ciona intestinalis* nemá žiadny z receptorov adrenálnych ani pohlavných hormónov. Preto sa zdá, že tieto receptory sa pravdepodobne po prvý krát objavili u zástupcov podkmeňa kopijovce (*Cephalochordata*), alebo u zástupcov triedy bezčeľuštňatých kruhoústych rýb (*Cyclostomata*) (**obrázok 13**).

Výsledky týchto analýz preto naznačujú, že k diverzifikácii super-rodiny jadrových receptorov pravdepodobne došlo počas dvoch na seba nadväzujúcich vlnách génových duplikácií predka steroidných receptorov (**obrázok 14**). K prvej duplikácii došlo pred a k druhej po rozdelení línie živočíchov na línie vedúce k arthropódam a stavovcom (Escriva *et al.*, 2000; Baker, 2004; Baker, 1997). Prvou duplikáciou vznikol ER a receptor pre 3-ketosteroidy a duplikáciou týchto receptorov v druhej vlne vznikli receptory pre 3-ketosteroidy pohlavných hormónov (androgény, progestíny) (Thornton, 2001).



Obrázok 14. Evolúcia receptorov adrenálnych a pohlavných hormónov z predchodcu estrogénového receptora. Pôvodný ER slabo rozlišoval rôzne Δ^5 -steroidy. Preto sa pregnenolón, 17α -hydroxypregnenolón a DHEA účinne viazali, buď ako agonisti, alebo antagonisti, s pôvodným ER. Z duplikovaného ER sa vyvinul súčasťný typ PR s vyššou špecifitou pre steroidy s vedľajším reťazcom na uhlíku C_{17} . V tomto období rástol význam steroidogenných enzýmov v regulácii účinku steroidných hormónov cez ER a PR. Evolúciou enzýmu $3\beta/\Delta^{5-4}$ -HSD pribudli Δ^4 -steroidy ako progesterón, kortizol, androsténdión, ktoré predstavovali potenciálne ligandy pôvodných receptorov ER, PR, AR a GR a poskytovali selekčný faktor pre evolúciu dnešných adrenálnych a pohlavných steroidných hormónov (Baker, 2004). ER = estrogénový receptor, AR = androgénový receptor, GR = progesterónový receptor, PR = progesterónový receptor, GR = glukokortikoidných receptor, MR = mineralokortikoidný receptor (Baker, 2004).

U prvých zástupcov stavovcov tak fyziologické odpovede sprostredkované receptormi adrenálnych a pohlavných hormónov mohli poskytnúť výhody v prispôsobení sa stále meniacim sa podmienkam životného prostredia v období prvohôr a neskôr (Baker, 1997). Do tohto časového obdobia sa tiež datuje vznik enzýmov nevyhnutných pre syntézu a inaktiváciu steroidných hormónov (cytochrómy P450, hydroxysteroid dehydrogenázy).

3. CIELE PRÁCE

Z vyššie uvedeného prehľadu je zrejmé, že je doposiaľ obtiažne vytvoriť si detailnejšiu predstavu o metabolizme steroidných hormónov u stavovcov, s výnimkou cicavcov. Cieľom mojej práce preto bolo prispieť k poznaniu metabolizmu steroidných hormónov u vtákov. Konkrétne boli sledované nasledujúce otázky:

1. Sledovať metabolizmus steroidných substrátov vybranými tkanivami kura s dôrazom na identifikáciu mechanizmov inaktívácie glukokortikoidov a distribúciu 3-, 11- a 20-oxidoreduktázových aktivít v kuracích tkanivách.
2. Charakterizovať mineralokortikoidný receptor z hľadiska jeho afinity k 11-dehydro- a 20-dihydro-derivátom glukokortikoidu kortikosterónu. Výsledky tohoto pokusu umožnia určiť ako prítomnosť dvoch typov modifikácie molekuly kortikosterónu (11-oxidácia a 20-redukcia) vplyvajú na jeho afinitu k mineralokortikoidnému receptoru.
3. Identifikovať cDNA sekvenciu kuracieho proteínu 20 β -HSD, ktorý je pravdepodobne zodpovedný za metabolizmus glukokortikoidov ako aj iných steroidných substrátov bunkami kuracích tkanív. Rekombinantne exprimovať identifikovanú sekvenciu v baktériách *Escherichia coli* s následnou purifikáciou enzýmu. Inkubácia purifikovaného proteínu s rôznymi steroidnými substrátmi mi umožní podrobnejšie popísať jeho substrátovú a kofaktorovú špecificitu.
4. Kvantifikovať expresiu mRNA kuracieho enzýmu 20 β -HSD v rôznych tkanivách metódou Real-Time PCR a zistiť tak, či distribúcia expresie mRNA koreluje s výsledkami distribúcie aktivít z bodu 1. Ďalej sa budem snažiť zistiť, či existujú pohlavné rozdiely v expresii mRNA pre tento enzým u kura, ako aj zistiť možný vplyv aplikácie pohlavných hormónov (estrogénov) na expresiu sledovanej mRNA.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. POUŽITÉ ZVIERATÁ

Na pokusy boli použité samce a samice kura domáceho (*Gallus gallus*) kmeňa hnedá leghornka vo veku 20-35 dní. Všetky zvieratá boli kŕmené komerčným krmivom a napájané vodou *ad libitum*. Tieto podmienky boli dodržiavané najmenej po dobu dvoch týždňov pred začatím pokusov. Pre pokusy sledujúce vplyv aplikácie estrogénov na expresiu mRNA enzýmu 20 β -HSD bola 8 samcom a samiciam vo veku 20 dní, denne po dobu 7 dní, aplikovaná podkožná injekcia 100 μ l roztoku dietylstilbesterolu (DES) v koncentrácii 10 mg/ml 1,2-propylénglykolu (1 mg DES). Kontrolné zvieratá dostávali podkožnú injekciu 100 μ l 1,2-propylénglykolu. Zvieratá boli usmrtené dekapitáciou a odoberaté tkanivo bolo, buď ihneď použité v pokusoch, alebo zmrazené v tekutom dusíku.

4.2. POUŽITÉ PRÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, DATABÁZY A SOFTWARE

V pokusoch boli použité nasledujúce laboratórne prístroje:

- Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): sekvenačné zariadenie „Prism 3100 Genetic Analyser“
- Becman Coulter, Inc. (Fullerton, CA, USA): ultracentrifúga Optima XL-100K
- Eppendorf (Hamburg, Nemecko): termomixér, biofotometer, „Mastercycler“
- Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA): HPLC s UV detektorom HP1100, kolóna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m), scintilačný detektor Beckman LS 6500
- Kinematica AG (Littau, Švajčiarsko): homogenizátor Polytron PT MR-3000
- Memmert (Schwabach, Nemecko): vodná kúpeľ
- Merck (Darmstadt, Nemecko): kolóna LiChrosphere 100 RP18 (125 x 4 mm)
- PerkinElmer Life and Analytical Sciences, (Boston, MA, USA): prietokový scintilačný analyzátor 150TR
- Philips (Holandsko): spektrofotometer PU 8740 UV/VIS
- Roche Applied Science (Basel, Švajčiarsko): „LightCycler“
- SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Nemecko): laboratórna centrifúga 3K18

- Roth (Karlsruhe, Nemecko): scintilačný roztok „Rotiscint Eco Plus“
- Ultrazvukový sonikátor: ultrazvukový procesor model CP-750 od Cole Parmer (Quebec, Kanada): s hlavicou sonikátora model CV33 od Sonics and Materials Inc. (Newtown, CT, USA)
- Waters (Milford, MA, USA): kolóna reverznej fázy C-18 Sep-Pak
- Weiss-Gallenkamp (Loughborough, UK): trepačka

V pokusoch boli použité nasledujúce chemikálie:

- Amersham International (Aylesburg, VB): [1,2,6,7-³H]kortikosterón (špecifická aktivita 65 Ci/mmol), 5 α -dihydro[1,2,4,5,6,7-³H]testosterón (špecifická aktivita 119 Ci/mmol), [1,2,6,7-³H]progesterón (špecifická aktivita 95 Ci/mmol)
- BD Difco (Sparks, MD USA): médium LB Broth (Luria-Bertrani)
- Biotika (Slovenská Ľupča, SR): H₂O pre injekcie, ampicilín
- Fermentas (Hanover, MD, USA): DNA marker – „Gene Ruler DNA ladder mix“, dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Fluka (USA): 5-brómo-4-chlóro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozid (X-Gal)
- Invitrogen (Carlsbad, CA, USA): „RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor“ (RNase OUT), „Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase“ (MMLV-RT), ditiotreitól (DTT), 5x „First Strand Buffer“, „ProBond Ni-NTA Purification System“, *Escherichia coli* (One Shot® Mach1™-T1R) - kompetentné bunky, *Escherichia coli* (BL21)
- Lachema (Brno, ČR): sacharóza, chlorid sodný, chlorid draselný, Tris, chloroform, izopropanol, etanol, kyselina octová
- Oxoid (Basingstoke, VB): tryptón, kvasinkový extrakt
- PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA): scintilačný roztok Ultima Flo M
- Promega (Madison, WI, USA): „pGem T-Easy Vector System I“, JM109 kompetentné bunky
- Roche Applied Science (Bazilej, Švajčiarsko): primere pre syntézu cDNA p(DT)₁₅, „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit“
- Serva (Heidelberg, Nemecko): amónium persulfát, akrylamid-bis (30 %)
- Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): „GenElute Gel Extraction Kit“, „GenElute Five-Minute Miniprep Kit“, „Thrombin CleanCleave Kit“, NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, 1,2-propylénglykol, izopropyl- β -D-tiogalaktopyranozid (IPTG), hovädzí sérový albumín,

„Coomassie brilliant blue“, Tris acetát-EDTA tlmivý roztok 10 x konc., sodium dodecyl-sulfát (SDS), tetrametyl-etyléndiamín (TEMED)

- Steraloids (Wilton, NH, USA): 4-pregnén-11 β ,21-diol-3,20-dión (kortikosterón), 4-pregnén-21-ol-3,11,20-trión (11-dehydrokortikosterón), 4-prégnen-3,20-dión (progesterón), 4-pregnén-17 α -ol-3,20-dión (17 α -hydroxyprogesterón), 5 α -pregnán-3 β -ol-20-ón (5 α -dihydropregnanolón), 5 β -pregnán-3 α ,11 β ,21-triol-20-ón, 5 β -pregnán-3 α ,21-diol-11,20-dión, 4-pregnén-20 α -ol-3-ón (20 α -hydroxyprogesterón), 4-pregnén-20 β -ol-3-ón (20 β -hydroxyprogesterón), 4-pregnén-11 β ,20 β ,21-triol-3-ón (20 β -dihydrokortikosterón), 4-pregnén-20 β ,21-diol-3,11-dión (11-dehydro-20-dihydrokortikosterón), 5 α -androstán-17 β -ol-3-ón (5 α -dihydrotestosterón), 4-androstén-17 β -ol-3-ón (testosterón), 5 α -androstán-3 β -ol-17-ón, 5 α -androstán-3 α -ol-17-ón
- Technoplyn-Linde (Praha, ČR): pneumoxid, N₂
- Top-Bio (Praha, ČR): RNA blue, agaróza, „Taq Purple DNA polymeráza“ a „PCR Master Mix“ s MgCl₂
- VBC-Genomics (Viedeň, Rakúsko): syntéza primerov

Použité databázy:

- Databáza EST na NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) - National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA)
- Ensembl Project (www.ensembl.org) - spoločný projekt European Bioinformatics Institute (EBI) (Cambridge, VB) a Sanger Institute (Cambridge, VB)
- SWISS-MODEL (www.expasy.org)
- ExPASy – server proteomiky inštitútu Swiss Institute of Bioinformatics (www.expasy.org)

Software:

- ClustalW na EMBL-EBI
- BLAST na Ensembl project, BLAST na NCBI
- Lasergene (DNASTAR)
- Swiss PDBViewer (www.expasy.org) (Schwede *et al.*, 2003; Guex a Peitsch, 1997; Peitsch 1995)
- GraphPad Prism 4 (www.graphpad.com)

4.3. KONVERZIA STEROIDNÝCH SUBSTRÁTOV TKANIVOVÝMI REZMI

Aktivita konvertujúcich enzýmov bola stanovená metódou popísanou v prácach Pacha a Miksik (1994, 1996). Zvieratá boli usmrtené dekapitáciou a odobraté tkanivo obličky, pečene, segmentu bedrovníka (ileum), mozgu, vaječníka, vajcovodu, a semenníkov bolo okamžite prenesené do ľadového fyziologického roztoku (0,15 M NaCl). Po premytí fyziologickým roztokom, očistení od tukových a spojivových tkanív bolo tkanivo žiletkou narezané na 1 mm široké rezy (celková váha 250-300 mg) a vložené do Erlenmeyerových baniek obsahujúcich 10 ml inkubačného roztoku zahriateho na 37 °C a prebublaného pneumoxidom (95 % O₂ / 5 % CO₂). Inkubačný roztok mal nasledovné zloženie (údaje v mM):

NaCl.....	119,0
CaCl ₂	1,2
MgCl ₂	1,2
NaHCO ₃	21,0
K ₂ HPO ₄	2,4
KH ₂ PO ₄	0,6
glukóza.....	10,0
glutamín.....	2,5
β-hydroxybutyrát sodný.....	0,5
manitol.....	10,0
pH=	7,4

Po 15 minútach inkubácie (37 °C) v tesne uzavretých bankách a v pneumoxidovej atmosfére bola reakcia spustená pridaním jedného zo substrátov (zásobný roztok 1 mg/ml metanolu): kortikosterón (výsledná koncentrácia 1,45 x 10⁻⁶ M), progesterón (výsledná koncentrácia 1,59 x 10⁻⁶ M), 5α-DHT (výsledná koncentrácia 1,45 x 10⁻⁶ M). Po obnove pneumoxidovej atmosféry v bankách boli nádoby opäť tesne uzavreté. Inkubácia prebiehala 80 minút pri teplote 37 °C. Po ukončení inkubácie boli banky vložené do ľadu na 10 minút a bol do nich pridaný vnútorný štandard 11-deoxykortikosterón (1 mg/ml metanolu; 1,5 x 10⁻⁶ M). Obsah baniek bol po prenesení do 15 ml plastových skúmaviek centrifúgovaný 10 minút pri 3000 ot./min. Vzniknutá peleta bola použitá na stanovenie množstva sušiny a zo supernatantu boli vyextrahované steroidné látky.

U substrátu kortikosterónu bola 11-dehydrogenázová aktivita vypočítaná súčtom aktivít pre tvorbu 11-dehydrokortikosterónu a 11-dehydro-20dihydrokortikosterónu; 20-reduktázová aktivita ako súčet aktivít pre tvorbu 20-dihydrokortikosterónu a 11-dehydro-20dihydrokortikosterónu.

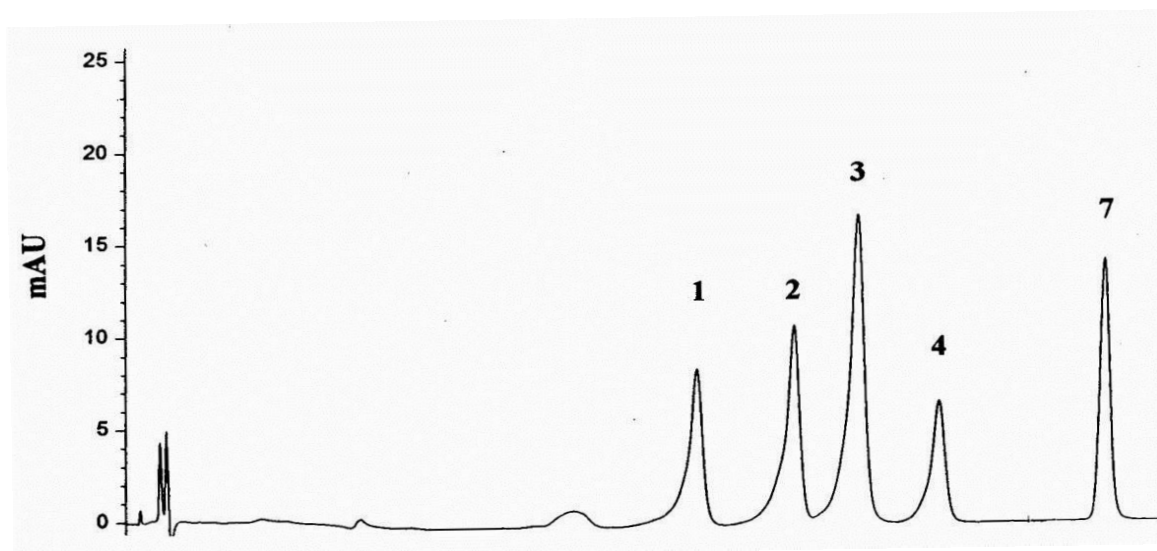
4.3.1. Extrakcia steroidov

Extrakcia steroidov z neradioaktívnych a radioaktívnych pokusov prebiehala na kolónach reverznej fázy C-18 Sep-Pak (Waters). Kolóny boli najprv premyté 5 ml metanolu potom 5 ml vody. Po nanesení vzorky bola kolóna prepláchnutá 4 ml vody a kolónou bol následne prehnaný vzduch na odstránenie ostatkov vody. Steroidy boli extrahované 2 ml metanolu. Metanol bol následne odparený v dusíkovej atmosfére pri teplote 45 °C a vzorky boli uskladnené pri -20 °C. Analýza steroidných látok vo vzorkách bola vykonaná metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie – HPLC s UV detektorom a u rádioaktívne značených steroidných látok aj pomocou scintilačného detektora.

4.3.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC

4.3.2.1. Detekcia kortikosterónu a jeho derivátov

Vzorky boli rozpustené v 50 µl metanolu a 20 µl bolo aplikovaných na kolónu LiChrosphere 100 RP18, 125 x 4 mm (Merck). Kolóna bola premývaná lineárnym gradientom zmesi voda-metanol v pomere od 58:42 (v/v) do 38:62 (v/v) po dobu 15 min (prietoková rýchlosť 1 ml/min). Následne bola kolóna izokraticky premývaná 5 min 100 % metanolom (prietoková rýchlosť 1,5 ml/min) a pre prípravu na nastreknutie ďalšieho vzorku bola premývaná 5 min zmesou voda-metanol v pomere 42:58 (v/v) (prietoková rýchlosť 1 ml/min). Detekcia β-žiarenia bola vykonaná na scintilačnom detektore Flow Scintillation Analyzer 150TR (PerkinElmer) za použitia scintilačného roztoku Ultima Flo M (PerkinElmer). Identifikácia metabolitov prebiehala na základe rozdielných retenčných časov. Retenčné časy boli zistené analýzou zmesi neradioaktívnych štandardov za rovnakých podmienok delenia. Nerádioaktívne metabolity boli detekované na UV detektore (**obrázok 15.**).



Obrázok 15. Výstup z UV detektora. 1. 11-dehydrokortikosterón, 2. 11-dehydro-20-dihydrokortikosterón, 3. kortikosterón, 4. 20-dihydrokortikosterón, 7. deoxykortikosterón

4.3.2.2. Detekcia progesterónu a jeho derivátov

Vzorky boli rozpustené v 50 μ l metanolu a 20 μ l bolo aplikovaných na kolónu Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4-6 mm, 5 μ m (Hewlett-Packard). Elúcia vzoriek prebiehala lineárnym gradientom medzi dvomi fázami A (voda) a B (acetonitril:tetrahydrofurán:metanol 50:20:30 v/v/v). Kolóna bola premývaná lineárnym gradientom od 42 % B do 60 % B po dobu 20 minút (prietoková rýchlosť 1 ml/min). Následne bola kolóna izokraticky premývaná 5 min 100 % B (prietoková rýchlosť 1 ml/min) a pre prípravu na nastreknutie ďalšej vzorky bola premývaná 10 min vodou. Detekcia β žiarenia bola vykonaná na scintilačnom detektore Flow Scintillation Analyzer 150TR (PerkinElmer) za použitia scintilačného roztoku Ultima Flo M (PerkinElmer). Identifikácia metabolitov prebiehala na základe rozdielnych retenčných časov. Retenčné časy boli zistené analýzou zmesi nerádioaktívnych štandardov za rovnakých podmienok delenia. Nerádioaktívne metabolity boli detekované na UV detektore.

4.3.2.3. Detekcia androstanolónu a jeho derivátov

Vzorky boli rozpustené v 50 μ l metanolu a 20 μ l bolo aplikovaných na kolónu Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4-6 mm, 5 μ m (Hewlett-Packard). Elúcia vzorkov prebiehala lineárnym gradientom medzi dvomi fázami A (voda) a B (metanol). Kolóna bola premývaná lineárnym gradientom od 42 % B do 62 % B po dobu 5 minút a 15 minút gradientom od 62 % B do 100 % B (prietoková rýchlosť 1 ml/min). Následne bola kolóna izokraticky premývaná 5 min 100 % B (prietoková rýchlosť 1 ml/min) a pre prípravu na nastreknutie ďalšej vzorky

bola premývaná 10 min vodou. Detekcia β žiarenia bola vykonaná na scintilačnom detektore Flow Scintillation Analyzer 150TR (PerkinElmer) za použitia scintilačného roztoku Ultima Flo M (PerkinElmer). Identifikácia metabolitov prebiehala na základe rozdielnych retenčných časov. Retenčné časy boli zistené analýzou zmesi nerádioaktívnych štandardov za rovnakých podmienok delenia. Nerádioaktívne metabolity boli detekované pomocou hmotnostnej spektrometrie (Miksik *et al.*, 2004).

4.4. CHARAKTERIZÁCIA MINERALOKORTIKOIDNÉHO RECEPTORA: VYTESŇOVACÍ EXPERIMENT

Tento pokus umožnil charakterizovať MR z hľadiska jeho afinity k 11-dehydro- a 20-dihydro-derivátom kortikosterónu, a to na základe ich kompetície s radioaktívne značeným kortikosterónom pri väzbe na MR. Ako zdroj cytozolu bolo použité tkanivo obličky 20 dňových zvierat. Zablockovanie väzby kortikosterónu na GR bolo dosiahnuté preinkubáciou cytozolu s RU-486 (7 μ M), blokátorom GR. Radioaktívne značený kortikosterón bol z väzby na MR vytesňovaný zvyšujúcou sa koncentráciou neznačeného derivátu. Postup prípravy roztokov ako aj metodický postup celého vytesňovacieho experimentu boli prebrané z práce Rafestin-Oblin *et al.*, (1989).

4.4.1. Izolácia cytozolu z buniek tkaniva obličky

Tkanivo obličky bolo po vyňatí a odstránení spojivových tkanív vložené do chladného homogenizačného roztoku TEGW (2 ml/g tkaniva), alebo zmrazené v tekutom dusíku. Zloženie roztoku TEGW: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 20 mM Na_2WO_4 , pH = 7,4. V deň pokusu bol do roztoku pridaný ditiotritol (DTT; 0,25 mM). Tkanivo bolo homogenizované v plastovej skúmavke za stáleho chladenia na homogenizátore Polytron PT MR-3000 (Kinematica AG) po dobu 45-60 sekúnd pri 14 000 ot./min. Homogenát bol následne 10 minút centrifugovaný pri 5000 x g a vzniknutý supernatant bol prenesený do ultracentrifugačných skúmaviek. Supernatant bol centrifugovaný 1 hodinu pri 100 000 x g a teplote 4 °C na ultracentrifúge Optima XL-100K (Becman Coulter). U cytozolu bol zmeraný obsah proteínu metódou s Coomassie Blue (Bradford, 1976) a buď priamo použitý v pokuse, alebo rozpipetovaný do 1,5 ml eppendorfiiek a zmrazený v tekutom dusíku.

4.4.2. Vytesňovací experiment s jedným väzbovým miestom

Cytozol bol nariadený roztokom TEGW (+ 0,25 mM DTT) do výslednej koncentrácie proteínu 3 mg/ml. Z takto pripraveného cytozolu bolo odobraných 4 x 100 µl. Dve 100 µl vzorky predstavovali hodnotu pozadia a do ďalších dvoch bol pridaný radioaktívne značený kortikosterón do výslednej koncentrácie 20 nM – vzorky predstavujúce totálnu väzbu (**tabuľka 5**). K ostatnému cytozolu bol pridaný blokátor RU-486 do výslednej koncentrácie 7 µM a cytozol bol inkubovaný 1 hodinu pri 4 °C. Potom bol k cytozolu pridaný radioaktívne značený kortikosterón (20 nM). Nakoniec bol cytozol rozpipetovaný po 100 µl do plastových skúmaviek a do každej bol pridaný príslušný derivát kortikosterónu podľa **tabuľky 5**. Všetky kroky postupu prebiehali v nádobe vyplnenej ľadovou triesťou a inkubácie v chladničke pri teplote 4 °C. Zásobné roztoky neznačených derivátov kortikosterónu boli pripravené nariadením zásobného 10 mM roztoku riediacou radou metanolom na: 1 mM, 100 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM.

Vzorky boli inkubované 24 hodín v chladničke pri teplote 4 °C. Na druhý deň bolo ku vzorkám pridaných 200 µl suspenzie dextransu a aktívneho čierneho uhlia (DCC, dextran-coated charcoal suspension) pripravenej nasledovne:

V deň pokusu: TEGW roztok + 2 % aktívneho čierneho uhlia (NORIT-A)
+ 0,2 % dextransu DEXTRAN-T70

Aktivácia NORIT-A:

50 g NORIT-A zaliať 250 ml destilovanej vody, miešať 10 minút a nechať sedimentovať približne 30 minút pri laboratórnej teplote. Opatrne zliať vrchnú vodnú vrstvu. Postup opakovať 5-krát. Pridať 250 ml metanolu a miešať cez noc pri laboratórnej teplote. Ráno nechať sedimentovať, opatrne zliať metanol a odpariť do sucha pri teplote 50 °C.

	Značený ligand	Blokátor GR	Neznačený kompetitor		
2x	-	-	-		pozadie
2x	20 nM [³ H]CS	-	-		totalna väzba na GR+MR
2x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	-		totalna väzba na MR
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	10 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	10 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	40 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	60 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	100 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	200 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	400 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	1000 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	2000 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	
3x	20 nM [³ H]CS	7 μM RU486	3000 nM	CS/11deCS/20diCS/11de20diCS	

Tabuľka 5. [³H]CS = [³H]kortikosterón, CS = kortikosterón, 11deCS = 11-dehydrokortikosterón, 20diCS = 20-dihydrokortikosterón, 11de20diCS = 11-dehydro-20-dihydrokortikosterón

Vzorky po pridaní DCC boli inkubované v ľade za občasného trepania po dobu 15 minút. Následne boli centrifugované 10 minút pri 1500 x g a teplote 4 °C. 200 μl vrchnej vodnej vrstvy bolo opatrne prenesených do scintilačných nádobiek obsahujúcich 2 ml scintilačného roztoku „Rotiscint Eco Plus“ (Roth). Aktivita vzoriek bola meraná na scintilačnom detektore Beckman LS 6500 (Hewlett-Packard) po dobu 3 minút a vyjadrená v jednotkách DPM (počet dezintegrácií za minútu). Hodnoty EC₅₀ pre každý kompetitor boli vypočítané použitím nelineárnych regresných kriviek analýzy kompetície s jedným väzbovým miestom s použitím programu GraphPad Prism 4. EC₅₀ predstavuje koncentráciu kompetitora potrebnú na 50 % vytesnenie rádioaktívne značeného kortikosterónu z väzby na MR. Výsledky boli vo vytesňovacích krivkách vyjadrené ako % totálnej špecifickej väzby [³H]kortikosterónu na MR ± SEM vs. log koncentrácie kompetitora.

4.5. IDENTIFIKÁCIA cDNA SEKVENCIE KURACIEHO ENZÝMU 20 β -HSD

Za využitia internetového vyhľadávača BLAST (ENTREZ-PubMED) boli z kuracej databázy EST (expressed sequence tags – krátke cDNA sekvencie), na základe sekvenčnej homológie so známymi sekvenciami u iných stavovcov, vyselektované a vzájomne pospájané cDNA fragmenty predstavujúce pravdepodobnú cDNA sekvenciu kuracieho enzýmu 20 β -HSD. Sekvencia bola porovnaná so známymi sekvenciami enzýmu 20 β -HSD u iných stavovcov a určený stupeň aminokyselinovej sekvenčnej homológie.

Pre takto získanú sekvenciu bol pomocou aplikácie SWISS-MODEL a programu PDBViewer vygenerovaný troj-rozmerný model, pričom ako templát slúžil známy model kryštálovej štruktúry prasačieho proteínu 20 β -HSD (SWISS-MODEL templát: 1n5dA). Na zložení cDNA sekvenciu kuracieho proteínu boli pomocou aplikácie Primer Select v rámci programu Lasergene (DNASTAR) navrhnuté oligonukleotidové primere pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR). PCR primere boli navrhnuté tak aby medzi sebou obsahovali celý čítací rámec zloženej sekvencie. V ďalšom kroku boli tieto PCR primere použité na amplifikáciu kuracej cDNA (postup prípravy viď kap. 4.5.1. a 4.5.2.) pomocou PCR reakcie o nasledovnom zložení:

Sekvencia použitých PCR primerov:

„forward“ CGCTGAGGAGTGCGGGAAGGT

„reverse“ GCCACTTGCAAGGGTCCACAGA

1x „Taq Purple DNA Polymeráza PCR Master Mix“ s MgCl₂

250 nM „forward“ primer

250 nM „reverse“ primer

1 μ l cDNA (oblička)

dĺžka PCR produktu: 930 pb

Rekcia PCR prebiehala v prístroji „Mastercycler Personal“ (Eppendorf) za nasledovných podmienok:

preinkubácia a denaturácia:

95 °C, 2 minúty

32 cyklov PCR:

95 °C, 30 sekúnd

64 °C, 30 sekúnd

72 °C, 70 sekúnd

záverečná syntéza:

72 °C, 10 minút

Po ukončení PCR reakcie bola dĺžka amplifikovanej cDNA overená elektroforézou v 1,5 % agarózovom géle. Pre overenie nukleotidovej sekvencie amplifikovanej cDNA bola pripravená nová PCR reakcia s výsledným objemom 200 µl, ktorá bola podrobená elektroforéze v 1 % preparačnom agarózovom géle. Amplifikované fragmenty so žiadanou dĺžkou boli z gélu vyextrahované pomocou „GenElute Gel Extraction Kit“ (Sigma) a následne vložené do sekvenačného vektora pGEM T-Easy za použitia „pGem T-Easy Vector System I kit“ (Promega). Pripravený vektor bol použitý na transformáciu kompetentných buniek *Escherichia coli* JM109 metódou teplotného šoku. Vektorom transformované bunky boli selektované získanou rezistenciou na ampicilín, pričom bunky transformované vektorom s vloženou DNA boli navyše selektované stratou schopnosti štiepiť substrát X-Gal na modrý produkt. Táto strata bola spôsobená prerušením génu lacZ, ktorý kóduje enzým β-galaktosidáza. Vybrané kolónie boli prenesené do 5 ml sterilného LB média s obsahom ampicilínu (50 µg/ml) a trepané cez noc pri teplote 37 °C. Plazmidová DNA bola nasledujúci deň vyizolovaná pomocou „GenElute Five-Minute Miniprep Kit“ (Sigma). Sekvenácia plazmidovej DNA prebiehala na prístroji Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Sekvencia bola porovnaná s navrhnutou sekvenciou, ako aj s počítačovo navrhnutou sekvenciou získanou z databázy Ensembl.

4.5.1. Izolácia RNA

Na izoláciu RNA bolo použité tkanivo zmrazené v tekutom dusíku. 100 mg tkaniva bolo zhomogenizovaných s 1 ml RNA blue (Top-Bio), inkubovaných 5 minút pri laboratórnej teplote a následne centrifugovaných 5 minút pri 5 000 x g. K 750 µl supernatantu bolo pridaných 200 µl chloroformu, celá zmes bola 15 sekúnd intenzívne trepaná a inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote. Zmes bola následne 10 minút centrifugovaná pri 12 000 x g a teplote 4 °C. 400 µl hornej vodnej fázy bolo prenesených do novej eppendorfky. K odobratej

vodnej fáze bolo pridaných 50 µl isopropanolu a celá zmes bola inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote. Potom bola zmes znovu 10 minút centrifugovaná pri 12 000 x g a teplote 4 °C. Supernatant bol prenesených do novej eppendorfky s 450 µl isopropanolu a celá zmes bola inkubovaná do druhého dňa pri -20 °C. Po 20 minútovej centrifugácii pri 12 000 x g a teplote 4 °C bol supernatant odsatý a peleta omytá 1 ml 75 % etanolu. Peleta bola vysušená pri teplote 37 °C v termomixére (Eppendorf). Vysušená peleta bola rozpustená v 20 µl vody pre PCR. Po úplnom rozpustení bola zmeraná koncentrácia RNA na biofotometre (Eppendorf).

4.5.2. Reverzná transkripcia

Reverzná transkripcia prebiehala v tenkostenných 200 µl eppendorfkách s reakčnou zmesou s nasledovným zložením:

1 µl „Primer for cDNA synthesis p(dT)₁₅“ (výsledná koncentrace 0,5 µM)

H₂O

RNA (6µg)

výsledný objem 11 µl

Pomer objemu použitej vody a RNA bol upravený tak, aby sa výsledná koncentrácia RNA v zmesi bola približne 6 µg/20 µl. Zmes bola inkubovaná 10 minút pri teplote 65 °C v prístroji Mastercycler personal (Eppendorf) a následne schladená na 4 °C. K zmesi bolo pridaných 9 µl reakčnej zmesi s nasledovným zložením:

1x „First Strand Buffer“

10 mM DTT

500 µM dNTP mix

20 U RNAase OUT

100 U MMLV-RT

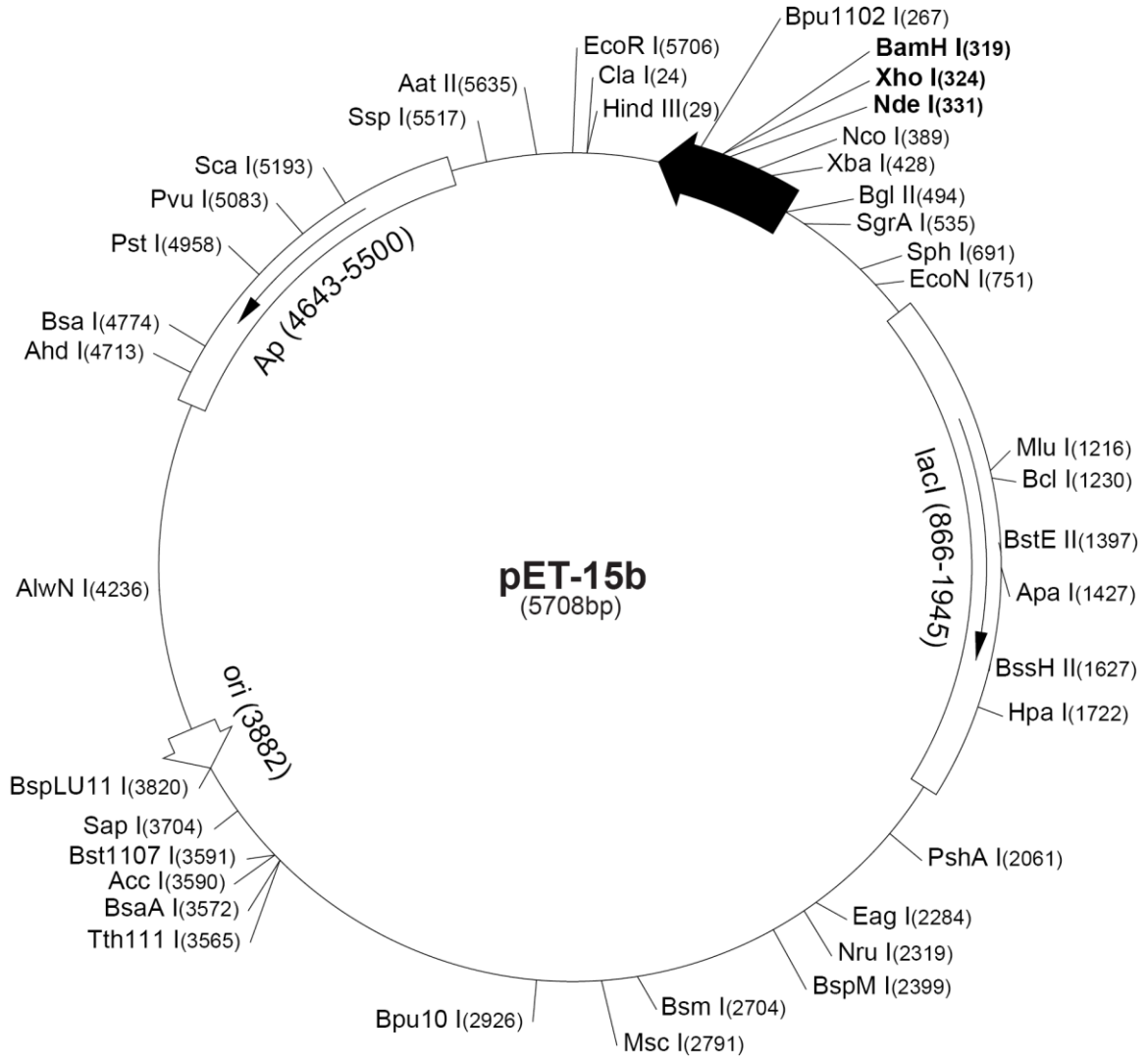
Výsledná zmes bola inkubovaná 1 hodinu pri teplote 37 °C a reverzná transkripcia bola ukončená zahriatím zmesi na 95 °C po dobu 15 minút. cDNA bola uskladnená pri teplote -20 °C.

4.6. REKOMBINANTNÁ EXPRESIA 20 β -HSD V BAKTÉRIÁCH *ESCHERICHIA COLI*

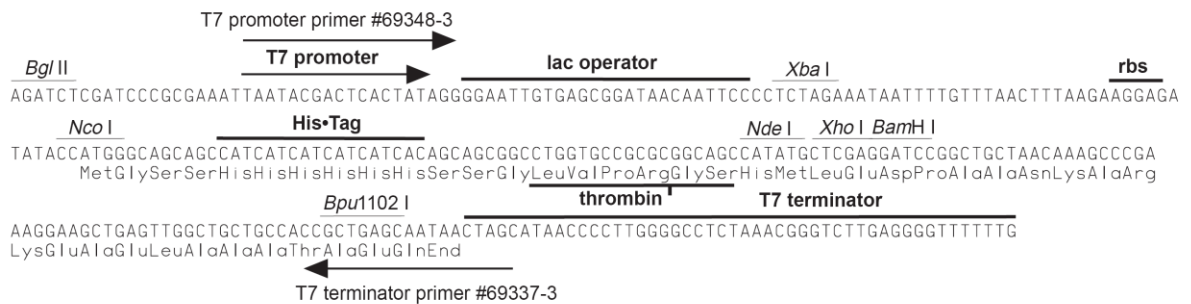
4.6.1. Charakterizácia expresného vektoru pET-15b

Na rekombinantnú expresiu kuracieho cytoplazmatického enzýmu 20 β -HSD bol využitý bakteriálny expresný vektor pET-15b. Plazmid pET-15b, schématicky znázornený na **obrázku 18**, mal veľkosť 5708 pb, *T7lac* promótor pre vysokú úroveň expresie vloženej sekvencie a ako selekčný marker slúžil gén rezistencie na antibiotikum ampicilín (β -laktamáza). Na vloženie žiadanej sekvencie slúžil polylinker s unikátnymi nukleotidovými sekvenciami pre štiepenie restriktívnymi endonukleázami BamH1, Xho1, Nde1. Plazmid ďalej obsahoval N-terminálne umiestnenú sekvenciu kódujúcu šesť aminokyselín histidínu (6xHis) nasledovanú krátkou sekvenciou pre štiepenie proteázou trombín (**obrázok 19**). Sekvencia 6xHis umožňuje pomerne jednoduché a rýchle oddelenie exprimovaného fúzneho proteínu od ostatných bunkových proteínov pomocou „ProBond Ni-NTA Purification System“ (Invitrogen). Sekvencia pre štiepenie trombínom umožňuje proteázou trombín „Thrombin CleanCleave Kit“ (Sigma) vyštiepiť sekvenciu 6xHis od vlastného enzýmu 20 β -HSD.

K namnoženiu plazmidu pET-15b obsahujúceho vloženú sekvenciu enzýmu 20 β -HSD boli použité vysoko kompetentné baktérie *Escherichia coli* „One Shot® Mach1™-T1R“ (Invitrogen). K expresii fúzneho kuracieho proteínu 20 β -HSD boli použité baktérie *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen). Kmeň BL21 (DE3) nesie vo svojom genóme gén pre T7-RNA polymerázu a gén *lacI* kódujúci lac represor. Lac represor inhibuje expresiu T7-RNA polymerázy, ktorá je nevyhnutná pre expresiu nami vloženého génu 20 β -HSD v plazmide pET-15b. Ako induktor expresie T7-RNA polymerázy sa používa izopropyl- β -D-tiogalaktózid (IPTG).



Obrázok 18. Schématické znázornenie plazmidu pET-15b.



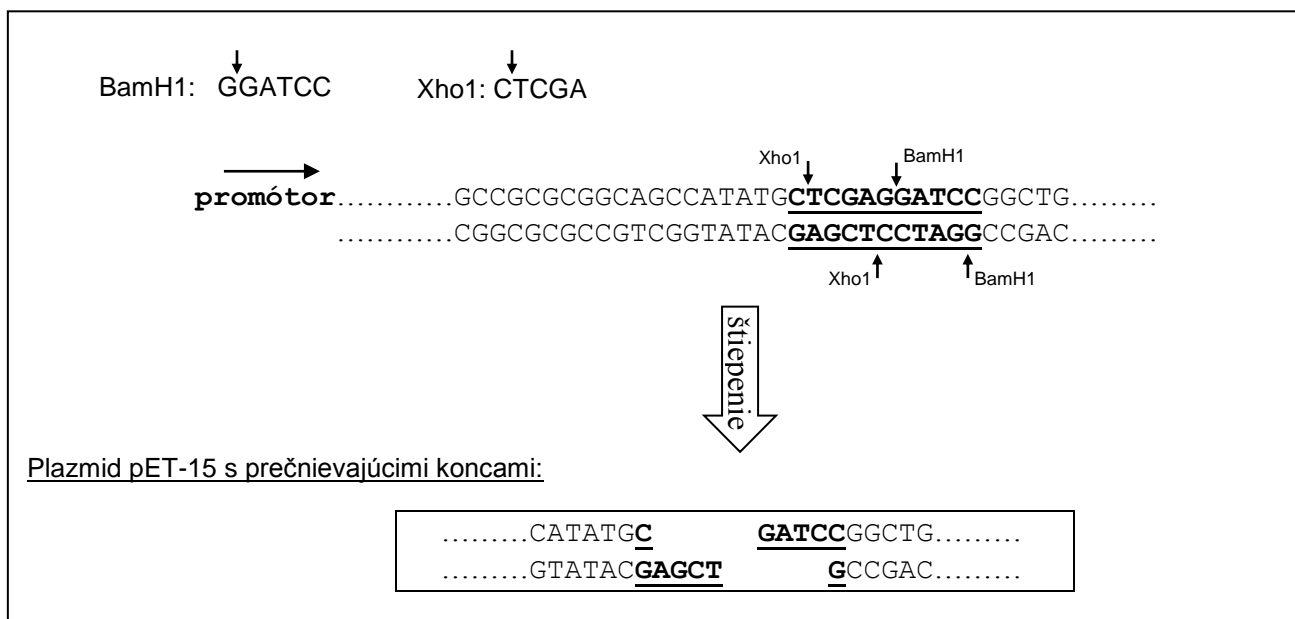
Obrázok 19. Detail časti plazmidu pET-15b.

4.6.2. Príprava a štiepenie plazmidu pET-15b

Podmienkou úspešného vloženia sekvencie enzýmu 20 β -HSD do expresného vektora bolo, aby sekvencia enzýmu ako aj plazmidu obsahovali komplementárne (vzájomne sa prekrývajúce) konce, umožňujúce ich vzájomné spojenie enzýmom DNA-ligáza. Ako miesto pre vloženie sekvencie 20 β -HSD do plazmidu boli zvolené restričné miesta enzýmov BamH 1 a Xho 1 (**obrázok 20**).

Príprava prečnievajúcich koncov plazmidu pET-15b prebiehala v dvoch krokoch. Najprv bol plazmid štiepený enzýmom Xho1 a až po extrakcii linearizovaného plazmidu z agarózového gélu bol plazmid štiepený enzýmom BamH1.

Štiepenie enzýmom Xho1 (1. štiepenie): po 5-hodinovej inkubácii reakčnej zmesi, ktorej zloženie je uvedené na **obrázku 21**, bola reakčná zmes podrobená elektroforéze (2,5 hodiny, 80 V) v 1 % agarózovom géle. Ako kontrola dĺžky plazmidu bol použitý neštiepený plazmid pET15-b.



Obrázok 20. Štiepenie plazmidu pET-15b restričnými enzýmami Xho1 a BamH1.

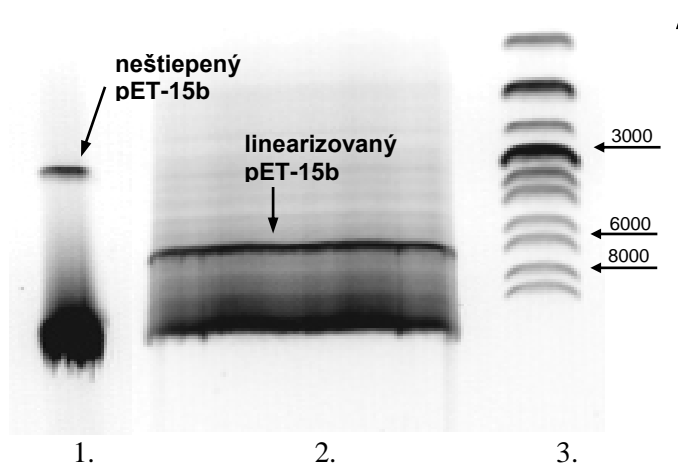
Nelinearizovaný plazmid putoval v agarózovom géle rýchlejšie, ako ten istý, linearizovaný plazmid (**obrázok 21**). Linearizovaná plazmidová DNA bola v géle vizualizovaná UV lampou, opatrne vyseknutá skalpelom a izolovaná pomocou „GenElute Gen Extraction Kit“ (Sigma). Prítomnosť plazmidovej DNA v eluáte bola zistená elektroforézou

1. štiepenie plazmidu

plasmid pET-15b (100 ng/ μ l)..... 10 μ ltlmivý roztok pre Xho1..... 2 μ lXho1 enzým (10 U/ μ l).....1 μ lH₂O.....7 μ l

inkubácia: 5 hodiny pri 37 °C

1. neštiepený plazmid
2. lineárny pET-15b (Xho1)
3. DNA marker



2. štiepenie plazmidu

plasmid pET-15b po prvom štiepení (30 ng/ μ l).....20 μ ltlmivý roztok pre BamH1.....3 μ lBamH1 enzým (10 U/ μ l).....2 μ lH₂O.....5 μ l

inkubácia: 5 hodiny pri 37 °C

Obrázok 21. Štiepenie plazmidu pET-15b reštrikčnými enzýmami Xho1 a BamH1.

1 μ l v 1 % agarózovom géle. Získaný linearizovaný plazmid bol podrobený druhému reštrikčnému štiepeniu, enzýmom BamH1 (zloženie reakčnej zmesi 2. štiepenia vid' **obrázok 21**). Po inkubácii bol k reakčnej zmesi pridaný rovnaký objem izopropanolu a reakcia bola inkubovaná 1 hodinu pri -20 °C. Plazmid bol následne usadený centrifugáciou pri 12 000 x g a teplote 4 °C, a po odsatí supernatantu bola peleta opatrne omytá 70 % etanolom, vysušená pri 45 °C a rozpustená v 10 μ l sterilnej vody. Elektroforézou v 1 % agarózovom géle spolu s DNA markerom bola určená približná koncentrácia plazmidu.

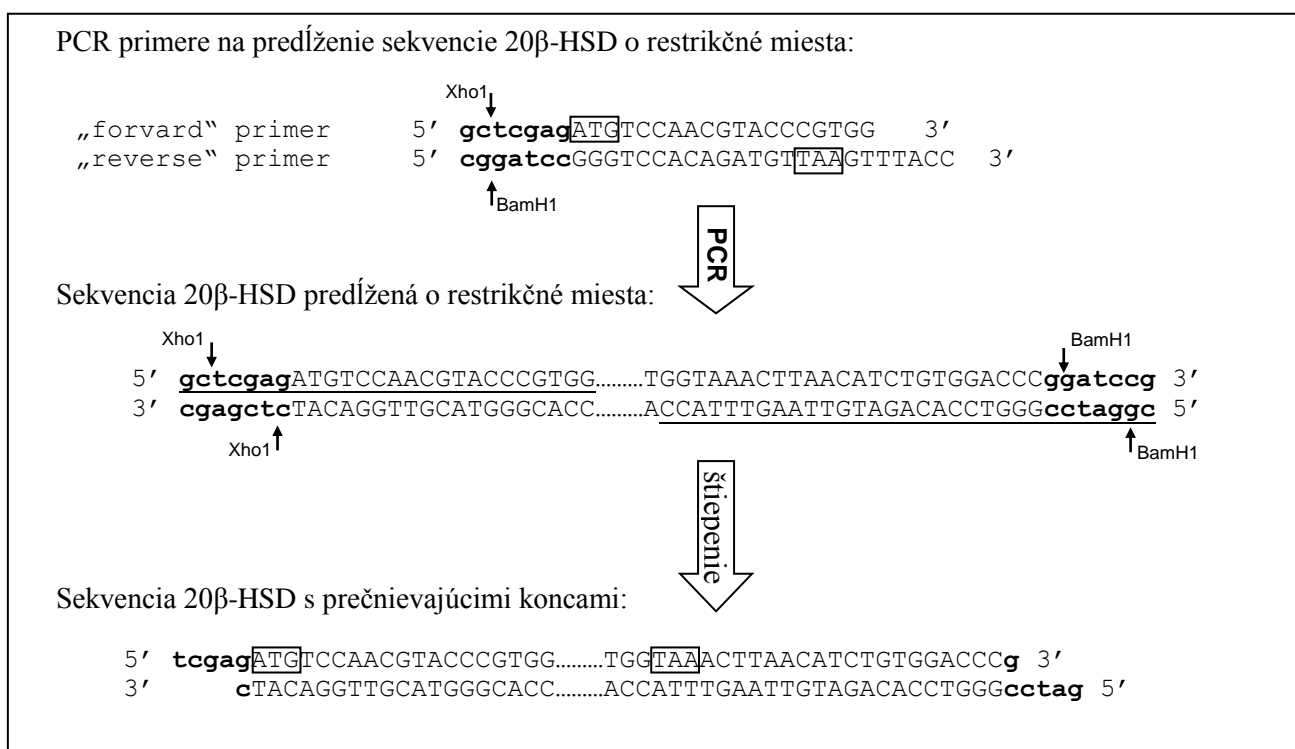
4.6.3. Príprava a štiepenie sekvencie 20 β -HSD

Pre úspešné vloženie sekvencie 20 β -HSD do plazmidu pripraveného v predchádzajúcom kroku, bolo potrebné pre túto sekvenciu navrhnuť oligonukleotidové PCR primere obsahujúce na ich 3'-koncoch zvolené restriktčné miesta. V ďalšom kroku bola pomocou PCR reakcie sekvencia 20 β -HSD o tieto restriktčné miesta predĺžená (Xho1 restriktčné miesto na 3'-konci, BamH1 restriktčné miesto na 5'-konci). Dôležité bolo, aby čítací rámec sekvencie enzýmu 20 β -HSD po jej namnožení a vložení do plazmidu, presne nadväzoval na čítací rámec plazmidu. „Forward“ primer obsahoval vo svojej sekvencii prvú aminokyselinu (ATG, Met) kuracieho enzýmu a terminálny kodón (TAA) bol obsiahnutý v sekvencii komplementárnej k sekvencii „reverse“ primera (**obrázok 22**). Pre amplifikáciu cDNA v reakcii PCR bola použitá DNA polymeráza „High Fidelity Platinum® Taq DNA Polymerase“ (Invitrogen) s 5'→3' exonukleázovou aktivitou. Ako templát bola využitá cDNA získaná prepisom mRNA izolovanej z obličky postupom popísaným v kapitolách 4.5.1. a 4.5.2. Zloženie PCR reakčnej zmesi:

- 1 x „High Fidelity PCR Buffer“
- 200 μ M dNTP mix
- 2,5 mM MgSO₄
- 250 nM 20 β -HSD „forward“ a „reverse“ primer
- cDNA
- 1 U „Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase“ (10 U/ μ l)
- H₂O pre PCR

Jednotlivé kroky PCR reakcie:

1. denaturácia DNA.....95 °C.....90 sekúnd
2. denaturácia DNA.....95 °C.....25 sekúnd
nasadenie primerov (annealing)....58 °C.....25 sekúnd
syntéza DNA (elongation).....68 °C.....70 sekúnd
3. opakovanie kroku 2, 32 cyklov
4. schladenie vzoriek na 4°C



Obrázok 22. Schéma prípravy DNA enzýmu 20 β -HSD s prečnievajúcimi koncami

Po skončení PCR reakcie bola reakčná zmes podrobená elektroforéze v 1 % agarózovom géle. DNA enzýmu 20 β -HSD bola na géle vizualizovaná UV lampou; opatrne vyseknutá skalpelom a izolovaná pomocou „GenElute Gen Extraction Kit“ (Sigma). 200 ng amplifikovanej DNA bolo v prvom kroku štiepených enzýmom Xho1 vo výslednom objeme 20 μ l po dobu 5 hodín. Zloženie reakčnej zmesi reštrikčného štiepenia:

200 ng DNA 20 β -HSD (50 ng/ μ l)

1 x tlmivý roztok pre Xho1

10 U Xho1 enzým (10 U/ μ l)

H₂O do 20 μ l

Po skončení prvého reštrikčného štiepenia bol do reakčnej zmesi pridaný rovnaký objem izopropanolu a celá zmes bola inkubovaná 12 hodín pri teplote -20 °C. Vyzrážaná DNA bola následne usadená centrifugáciou (30 minút, 12 000 x g); supernatant bol odsatý, peleta omytá 70 % etanolom; vysušená pri teplote 45 °C a rozpustená v 10 μ l vody pre PCR. V druhom kroku bola DNA štiepená enzýmom BamH1 po dobu 5 hodín vo výslednom objeme

20 μ l a nasledoval proces zrážania izopropanolom z prvého kroku. Zloženie reakčnej zmesi druhého restriktčného štiepenia:

DNA 20 β -HSD z prvého restriktčného štiepenia

1 x tlmivý roztok pre BamH1

10 U BamH1 enzým (10U/ μ l)

H₂O do 20 μ l

DNA bola rozpustená v 10 μ l vody pre PCR a jej prítomnosť a množstvo zistené elektroforézou 1 μ l DNA v 2 % agarózovom géle spolu s DNA markerom. Takto pripravená DNA enzýmu 20 β -HSD bola spolu s plazmidom pET-15b pripraveným postupom v kapitole 4.6.2. použitá na transformáciu baktérii *E. coli*.

4.6.4. Ligácia DNA sekvencie enzýmu 20 β -HSD do plazmidu pET-15b a transformácia baktérií *Escherichia coli*

Pre ligáciu bola použitá DNA plazmidu a enzýmu 20 β -HSD s prečnievajúcimi, vzájomne sa prekrývajúcimi koncami, pripravenými v predchádzajúcom postupe. Prítomnosť dvoch rôznych, vzájomne sa prekrývajúcich koncov na oboch DNA mala zabezpečiť, aby pri ligácii došlo k vloženiu sekvencie enzýmu 20 β -HSD do plazmidu iba v žiadanej orientácii a tiež, že u takto upraveného plazmidu nemôže dôjsť k jeho uzavretiu bez prítomnosti sekvencie s komplementárnymi koncami (**obrázok 23**).

pET-15b	20HSD	pET-15b
.....CATATGC	tcgag ATGTCCAACGTACCCGTGG.....TGGTAAACTTAAACATCTGTGGACCC g	GATCCGGGCTG...
.....GTATAC GAGCT	ct TACAGGTTGCATGGGCACC.....ACCATTTGAATTGTAGACACCTGGG cctag	GCCGAC...

Obrázok 23. Schématické znázornenie prekrývajúcich sa koncov DNA sekvencie enzýmu 20 β -HSD a plazmidu pET-15b

V ligáčačnej reakcii boli použité DNA plazmidu a 20 β -HSD v molárnom pomere 1 : 3. Ako negatívna kontrola ligácie bola použitá ligačná zmes obsahujúca 2 μ l dvojnásobne štiepeného plazmidu, avšak bez prítomnosti DNA 20 β -HSD (kontrola prítomnosti nekompletne štiepnutého plazmidu: pri ligácii dojde k uzavretiu plazmidu štiepnutého len jedným enzýmom, keďže takto vytvorené prečnievajúce konce sú vzájomne komplementárne. Zloženie ligačnej zmesi bolo nasledovné:

DNA enzýmu 20 β -HSD (10 ng/ μ l).....	2,5 μ l
10 x ligačný tlmivý roztok.....	1 μ l
plazmid pET-15b (25 ng/ μ l).....	2 μ l
H ₂ O pre PCR.....	3 μ l
T4 DNA ligáza (3 U/ μ l).....	1,5 μ l
spolu.....	10 μ l

inkubácia 8 hodín pri 16 °C

Po ukončení inkubácie bola celá ligačná reakcia prenesená do skúmavky obsahujúcej kompetentné baktérie *Escherichia coli* One Shot® Mach1™-T1R (Invitrogen) a inkubovaná 15 minút na ľade. Bunky boli vystavené teplotnému šoku pri teplote 42 °C vo vodnom kúpeli po dobu 40 sekúnd a následne vložené späť do ľadu. K bunkám bolo pridaných 250 μ l SOC média (2 % tryptón, 0,5 % kvasinkový extrakt, 0,4 % glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH = 7) zohriateho na izbovú teplotu a celá zmes bola trepaná 1 hodinu pri teplote 37 °C (200 ot./min.). Následne bolo 50 μ l suspenzie buniek rozosiatých na kultivačnú LB miskú s obsahom antibiotika ampicilín (50 μ g/ml) a predhriatú na teplotu 37 °C. Ostatok suspenzie bol po centrifugácii (3000 ot./min.) a rozsuspendovaní s malým množstvom média rozotrený na ďalšiu LB miskú.

Bunky boli vysiate v dvoch rôznych koncentráciách preto, aby aspoň jedna z misiek mala dobre oddelené kolónie. Misky boli inkubované do druhého dňa pri teplote 37 °C. Z misky obsahujúcej baktérie transformované plazmidom bolo náhodne odobratých 10 kolónii a nimi boli inokulované skúmavky obsahujúce 5 ml sterilného LB média s obsahom antibiotika ampicilín. Skúmavky boli trepané 8 hodín pri teplote 37 °C (200 ot./min).

Na potvrdenie prítomnosti plazmidu s vloženou sekvenciou enzýmu 20 β -HSD vo vypestovaných kolóniách bola použitá metóda PCR, pričom ako templát bola použitá bakteriálna DNA pripravená nasledovne: z každej skúmavky bolo odobratých 40 μ l kultúry a inkubovaných 15 minút pri teplote 95 °C. Po schladení na teplotu 4 °C bol 1 μ l pridaný do PCR reakčnej zmesi. Ako oligonukleotidové primere boli použité primere pôvodne použité na získanie sekvencie enzýmu 20 β -HSD (vid' kapitola 4.6.3.). Zloženie PCR reakčnej zmesi:

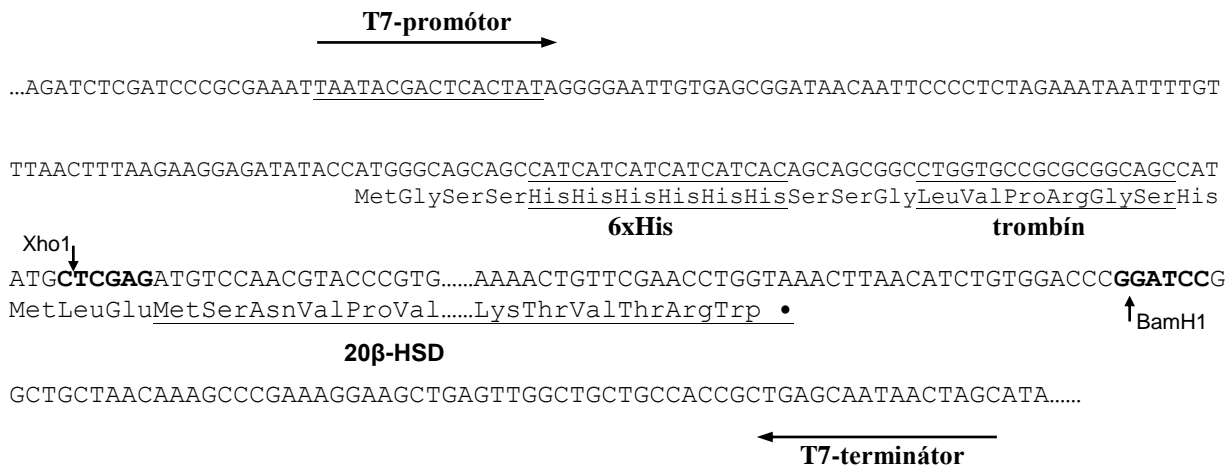
1x „Taq Purple DNA Polymeráza PCR Master Mix s MgCl₂“ (Top-Bio)
250 nM „forward“ 20β-HSD primer
250 nM „reverse“ 20β-HSD primer
bakteriálna DNA
H₂O pre PCR

Jednotlivé kroky PCR reakcie:

1. denaturácia DNA.....95 °C.....90 sekúnd
2. denaturácia DNA.....95 °C.....25 sekúnd
nasadenie primerov (annealing).....58 °C.....25 sekúnd
syntéza DNA (elongation).....72 °C.....70 sekúnd
3. opakovanie kroku 2, 32 cyklov
4. schladenie vzoriek na 4 °C

Po skončení PCR bola reakčná zmes podrobená elektroforéze v 2 % agarózovom géle. Prítomnosť plazmidu, obsahujúceho vloženú DNA sekvenciu enzýmu 20β-HSD, sa na géle prejavila prítomnosťou amplifikovaného fragmentu s veľkosťou 864 pb. Kultúry s pozitívnym nálezom plazmidu boli rozpipetované do sterilných ependorfiek a pre neskoršiu produkciu plazmidu, po pridaní glycerolu (15 %), zamrazené pri teplote -85 °C.

Správna orientácia vloženej sekvencie a jej nadväzovanie na čítací rámec plazmidu, boli nakoniec overené sekvenáciou purifikovaného plazmidu. Na **obrázku 24** je graficky znázornený úsek plazmidu pET-15b s vloženou DNA sekvenciou enzýmu 20β-HSD. Znázornené sú obnovené reštrikčné miesta na oboch koncoch sekvencie enzýmu a proteínová sekvencia vloženého enzýmu nadväzujúca na krátky proteín so sekvenciou 6xHis a sekvenciou pre štiepenie proteázou trombín.



Obrázok 24. Grafické znázornenie úseku plazmidu pET-15b s vloženou DNA sekvenciou enzýmu 20β-HSD

4.6.5. Expressia fúzneho proteínu 20β-HSD

Pre produkciu rekombinantného fúzneho proteínu 20β-HSD bol sekvenáciou overený plazmid vložený do baktérií *Escherichia coli* kmeňa BL21 (DE3) (Invitrogen), ktoré vo svojom génome nesú gén pre T7-RNA polymerázu. T7-RNA polymeráza je nevyhnutná pre prepis sekvencie enzýmu 20β-HSD vlozenej v plazmide pET-15b. Keďže lac represor inhibuje expresiu T7-RNA polymerázy a IPTG ju aktivuje, je expresia vloženého génu indukovateľná pridaním IPTG. Postup transformácie baktérii BL21 (DE3) bol rovnaký ako pri transformácii baktérii *Escherichia coli* One Shot® Mach1™-T1R v kapitole 4.6.4. Na transformáciu bol použitý 1 µl purifikovaného plazmidu pET-15b+20β-HSD (50 ng/µl) a pridaný priamo do ampulky s baktériami. Baktérie boli vystavené teplotnému šoku a schladené na lade. Po pridaní 250 µl SOC média boli trepané 1 hodinu pri teplote 37 °C. Celý objem bol pridaný do skúmavky s 10 ml LB média (50 µg/ml ampicilínu) a kultúra bola trepaná cez noc pri teplote 37 °C.

Na druhý deň bolo 10 ml LB média (50 µg/ml ampicilínu) inokulovaných 500 µl nočnej kultúry a trepaných pri teplote 37 °C po dosiahnutí optickej denzity kultúry $OD_{60} = 0,4$ - 0,6 (stredne-logaritmická fáza rastu). Ostatok nočnej kultúry bol rozpipetovaný do 1,5 ml skúmaviek (700 µl kultúry + 300 µl 50 % glycerolu) a zamrazený pri teplote -85 °C. Po dosiahnutí žiadanej optickej denzity bola kultúra rozdelená na dve 5 ml časti a v jednej z nich bola pridaním IPTG (do výslednej koncentrácie 1 mM) indukovaná expresia fúzneho proteínu

20 β -HSD. Z kultúry bez IPTG bol odobratý 500 μ l alikvot, bunky usadené centrifugáciou (5000 x g) a peleta zamrazená pri teplote -20 °C (vzorky v čase nula). Bakteriálne kultúry boli inkubované 6 hodín pri teplote 37 °C (200 ot./min.) a každú hodinu bolo odobratých 500 μ l kultúry do 1,5 ml eppendorcky, bunky usadené centrifugáciou a pelety buniek uskladnené pri teplote -20 °C. Detekcia expresie rekombinantného proteínu bola vykonaná metódou SDS-Page elektroforézy buncného homogenátu v polyakrylamidovom géle.

4.6.5.1. Spracovanie buniek s indukovanou tvorbou fúzneho proteínu 20 β -HSD metódou SDS – Page

Pelety buniek z predchádzajúceho postupu boli rozsuspendované v 500 μ l lyzačného roztoku (3 mM KH₂PO₄, 47 mM K₂HPO₄, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % glycerol, 0,5 % Triton X-100, 10 mM imidazol, pH = 7,8).

Vzorky boli zmrazené v tekutom dusíku a rozmrazené vo vodnom kúpeli s teplotou 42 °C. Krok zmrazenia a rozmrazenia bol opakovaný 3-krát. Pred zmrazením v tekutom dusíku boli bunky krátko sonikované na ultrazvukovom sonikátore (Cole Parmer a Sonics and Materials Inc.). Vzniknuté homogenáty boli centrifugované 5 minút pri teplote 4 °C a preťaženi 12 000 x g. Supernatant bol prenesený do sterilných eppendorfiiek. Pre každý časový bod indukcie tvorby fúzneho proteínu 20 β -HSD, ako aj pre neindukovanú kultúru, boli týmto postupom získané dve vzorky: cytozol (predstavuje cytoplazmatické proteíny bunky) a peleta obsahujúca organely a membrány bunky (predstavuje membránovo viazané proteíny bunky). Vo vzorkách cytozolu bola určená koncentráciu proteínov metódou s Coomassie Blue (Bradford, 1976). Ku vzorke cytozolu bolo pridaných 500 μ l 2 x koncentrovaného a k pelete 500 μ l 1 x koncentrovaného tlmivého roztoku o zložení:

2 x koncentrovaný tlmivý roztok:

Tris (zásobný roztok 1 M, pH = 6,8).....	125 mM
bromfenol blue.....	0,02 %
glycerol	20 %
SDS (zásobný roztok 10 %).....	4 %

Vzorky v eppendorfkách boli 10 minút povarené vo vodnom kúpeli a pre neskoršie použitie uskladnené pri teplote -20 °C. Vzorky boli podrobené vertikálnej elektroforéze

v 15 % polyakrylamidovom géle (10 minút pri 50 V, 120 minút pri 90 V), ktorého zloženie bolo nasledovné:

5 % polyakrylamidový gél (zarovňavací):

15 % polyakrylamidový gél (separačný):

	5 % gél (ml)	15 % gél (ml)
H₂O	2,05	1,13
1,5M Tris	-	1,25
1 M Tris	0,375	-
10 % SDS	0,03	0,05
AA (30 %)	0,5	2,5
Temed	0,003	0,002
10 % APS	0,06	0,05
spolu	3,018	4,982

SDS = sodium dodecyl-sulfát, APS = amónium persulfát, TEMED = tetrametyl-etyléndiamín,

AA = akrylamid-bis (30 %)

- množstvo proteínu aplikovaného na jednu jamku gélu 12 µg

Po skončení elektroforézy bol gél farbený cez noc pri laboratórnej teplote trepaním v roztoku Commassie Blue (1 % Coomassie Brilliant Blue, 10 % kyselina octová, 40 % metanol). Nasledujúci deň bol gél odfarbovaný 30 minút v odfarbovacom roztoku 1 (7 % kyselina octová, 40 % metanol), následne 2-krát 30 minút v odfarbovacom roztoku 2 (10 % kyselina octová, 5 % metanol). Prítomnosť fúzneho proteínu sa na géle prejavila prítomnosťou signálu s predpokladanou veľkosťou 33 kDa a jeho zvyšujúcou sa intenzitou v závislosti od dĺžky inkubácie kultúry s IPTG. Semikvantitatívnym zhodnotením intenzity signálu u jednotlivých vzoriek bol určený čas potrebný na dosiahnutie maximálnej expresie kuracieho fúzneho proteín.

4.6.5.2. Purifikácia fúzneho proteínu

Fúzny proteín 20β-HSD bol purifikovaný z 250 ml bakteriálnej kultúry po 6 hodinovej indukcii expresie s IPTG. Po skončení inkubácie boli bunky centrifugované 5 minút pri 5000 x g a z pelety buniek bol fúzny proteín extrahovaný systémom „ProBond Ni-NTA Purification System“ (Invitrogen). Tento systém umožňuje oddeliť fúzny proteín obsahujúci sekvenciu 6xHis od ostatných bunkových proteínov po nanosení bunčného homogenátu do chromatografickej kolóny s obsahom Ni-NTA agarózy. Proteín naviazaný na Ni-NTA agarózu bol eluovaný 8 ml roztoku s vysokou koncentráciou imidazolu (250 mM) do ôsmich 1,5 ml

ependorfiok. Po zmeraní koncentrácie proteínu v jednotlivých frakciách metódou s Coomassie Blue (Bradford, 1976), boli frakcie s koncentráciou proteínu nad 1 mg/ml spojené a opäť bola zmeraná koncentrácia proteínu. Čistota proteínu bola následne overená pomocou SDS-Page elektroforézy v 15 % polyakrylamidovom géle.

4.6.5.3. Vyštiepenie enzýmu 20 β -HSD z fúzneho proteínu

Sekvencia pre štiepenie proteázou trombín umožňuje odštiepiť sekvenciu 17 aminokyselín, obsahujúcu sekvenciu 6xHis, od vlastného proteínu 20 β -HSD. Na štiepenie bola v pokuse použitá trombínová agaróza „Thrombim CleanCleave Kit“ (Sigma) obsahujúca imobilizovanú bovinnú proteázu trombín. Pred vlastným štiepením bol rekombinantný fúzny proteín zbavený vysokej koncentrácie imidazolu 24-hodinovou dialýzou v 50-násobnom objeme dialýzačného roztoku so zložením: 50 mM Tris-HCl, 0,25 M sacharóza, pH = 8 pri teplote 4 °C. Dialýzačný roztok bol po prvých 5 hodinách inkubácie vymenený. Po skončení dialýzy bolo 10 mg fúzneho proteínu štiepených trombínovou agarózou vo výslednom objeme 10 ml pri laboratórnej teplote po dobu 5 hodín. Každú hodinu bol z inkubácie odobratý 500 μ l alikvot pre neskoršiu kontrolu štiepenia metódou SDS-Page elektroforézy. Po ukončení štiepenia bola odštiepená, 17 aminokyselín dlhá sekvencia, z roztoku rekombinantného proteínu odstránená jej vychytaním na Ni-NTA agarózu systémom "ProBond Ni-NTA Purification System" (Invitrogen). Rekombinantný proteín sa v tomto prípade nachádzal v supernatante a nevychytil sa na Ni-NTA agarózu. Získaný purifikovaný proteín 20 β -HSD bol následne použitý na test enzýmovej aktivity.

4.6.6. Meranie substrátovej špecificity rekombinantného enzýmu 20 β -HSD

4.6.6.1. Meranie substrátovej špecificity 20 β -HSD – rádiometrická assay

Meranie enzymatickej aktivity purifikovaného proteínu 20 β -HSD prebiehalo v 15 ml sklenených skúmavkách obsahujúcich 1 ml reakčnej zmesi so zložením:

850 μ l inkubačného tlmivého roztoku: 100 mM KCl, 50 mM Tris, pH = 7,5

100 μ g purifikovaného proteínu 20 β -HSD (zásobný roztok 1 mg/ml)

40 μ M NADPH alebo NADH

substrát:

45 nM [3 H]progesterón

45 nM [3 H]dihydrotestosterón (androstanolón)

45 nM [3 H]kortikosterón

Reakcia bola spustená pridaním substrátu a inkubovaná po dobu 3 hodín za stáleho mierneho trepania pri teplote 37 $^{\circ}$ C. Po skončení inkubácie boli skúmavky vložené do ľadu a steroidné látky extrahované a analyzované postupom popísaným v kapitolách 4.3.1. a 4.3.2.

4.6.6.2. Meranie substrátovej špecificity 20 β -HSD – spektrofotometrická assay

Aktivita enzýmu bola meraná v prítomnosti rôznych steroidných substrátov (**tabuľky 6 a 7**) s výslednou koncentráciou 100 μ M (u progesterónu 30 μ M) v kyvete obsahujúcej 1 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH = 7 a kofaktorov NADPH alebo NADP $^+$ (610 μ M) pri teplote 24 $^{\circ}$ C na spektrofotometri PU 8740 UV/VIS (Philips). Kontinuálne bola meraná zmena absorbancie NADPH pri vlnovej dĺžke 340 nm (vlnová dĺžka absorbancie NADPH) po dobu 1 minúty. Pri meraní oxidázovej aktivity enzýmu bol meraný nárast absorbancie, u reductázovej aktivity pokles absorbancie za jednotku času. Reakcia bola spustená pridaním 60 μ g purifikovaného proteínu 20 β -HSD. Na výpočet aktivity bol použitý molárny absorpčný koeficient 6220 M $^{-1}$.cm $^{-1}$ pre NADPH. Jednotku aktivity predstavuje množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje konverziu 1 μ mol substrátu za 1 minútu:

$$\frac{\mu\text{mol steroidu}}{\text{min}} = \frac{\mu\text{mol NADPH}}{\text{min}} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{6,22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}}$$

Aktivitu vyjadrenú v μ mol substrátu/hodinu.mg proteínu bolo možné vypočítať zo vzorca:

$$\frac{\mu\text{mol steroidu}}{\text{mg x hod}} = \frac{(\Delta\text{A340}/\text{min}_{\text{Test}} - \Delta\text{A340}/\text{min}_{\text{Blank}}) \times 10 \times 60}{6,22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}}$$

$\Delta\text{A340}/\text{min}_{\text{Test}}$ = hodnota nameraná u vzorky s pridaným rekombinantným proteínom

$\Delta\text{A340}/\text{min}_{\text{Blank}}$ = hodnota nameraná u vzorky bez rekombinantného proteínu

10 = riedenie proteínu, 60 = prepočet na 1 hodinu

Ako blank (prázdna vzorka) bola vždy zmeraná absorbancia reakčnej zmesi so substrátom a kofaktorom bez pridaného proteínu 20 β -HSD. Hodnoty konverzie steroidných substrátov boli vyjadrené v pmol steroidu/hod.mg rekombinantného proteínu \pm SEM.

Použité substráty:

Meranie reduktázovej aktivity rekombinantného proteínu:

Kofaktor NADPH:

20-reduktázová aktivita

- 4-pregnén-11 β ,21-diol-3,20-dión (kortikosterón)
- 4-pregnén-21-ol-3,11,20-triión (11-dehydrokortikosterón)
- 4-pregnén-3,20-diión (progesterón)
- 4-pregnén-17 α -ol-3,20-diión (17 α -hydroxyprogesterón)
- 5 α -pregnán-3 β -ol-20-ón (5 α -dihydropregnanolon)
- 5 β -pregnán-3 α ,11 β ,21-triol-20-ón
- 5 β -pregnán-3 α ,21-diol-11,20-diión

17-reduktázová aktivita

- 5 α -androstán-3 α -ol-17-ón
- 5 α -androstán-3 β -ol-17-ón

3-reduktázová aktivita

- 5 α -androstán-17 β -ol-3-ón (5 α -dihydrotestosterón)
- 4-androstén-17 β -ol-3-ón (testosterón)

Tabuľka 6. Zoznam použitých steroidných substrátov pre meranie reduktázovej aktivity rekombinantného proteínu.

Meranie oxidázovej aktivity rekombinantného proteínu:

Kofaktor NADP⁺

20-oxidázová aktivita

4-pregnén-20 α -ol-3-ón (20 α -hydroxyprogesterón)

4-pregnén-20 β -ol-3-ón (20 β -hydroxyprogesterón)

4-pregnén-11 β , 20 β , 21-triol-3-ón (20 β -dihydrokortikosterón)

4-pregnén-20 β , 21-diol-3,11-dión (11-dehydro-20dihydrokortikosterón)

17-oxidázová aktivita

5 α -androstán-17 β -ol-3-ón (5 α -dihydrotestosterón)

4-androstén-17 β -ol-3-ón (testosterón)

3-oxidázová aktivita

5 α -androstán-3 β -ol-17-ón

5 α -androstán-3 α -ol-17-ón

Tabuľka 7. Zoznam použitých steroidných substrátov pre meranie oxidázovej aktivity rekombinantného proteínu.

4.7. KVANTIFIKÁCIA EXPRESIE mRNA ENZÝMU 20 β -HSD V KURACÍCH TKANIVÁCH METÓDOU „REAL-TIME“ PCR

Kvantifikácia transkriptu enzýmu prebiehala na prístroji Lightcycler (Roche) s použitím tenkostenných sklenených kapilár a špeciálnej reakčnej zmesi „Lightcycler FastStart Master SYBR Green I“ (Roche) s nasledujúcim zložením:

4 mM MgCl₂
500 nM „forward“ primer
500 nM „reverse“ primer
1 μ l „SYBR green“
H₂O do 9 μ l

Do každej sklenenej kapiláry bolo pridaných 9 μ l pripravenej reakčnej zmesi spolu s 1 μ l 10-krát riedenej cDNA z reverznej transkripcie (príprava vid' kapitola 4.5.1 a 4.5.2.). Kapiláry boli centrifugované 10 sekúnd pri 3000 x g a vložené do Lightcyclera, kde reakcia prebiehala za nasledovných podmienok pri použití uvedených oligonukleotidových primerov:

β -aktin

„primer“ forward TGATATTGCTGCGCTCGTTGTTGA

„reverse“ primer CATGGCTGGGGTGTGTAAGGTCTC

MgCl₂ = 4 mM

preinkubácia a denaturácia:

95 °C, 10 minút

45 cyklov PCR:

95 °C, 15 sekúnd

64 °C, 10 sekúnd

72 °C, 16 sekúnd

analýza teploty topenia:

meranie fluorescencie po 0,1 °C v rozmedzí teplôt 72 - 96 °C

veľkosť produktu: 388 pb

teplota topenia produktu: 89,6 °C

20 β -HSD

„forward“ primer AGGGCTGCATCCACTCTTCC

„reverse“ primer TTTGGCCAACCTTCTTTCTC

MgCl₂ = 4 mM

preinkubácia a denaturácia:

95 °C, 10 minút

45 cyklov PCR:

95 °C, 15 sekúnd

56 °C, 10 sekúnd

72 °C, 17 sekúnd

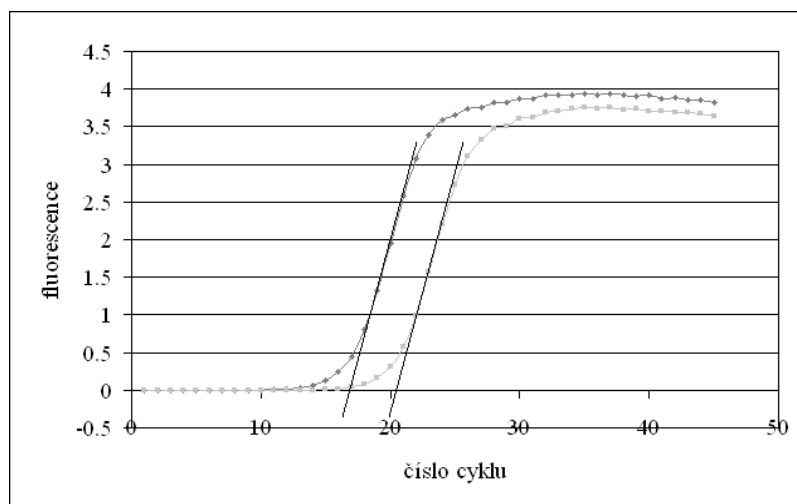
analýza teploty topenia:

meranie fluorescence po 0,1 °C v rozmedzí teplôt 72 - 96 °C

veľkosť produktu: 414 pb

teplota topenia produktu: 84,9 °C

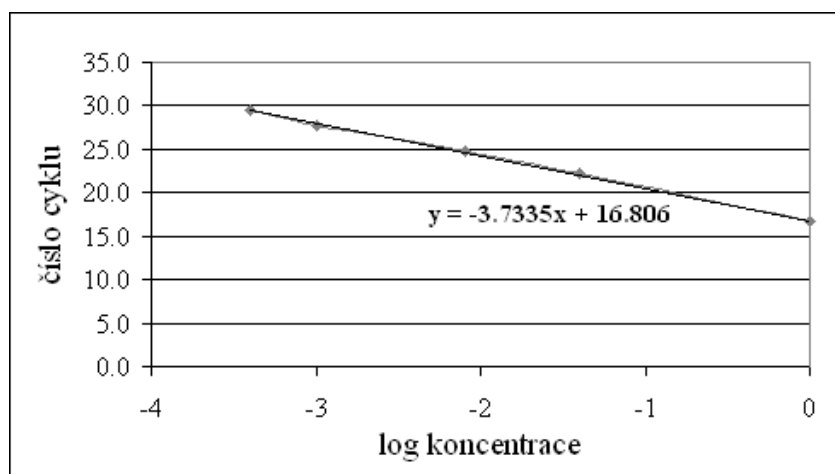
Veľkosť produktu reakcie bola overená elektroforeticky v 1,5 % agarózovom géle. Ako základ pre určenie koncentrácie oboch transkriptov vo vzorkách slúžila veličina tzv. „crossing point“, ktorá predstavuje číslo cyklu v rámci PCR reakcie, v ktorom začína fluorescence lineárne narastať (**obrázok 25**).



Obrázek 25. Určenie crossing point

Kalibračné priamky pre výpočet koncentrácie neznámych vzoriek boli pre každý transkript zmerané na zmesnom vzorku 10-krát nariedenej cDNA. Takto pripravenej cDNA

bola priradená relatívna koncentrácia „1“ a pre ďalšie body kalibračnej priamky bola nariadená 25-, 125-, 1000- a 2500-krát. Týmto riedeniam odpovedajú relatívne koncentrácie $4 \cdot 10^{-2}$, $8 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$ a $4 \cdot 10^{-4}$. Parametre kalibračnej priamky boli spočítané lineárnou regresiou z vynesenia log relatívnej koncentrácie a „crossing point“ (**obrázok 26**). Kvantita mRNA v jednotlivých vzorkách bola u transkriptu 20 β -HSD vyjadrená buď, ako pomer koncentrácie 20 β -HSD a β -aktínu, alebo vzťahnutá na množstvo totálnej RNA použitej na reverznú transkripciu. V dôsledku prítomnosti viacerých premenných v pokuse (pohlavie, rôzne tkanivá použité v pokuse, aplikácia estrogénov), ktoré by mohli významne ovplyvniť expresiu „housekeeping“ génu β -aktínu, bola vo výsledkoch uprednostnená normalizácia na totálnu RNA (u všetkých analyzovaných vzoriek bolo na reverznú transkripciu použitých 6 μ g totálnej RNA).



Obrázok 26. Kalibračná priamka

4.8. ŠTATISTICKÉ METÓDY

Hodnoty konverzie steroidných hormónov tkanivami, EC_{50} vytesňovacieho experimentu a expresie mRNA sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm stredná chyba priemeru (SEM). Pre zistenie štatisticky významných rozdielov medzi jednotlivými skupinami bol použitý dvojitý výberový t-test s rovnosťou, alebo bez rovnosti rozptylov, ktorému predchádzal dvojitý výberový F-test na zistenie rovnosti rozptylov. Veľmi nízke hodnoty nameraných veličín boli testované na významnosť rozdielu od nuly. U všetkých testov bola zvolená hladina štatistickej významnosti $P < 0,5$. Hodnoty EC_{50} u vytesňovacieho experimentu boli pre každý kompetitor vypočítané použitím nelineárnych regresných kriviek analýzy kompetície s jedným väzbovým miestom s použitím programu GraphPad Prism 4.

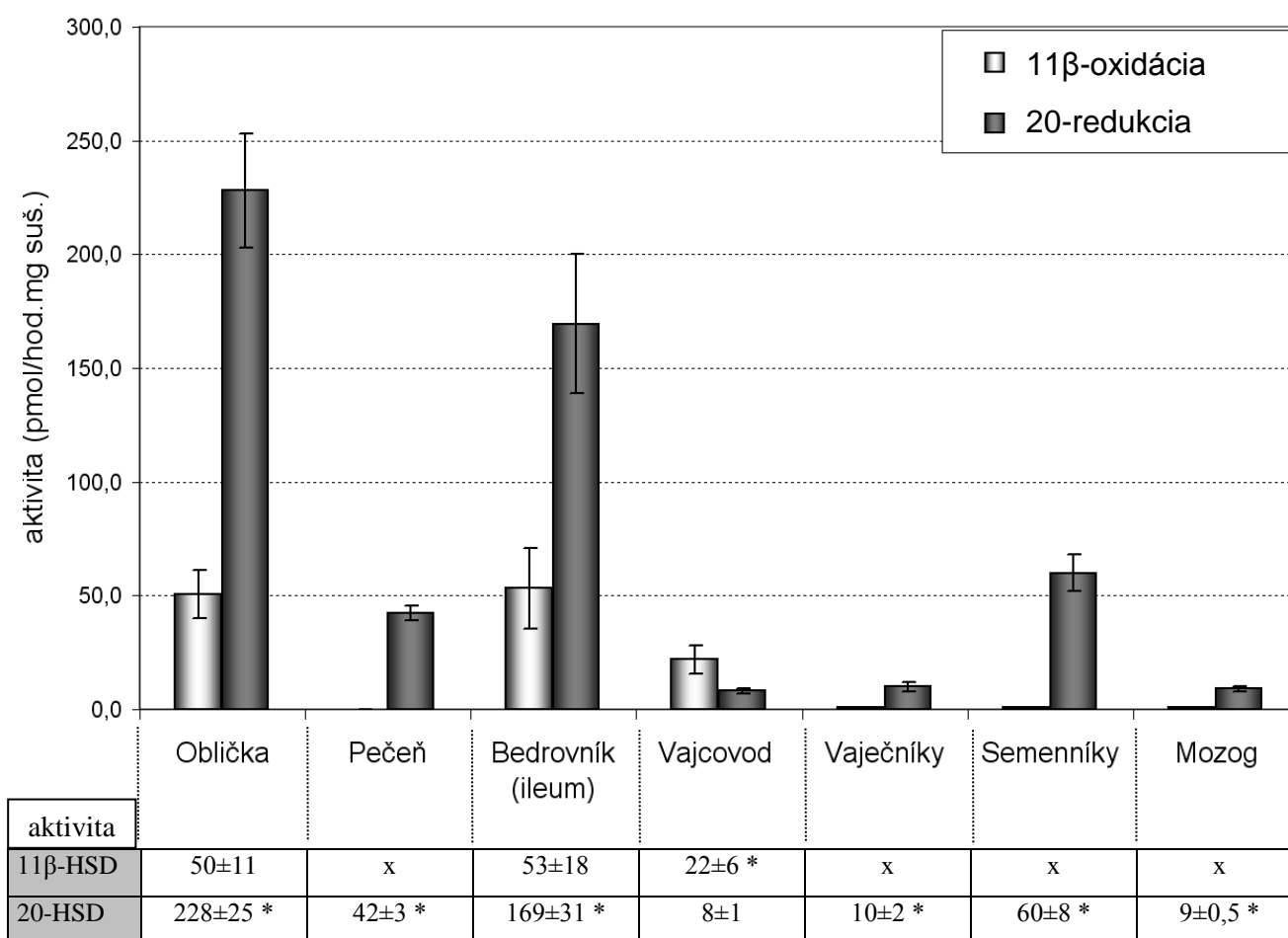
5. VÝSLEDKY

5.1. KONVERZIA STEROIDNÝCH SUBSTRÁTOV TKANIVOVÝMI REZMI

Rezy kuracích tkanív, odobratých zo samíc vo veku 30 dní, boli inkubované so steroidnými substrátmi s funkčnými skupinami na uhlíkoch C₁₁, C₂₀ alebo C₃ so zámerom sledovať distribúciu 11 β -oxidázovej, 20-reduktázovej a 3-reduktázovej aktivity u vtákov.

5.1.1. Konverzia kortikosterónu tkanivovými rezmi

Distribúciu 20-reduktázovej a 11 β -oxidázovej aktivity v kuracích tkanivách som sledoval na substráte kortikosteróne. Tkanivové rezy obličky, pečene, tenkého čreva, vajcovodu, pohlavných orgánov a mozgu boli inkubované s kortikosterónom po dobu 3 hodín. Tkanivá konvertovali tento substrát predovšetkým na 20-dihydrokortikosterón a len v menšej miere na 11-dehydrokortikosterón a 11-dehydro-20-dihydrokortikosterón (**obrázok 27, tabuľka 8**). Najvyššia 20-reduktázová aktivita (vyjadrená ako súčet aktivít pre tvorbu 20-dihydrokortikosterónu a 11-dehydro-20-dihydrokortikosterónu) bola nameraná v obličke a tenkom čreve; nižšia v pečeni a semenníkoch; najnižšia vo vajcovode, vaječníkoch a mozgu. 11 β -oxidázová aktivita (vyjadrená ako súčet aktivít pre tvorbu 11-dehydrokortikosterónu a 11-dehydro-20-dihydrokortikosterónu) bola u väčšiny sledovaných tkanivách významne nižšia než 20-reduktázová aktivita, alebo v niektorých tkanivách úplne chýbala (vaječníky, semenníky, pečeň a mozog). Jedine u tkaniva vajcovodu bola 11 β -oxidázová aktivita vyššia než 20-reduktázová. Pri porovnaní 20-reduktázovej aktivity v pohlavných orgánoch bola v semenníkoch nameraná približne 6-násobne vyššia aktivita než tomu bolo vo vaječníkoch. Tieto výsledky jasne poukazujú na prítomnosť dvoch systémov inaktivácie kortikosterónu v kuracích tkanivách a to predovšetkým v mineralokortikoidných cieľových tkanivách (obličky, tenké črevo).



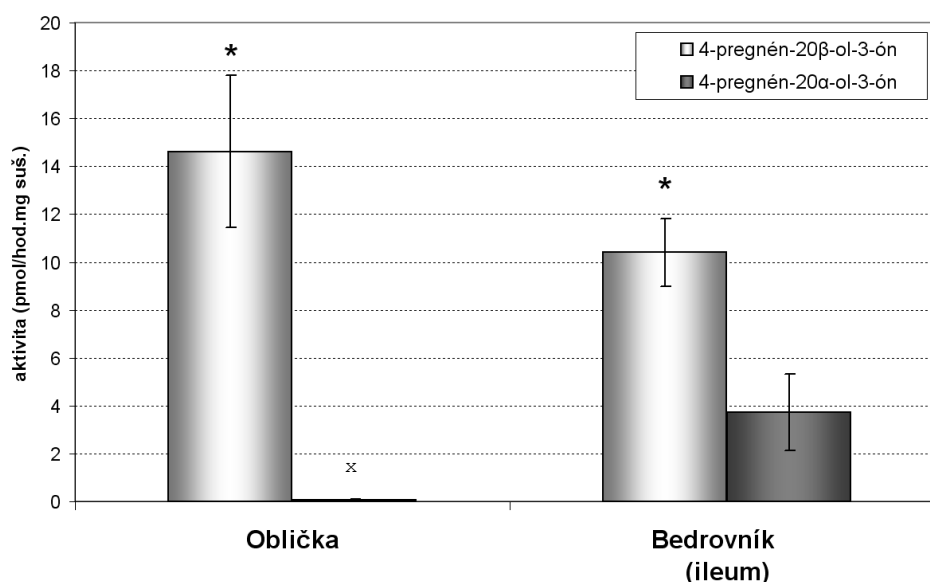
Obrázok 27 a tabuľka 8. Hodnoty konverzie kortikosterónu tkanivovými rezmi. Hodnoty boli vyjadrené v pmol substrátu/hodinu.mg sušiny tkaniva ± SEM, n = 7-10. Hodnoty 11β-HSD aktivity vo vaječníkoch, semeníkoch a mozgu neboli významne odlišné od nuly. Vajcovod pochádzal zo zvierat stimulovaných po dobu 7 dní s DES. x = hodnoty konverzie neboli významne odlišné od nuly.

* štatisticky významný rozdiel medzi 11β-HSD a 20-HSD aktivitou nameranou v tkanive, ($P < 0,5$)

5.1.2. Konverzia progesterónu tkanivovými rezmi

Tento pokus bol predovšetkým zameraný na určenie stereošpecificity enzýmov zabezpečujúcich u kura vysoký stupeň redukcie keto-skupiny na uhlíku C₂₀. Nedostupnosť 20α-epiméru (20α-dihydrokortikosterónu) nedovoľovala na substráte kortikosteróne v predchádzajúcom pokuse dostupnými technikami určiť stereošpecificitu týchto enzýmov. To je jeden z dôvodov prečo bol v tomto pokuse použitý ako substrát progesterón. Progesterón je, podobne ako kortikosterón, C₂₁ steroid s keto-skupinou na uhlíku C₂₀ a tiež predstavuje fyziologický substrát enzýmu 20β-HSD u cicavcov. Na **obrázku 28** je zobrazený graf konverzie progesterónu tkanivom obličky a tenkého čreva. Progesterón bol tkanivom obličky

metabolizovaný výhradne na 20β -dihydroprogesterón ($14,6\pm 3,2$ vs 0 pmol/hod.mg sušiny). V prípade tenkého čreva bol medzi produktmi metabolizmu progesterónu, okrem 20β -dihydroprogesterónu, v menšom množstve prítomný aj 20α -dihydroprogesterón ($10,4\pm 1,4$ vs $3,7\pm 1$ pmol/hod.mg sušiny). Tieto výsledky poukazujú na prítomnosť 20β -stereošpecifických enzýmov v obličkách vtákov, kým v čreve na prítomnosť enzýmu/enzýmov s $20\alpha/\beta$ -reduktázovou aktivitou.

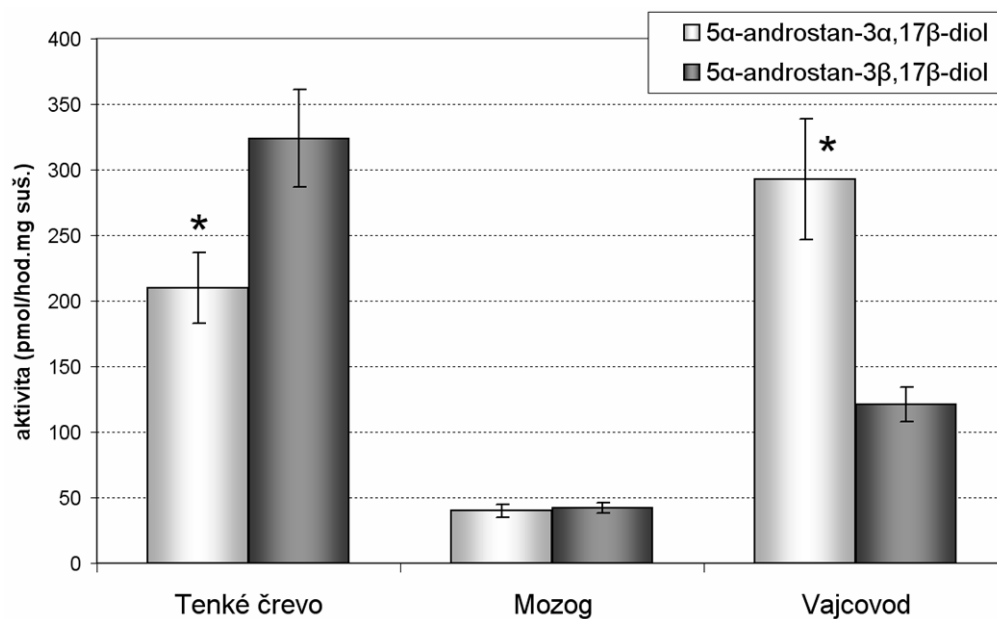


Obrázok 28. Konverzia progesterónu tkanivovými rezmi. Hodnoty boli vyjadrené v pmol substrátu/hodinu.mg sušiny tkaniva \pm SEM, $n = 10$. x = hodnoty konverzie neboli významne odlišné od nuly.

* štatisticky významný rozdiel v tvorbe α a β epiméru tkanivom ($P < 0,05$)

5.1.3. Konverzia androstanolónu tkanivovými rezmi

Keďže existuje viacero prác popisujúcich u cicavcov polyfunkčné hydroxysteroid dehydrogenázy majúce okrem 20 -HSD aktivity aj 3α -HSD alebo $3\alpha/\beta$ -HSD aktivitu, sledoval som konverziu C_{19} steroidu androstanolónu (5α -dihydrotestosterónu) s keto-skupinou na uhlíku C_3 tkanivami. Pri inkubácii androstanolónu s tkanivom tenkého čreva, mozgu a vajcovodu bola pozorovaná výrazná 3α - ako aj 3β -reduktázová aktivita. Tkanivo tenkého čreva redukovalo androstanolón predovšetkým na 3β -epimér a v menšej miere na 3α -epimér (324 ± 37 vs 210 ± 27 pmol/hod.mg sušiny, $P < 0,05$), kým naopak tkanivo vajcovodu redukovalo tento substrát predovšetkým na 3α -epimér (121 ± 13 vs 293 ± 46 pmol/hod.mg sušiny, $P < 0,05$). Najnižšiu 3 -reduktázovú aktivitu vykazovalo tkanivo mozgu, kedy vznikali obidva epiméry v približne rovnakom množstve (42 ± 4 vs 40 ± 5 pmol/hod.mg sušiny) (**obrázok 29**).



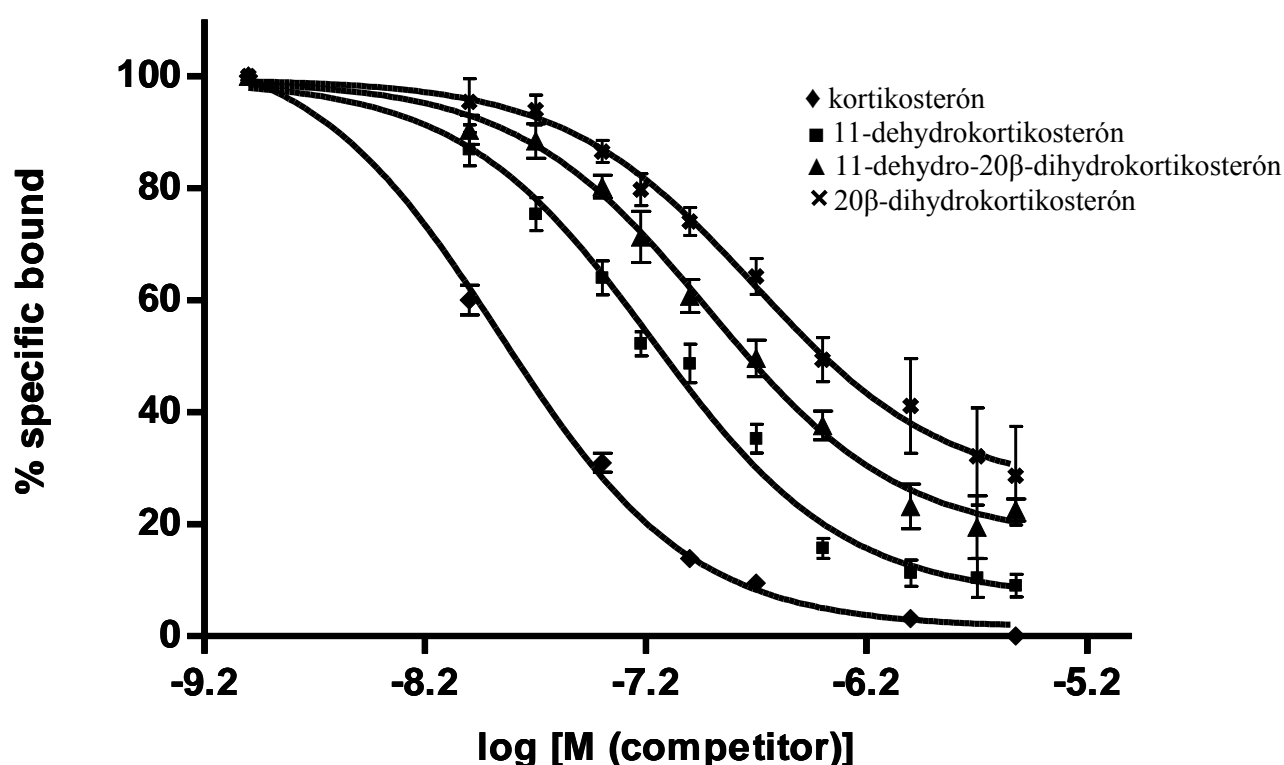
Obrázok 29. Konverzia androstanolónu (5α -duhydrotestosterónu) tkanivovými rezmi. Hodnoty boli vyjadrené v pmol substrátu/hodinu.mg sušiny tkaniva \pm SEM, $n = 7-14$. Vajcovod pochádzal zo zvierat stimulovaných po dobu 7 dní s DES.

* štatisticky významný rozdiel oproti 5α -androstan- 3β , 17β -diolu, $P < 0,05$

Výsledky inkubácie kuracích tkanív dokazujú prítomnosť enzýmov s 11β -oxidázovou, 20α - a 3 -reduktázovou aktivitou v kuracích tkanivách. 3 -reduktázová aktivita pritom predstavovala najvyššiu nameranú aktivitu, kým 11 -oxidázová najnižšiu. Zjavné rozdiely v zastúpení 3α - a 3β -redukcie, ako aj 20α - a 20β -redukcie v jednotlivých sledovaných tkanivách poukazujú na možný metabolizmus steroidných substrátov viacerými enzýmami s rôznou stereošpecifitou.

5.2. CHARAKTERIZÁCIA MINERALOKORTIKOIDNÉHO RECEPTORA – VYTESŇOVACÍ EXPERIMENT

Výsledky predchádzajúcich pokusov dokázali prítomnosť dvoch odlišných mechanizmov inaktívácie kortikosterónu tkanivami kurčiat (11 β -oxidácia a 20-redukcia). Tento pokus bol preto zameraný na určenie toho, ako dva typy modifikácie molekuly kortikosterónu ovplyvňujú jeho afinitu k mineralokortikoidnému receptoru. Rádioaktívne označený kortikosterón (20 nM) bol z väzby na MR vytesňovaný zvyšujúcimi sa koncentraciami neznačených 11-dehydro- a 20-dihydro-derivátov.



Obrázok 30. Graf znázorňujúci závislosť množstva [^3H]kortikosterónu naviazaného na MR od logaritmu koncentrácie použitého kompetitora.

Z grafu na **obrázku 30** a výsledkov v **tabuľke 9** je zjavné, že na vytesnenie 50% rádioaktívne značeného kortikosterónu z MR bolo potrebné použiť približne 5-krát vyššiu koncentráciu 11-dehydrokortikosterónu než pri aplikácii neznačeného kortikosterónu; u 11-dehydro-20 β -dihydrokortikosterónu 10-krát vyššiu koncentráciu a približne 14-krát vyššiu koncentráciu u 20 β -dihydrokortikosterónu. Podľa týchto výsledkov je preto možné afinitu MR k sledovaným substrátom vyjadriť nasledovne: Kortikosterón \gg 11-dehydrokortikosterón $>$ 11-dehydro-20 β -dihydrokortikosterón \geq 20 β -dihydrokortikosterón.

KOMPETITOR	EC ₅₀ (μM)
kortikosterón	13,9 ± 1,4 *
11-dehydrokortikosterón	60,5 ± 12,7 *
11-dehydro-20β-dihydrokortikosterón	112,4 ± 16,2 †
20β-dihydrokortikosterón	157,5 ± 16,7 †

Tabuľka 9. Namerané hodnoty EC₅₀ použitých kompetitorov [³H]kortikosterónu pri väzbe na MR.

* štatisticky významný rozdiel oproti ostatným kompetitorom, (P < 0,05)

† štatisticky významný rozdiel oproti kortikosterónu a 11-dehydrokortikosterónu, (P < 0,05)

Namerané hodnoty EC₅₀ uvedené v **tabuľke 9** dokazujú, že redukcia molekuly kortikosterónu na uhlíku C₂₀ výraznejšie znižuje jeho afinitu k MR než 11β-oxidácia. Zaujímavé je, že v prípade samotnej 20β-redukcie molekuly kortikosterónu (20β-dihydrokortikosterón) dôjde k ešte výraznejšiemu poklesu afinity k MR než pri dvojitej modifikácii (11-dehydro-20β-dihydrokortikosterón). Tento rozdiel však nebol štatisticky významný na hladine významnosti P < 0,05.

Z kriviek pre jednotlivé kompetitory uvedených v grafe na obrázku 30 taktiež nie je možné vylúčiť prítomnosť aj iného väzbového miesta s nižšou afinitou ku kortikosterónu, s ktorým jednotlivé 11-dehydro a 20-dihydroderiváty nekompetujú. To by mohlo vysvetliť, prečo pri vysokej koncentrácii 11-dehydro a 11-dehydro-20-dihydrokortikosterónu je približne 30 % značeného kortikosterónu stále vo väzbe.

5.3. IDENTIFIKÁCIA cDNA SEKVENCIE KURACIEHO PROTEÍNU 20 β -HSD

V kuracej databáze EST (NCBI) som na základe sekvenčnej homológie so známymi sekvenciami u iných stavovcov identifikoval cDNA fragmenty, ktorých vzájomným prekryvom som získal pravdepodobnú cDNA sekvenciu kuracieho enzýmu 20 β -HSD. Identifikovaný čítací rámec z dĺžkou 834 bp kódoval proteín dlhý 276 aminokyselín (30,45 kDa).

	<i>D. rerio</i>	<i>P. altivelis</i>	<i>O. mykiss</i>	Kura	Myš	Potkan	Králik	Prasa	Orangutan
Človek	61	61	60	78	86	85	83	84	98
Orangutan	61	61	60	78	86	85	83	84	-
Prasa	58	59	58	73	79	80	78	-	84
Králik	60	60	58	72	80	80	-	78	83
Potkan	62	63	61	75	89	-	80	80	85
Myš	61	61	60	75	-	89	80	79	86
Kura	64	60	60	-	75	75	72	73	78
<i>O. mykiss</i>	81	84	-	60	60	61	58	58	60
<i>P. altivelis</i>	79	-	84	60	61	63	60	59	61

Tabuľka 10. Porovnanie zloženej aminokyselínovej sekvencie kuracieho enzýmu 20 β -HSD so známymi sekvenciami tohto enzýmu u iných stavovcov. Aminokyselínová sekvenčná homológia bola vyjadrená v %. *O. mykiss* = *Oncorhynchus mykiss*, *P. altivelis* = *Plecoglossus altivelis*, *D. rerio* = *Danio rerio*.

Porovnaním takto získanej cDNA sekvencie so známymi sekvenciami enzýmu 20 β -HSD u iných stavovcov pomocou internetového programu ClustalW (EMBL-EBI) bol určený stupeň aminokyselínovej sekvenčnej homológie. Kuracia cDNA sekvencia vykazovala najvyššiu sekvenčnú homológiu so sekvenciou karbonyl reduktázy 1 cicavcov (72-78 %); nižšiu homológiu s cDNA sekvenciami tohto enzýmu u zástupcov rýb (60-64 %) (**tabuľka 10**).

Na **obrázku 31** je graficky znázornené porovnanie aminokyselínovej sekvencie kuracieho enzýmu so známymi sekvenciami u iných stavovcov. V obrázku sú zvýraznené aminokyseliny kľúčové pre tvorbu aktívneho miesta a úspešný priebeh enzymatickej katalýzy, v súlade s ich lokalizáciou u prasačieho enzýmu 20 β -HSD (podľa databázy SWISS-PROT www.expasy.org a Ghosh *et al.*, 2001): kofaktor viažuce miesto na N-konci proteínu-Rossmannov záhyb (Gly-X-X-X-Gly-X-Gly); Ser140 zabezpečujúci väzbu substrátu; sekvencia (Tyr194-X-X-X-Lys198) kde Tyr194 slúži ako akceptor protónu a predstavuje tak hlavnú katalytickú jednotku (**Obrázky 31 a 32**).

Človek	MSSGIHVALVTGGNKGI GLAI VRDLCLR-LFSGDVVLTARDVTRGQAAVQQLQAEGLS-PR	58
Orangutan	MSSGMHVALVTGGNKGI GLAI VRDLCLR-LFSGDVVLTARDVARGQAAVQQLQAEGLS-PR	58
Prasa	MSSNTRVALVTGANKGIGFAI VRDL CLR-QFAGDVVLTARDVARGQAAVQQLQAEGLS-PR	58
Králik	MPSDRRVALVTGANKGVGF AI TRALCLR-LFSGDVVLTARDEAQQQAAVQQLQAEGLS-PR	58
Potkan	MSSDRPVALVTGANKGIGFAI VRDL CLR-KFLGDVVLTARDESRGHEAVKQLQTEGLS-PR	58
Myš	MSSSRPVALVTGANKGIGFAI TRDL CLR-KFSGDVVLAARDEERGQTAVQKLQAEGLS-PR	58
Kura	MS-NVPVAVVTGSNKGIGLAIVRDLCK-QFKGDVYLTARDPARGQEAVAKLQEGLH-PL	57
<i>O. mykiss</i>	MS--KKVAVVTGANKGIGLAI VREL CKAKFTGDVILTARNEKLGNEAVKMLKSEGFE-VS	57
<i>P. altivelis</i>	MS--KKVAVVTGGNKGI GFAI VKELCKAKFPGDVILTARNEKLGKGAVELLKSEGFE-VT	57
<i>D. rerio</i>	MS--KKVAVVTGANKGIGLAI VKGL CKAGFTGDILTARNEKLGQEA IAGLQ SEGFKNVV	58
	*. **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*	
Človek	FHQLDIDDLQSIRALRDFLRKEYGGLDVLVNNAGIAFKVADPTPFHIAEVTMKTNFFGT	118
Orangutan	FHQLDIDDLQSIRALRDFLRKEYGGLDVLVNNAGIAFKVADPTPFHIAEVTMKTNFFGT	118
Prasa	FHQLDIDDLQSIRALCDFLRKEYGGLDVLVNNAAIAFQLDNPTPFHIAEVTMKTNFMGT	118
Králik	FHQLDITDLQSIRALRDFLRAYGGLNVLVNNAIAFKMEDTTPFHIAEVTMKTNFDGT	118
Potkan	FHQLDIDNPQSIRALRDFLLQ EY GGLNVLVNNAIAFKVVDPTPFHIAEVTMKTNFFGT	118
Myš	FHQLDIDNPQSIRALRDFLLQ EY GGLDVLVNKAGIAFKVNDPTPFHIAEVTMETNFFGT	118
Kura	FHQLDIDDLQSIKVLRDFLKEKYGGLNVLVNNAIAFKVSDRTPFAVQAEVTLKTNFFGT	117
<i>O. mykiss</i>	YHHLDICDQGS AKQL SNFLQKTYGGLDVLINNAGMAFKNDATETTFGEAEVTMRTNFWGT	117
<i>P. altivelis</i>	FQHLDICDQGS AVKLR DFLQNTYGGGLDVLVNNAGIAFKNDATETPFGEAEVTMRTNFWGT	117
<i>D. rerio</i>	FHQLDICDQGS CMKLLK FLEEKYGGGLDVLINNAGIAFKNAATEPFGEAEVTMRTNFWGT	118
	:::*** : * * .** . ****:*:*:* :** : * **:*:*:** **	
Človek	RDVCTELLPLIKPQGRVVNVSSIMSVRALKSCSPELQQKFRSETITEEELVGLMNKFVED	178
Orangutan	RDVCTELLPLIKPQGRVVNVSSIMSVRALKSCSPELQQKFRSETITEEELVGLMNKFVED	178
Prasa	RNVCTELLPLIKPQGRVVNVSSIEGVRALNECSPELQQKFRSETITEEELVGLMNKFVED	178
Králik	RDVCTELLPLMRPGRVVNVSSMTCLRALKSCSPELQQKFRSETITEEELVGLMKNKFVED	178
Potkan	QDVCKELLPIIKPQGRVVNVSSVSLRALKSCSPELQQKFRSETITEEELVGLMNKFVED	178
Myš	RDVCTELLPLIKPQGRVVNVSSMVSRLAKNCRLELQQKFRSETITEEELVGLMNKFVED	178
Kura	RNICTELLPLIKPYGRVVNVSSMVISALGGCSQELQKFRSDTITEDELVELMTKFVED	177
<i>O. mykiss</i>	LWVCHALLPLLRPNARVVNVSSFVSKKALDTCSPQLQAKFRDTELSEELCLLMGQFVIA	177
<i>P. altivelis</i>	LWVSHALIPILRPNARVVNVSSFVSKRALDQCS PQLQAKFRDPKLT EEELCGLMGFEVTA	177
<i>D. rerio</i>	LWACHALLPILRANARVVNVSSFVSKSLDQCSAELQAKFRNKDLSEELCLLMGFEVQD	178
	. *:*:*:. .***** :* * :** **:. :*:** ** :*:	
Človek	TKKGVHQKEGW PSSAY GVTKIGVTVLSRIHARKLSEQRKGDKILLNACCPGWVRTDMAGP	238
Orangutan	TKKGVHQKEGW PSSAY GVTKIGVTVLSRIHARKLSEQRKGDRIILLNACCPGWVRTDMAGP	238
Prasa	TKNGVHRKEGWS DSY GVTKIGVSVLSRIYARKLREQRAGDKILLNACCPGWVRTDMGGP	238
Králik	TKKGVHQTEGW PDTAY GVTKMGVTVLSRIQARHLSEHRGGDKILLNACCPGWVRTDMGGP	238
Potkan	AKKGVHAKEGW PNSAY GVTKIGVTVLSRIYARKLNEERREDKILLNACCPGWVRTDMAGP	238
Myš	TKKGVHAE EGW PNSAYGVTKIGVTVLSRI LARKLNEQR REDKILLNACCPGWVRTDMAGP	238
Kura	TKKSVHEKEGWPNTAYGVSKIGVTVLSRIQARMLNEKRKGDHILLNACCPGWVRTDMAGP	237
<i>O. mykiss</i>	AQQGNHQAQGW PNTAY GTTKIGVTVLSRIQAHYLTKTRAADGILLNACCPGWVRTDMAGS	237
<i>P. altivelis</i>	AQNGSHQAEGW PNTAY GTTKIGATVLSMIQARELTKTRSGDGILLNACCPGWVRTDMAGD	237
<i>D. rerio</i>	AQAGDHS AKGW PNTAYGTTKIGVTVLSRIQARVLNETRPGDGILLNACCPGWVRTDMAGP	238
	:: . * :***:. :*:*:* ** * * : * : * * **:******.*	
Človek	KATKSPEEGAETPVYLALLPPDAEGPHGQFVSEKRVQW-----	277
Orangutan	KATKSPEEGAETPVYLALLPPDAEGPHGQFVSEKRVQW-----	277
Prasa	KAPKSPVEGAETPVYLALLPSDAEGPHGQFVTDKKVVEWGVPPESYPWVNA	289
Králik	NATKSPEEGAETPVYLALLPPDAEGPHGQFVMDKKVEQW-----	277
Potkan	KATKSPEEGAETPVYLALLPPGAEGPHGQFVQDKKVEPW-----	277
Myš	KATKSPEEGAETPVYLALLPPDAEGPHGQFVQDKKVEPW-----	277
Kura	KAPKSPEEGAETPVYLALLPSDADGPHGQFVSEKTVRTW-----	276
<i>O. mykiss</i>	KAPKSPEEGAQTPTYLALLPEGAKEPHGQLVWDKTVQEW-----	276
<i>P. altivelis</i>	KAPKSPEEGAQTPTYLALLPAGAKEPHGQLVWDKVVQEW-----	276
<i>D. rerio</i>	KAPKSPEEGAETPVYLALLPEGAKEPHGQLVWDKTVQEW-----	277
	:* **** **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*	

(Obrázok 31). Porovnanie zloženej aminokyselinovej sekvencie kuracieho enzýmu 20β-HSD so známymi sekvenciami tohto enzýmu u iných stavovcov. Zvýraznené sú aminokyseliny podstatné pre enzymatickú katalýzu enzýmu 20β-HSD (identifikované a popísané u prasašieho enzýmu v práci Ghosh *et al.*, (2001). *O. mykiss* = *Oncorhynchus mykiss*, *P. altivelis* = *Plecoglossus altivelis*, *D. rerio* = *Danio rerio*.

"*" aminokyseliny sú rovnaké pre všetky porovnané sekvencie

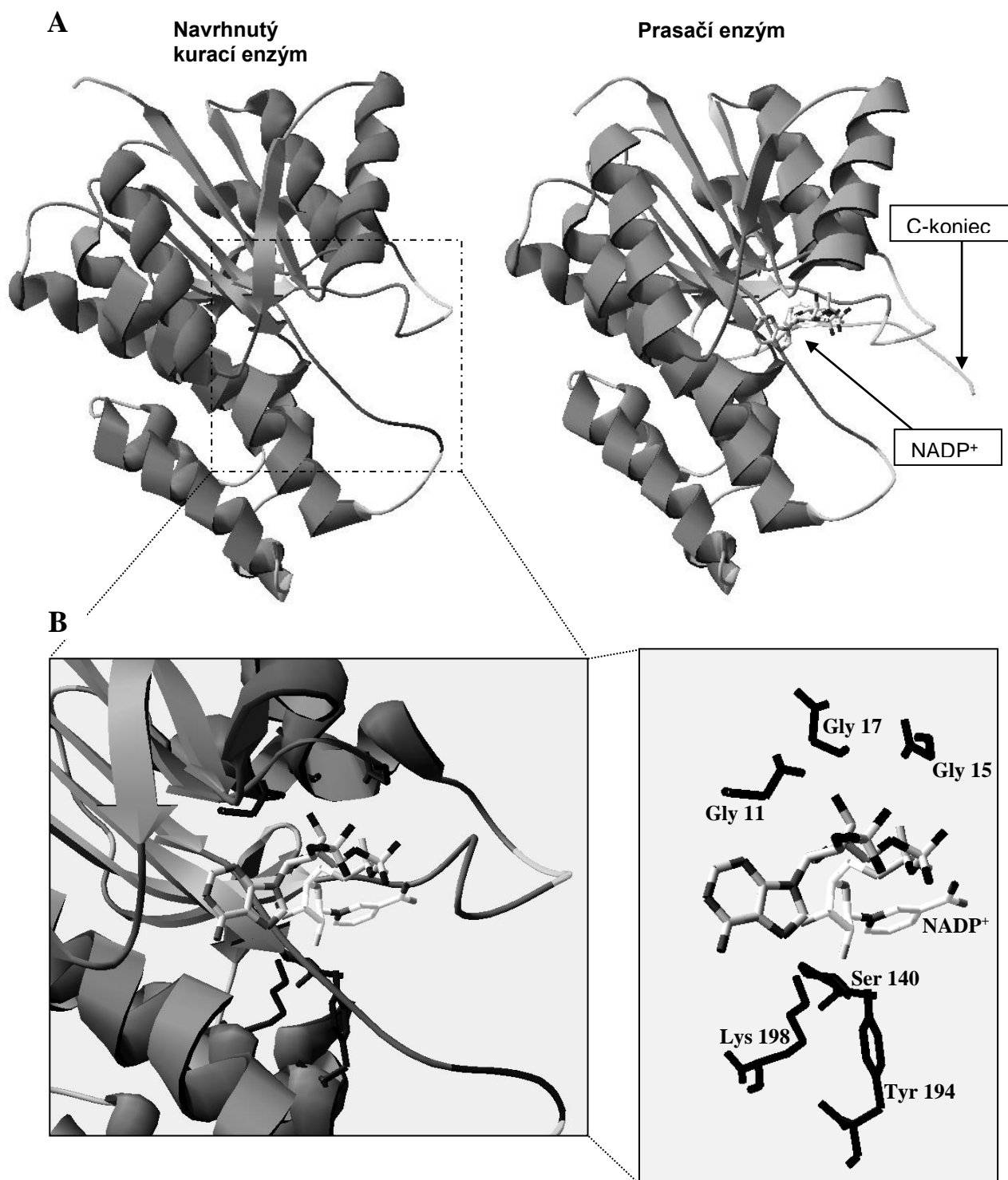
":" u aminokyselín v danom stĺpci sú možné konzervované substitúcie

"." u aminokyselín v danom stĺpci sú možné semi-konzervované substitúcie

Pomocou internetovej aplikácie SWISS-MODEL (www.expasy.org) a programu PDBViewer bol vygenerovaný troj-rozmerný model pre navrhnutú aminokyselinovú sekvenciu kuracieho enzýmu (**obrázok 32A a B**). Ako templát pri modelovaní bol použitý známy 3D model prasačieho enzýmu v komplexe s kofaktorom NADP⁺ (SWISS-MODEL templát: 1n5dA, Ghosh *et al.*, 2001). Na vytvorených 3D modeloch kuracieho i prasačieho proteínu jasne vidieť 7 centrálne umiestnených β -skladaných listov s postrannými α -hélixami, ktoré sú charakteristickou črtou super-rodiny SDR dehydrogenáz. Taktiež je u 3D modelov zjavná identická lokalizácia aminokyselín podstatných pre tvorbu aktívneho miesta enzýmu (**obrázok 32B**).

U 3D modelu prasačieho proteínu v **obrázku 31A** je dobre viditeľná unikátna C-terminálna sekvencia 12 aminokyselín, ktorá sa u tohto proteínu nevyskytuje u žiadneho z ostatných zástupcov stavovcov (zelený reťazec).

Výsledky získané porovnaním primárnej a terciárnej štruktúry zloženej sekvencie kuracieho enzýmu so známymi sekvenciami, predovšetkým však so sekvenciou prasačieho proteínu 20 β -HSD dokazujú, že sa pravdepodobne jedná o jeho kurací homológ. Pre definitívne potvrdenie tohto predpokladu bola zložená sekvencia v ďalších pokusoch rekombinantne exprimovaná v baktériách *Escherichia coli* a na čistom proteíne bola stanovená substrátová špecificita rekombinantného enzýmu.



Obrázku 32. Trojrozmerný model kuracieho enzýmu 20 β -HSD vytvorený pomocou internetovej aplikácie SWISS-MODEL (www.expasy.org) a programu PDBViewer. A. Model kuracieho proteínu (v ľavo), model prasačieho proteínu (v pravo). B. detail kofaktor a substrát viažuceho miesta. Zvýraznené sú aminokyseliny Gly11, Gly17, Gly15 Rosmannovho záhybu a hlavné aminokyseliny katalytického miesta: Ser140, Tyr194, Lys198 (podľa databázy SWISS-PROT, www.expasy.org a Ghosh *et al.*, 2001).

5.3.1. Sekvenácia zloženej sekvencie kuracieho enzýmu 20 β -HSD

Aby som zistil či *in silico* zložená sekvencia kuracieho enzýmu 20 β -HSD odpovedá sekvencii skutočne prítomnej u kurčiat, boli na zloženú sekvenciu navrhnuté oligonukleotidové PCR primere. Primere boli navrhnuté tak, aby medzi sebou obsahovali celý čítací rámec sekvencie a pomocou nich bola sekvencia amplifikovaná metódou PCR. Po vložení amplifikovanej sekvencie do sekvenačného vektoru pGEM T-EASY a kompetentných baktérií *Escherichia coli* (JM109) bola sekvencia overená sekvenáciou. Na **obrázku 33** je porovnanie teoretickej sekvencie overenej sekvenáciou so sekvenciou získanou zo serveru Ensembl (www.ensembl.org). Nukleotidová sekvencia získaná sekvenáciou sa zhodovala s navrhnutou sekvenciou ako aj s počítačovo vygenerovanou sekvenciou uvedenou v databáze serveru Ensembl. Zložená sekvencia bola nakoniec zaslaná do databázy GenBank a je v nej uvedená pod prístupovým číslom DQ079061.

20βHSD	CGCAGTTGCTGCTGGTCGGTCGGCCCTTCCAGCGCTGAGGAGTGCGGGAAGGTGTGTGG	60
predicted20βHSD	-----	
20βHSD	TGCTGGAGTGACTGTTGCTTTGGCATCCATCCTGAGAAGATAATGTCCAACGTACCCGTG	120
predicted20βHSD	-----ATGTCCAACGTACCCGTG	18

20βHSD	GCTGTGGTGACCGGCTCCAACAAGGGATTGGATTGGCGATTGTGCGGGATCTGTGCAAG	180
predicted20βHSD	GCTGTGGTGACCGGCTCCAACAAGGGATTGGATTGGCGATTGTGCGGGATCTGTGCAAG	78

20βHSD	CAGTTC AAGGGGATGTGTACCTTACTGCCCGAGACCCTGCCCGTGGTCAGGAAGCAGTG	240
predicted20βHSD	CAGTTC AAGGGGATGTGTACCTTACTGCCCGAGACCCTGCCCGTGGTCAGGAAGCAGTG	138

20βHSD	GCAAAGCTTCAGGAGGAAGGGCTGCATCCACTCTTCCACCAGCTGGATATTGATGATCTG	300
predicted20βHSD	GCAAAGCTTCAGGAGGAAGGGCTGCATCCACTCTTCCACCAGCTGGATATTGATGATCTG	198

20βHSD	CAAAGCATCAAAGTCTTGC GGACTTCCTAAAGGAGAAGTATGGAGGCTGAATGTGTTG	360
predicted20βHSD	CAAAGCATCAAAGTCTTGC GGACTTCCTAAAGGAGAAGTATGGAGGCTGAATGTGTTG	258

20βHSD	GTTAACAATGCAGGGATTGCTTTCAAAGTTAGCGACAGAACTCCATTTGCAGTCCAAGCA	420
predicted20βHSD	GTTAACAATGCAGGGATTGCTTTCAAAGTTAGCGACAGAACTCCATTTGCAGTCCAAGCA	318

20βHSD	GAGGTTACTACTGAAGACAAACTTTTTTGG AACCAGGAATATTTGCACAGAATTTGTGCCT	480
predicted20βHSD	GAGGTTACTACTGAAGACAAACTTTTTTGG AACCAGGAATATTTGCACAGAATTTGTGCCT	378

20βHSD	CTTATAAAGCCTTATGGTAGAGTGGTGAATGTCTCTAGCATGGTAAGTATCTCAGCTCTG	540
predicted20βHSD	CTTATAAAGCCTTATGGTAGAGTGGTGAATGTCTCTAGCATGGTAAGTATCTCAGCTCTG	438

20βHSD	GGAGGCTGTAGCCAAGAAGTGCAGAAGAAGTCCGCAGTGACACAATCACTGAGGATGAG	600
predicted20βHSD	GGAGGCTGTAGCCAAGAAGTGCAGAAGAAGTCCGCAGTGACACAATCACTGAGGATGAG	498

20βHSD	TTAGTGGAGCTCATGACGAAGTTTGTGGAAGATACTAAGAAAAGTGTGCATGAGAAAGAA	660
predicted20βHSD	TTAGTGGAGCTCATGACGAAGTTTGTGGAAGATACTAAGAAAAGTGTGCATGAGAAAGAA	558

20βHSD	GGTTGGCCAAACACTGCTTATGGGGTATCCAAAATTGGTGTACGGTCTTATCTAGAATT	720
predicted20βHSD	GGTTGGCCAAACACTGCTTATGGGGTATCCAAAATTGGTGTACGGTCTTATCTAGAATT	618

20βHSD	CAAGCCGGATGTTAAATGAGAAAAGAAAAGGTGACCACATCCTTCTTAATGCCTGCTGT	780
predicted20βHSD	CAAGCCGGATGTTAAATGAGAAAAGAAAAGGTGACCACATCCTTCTTAATGCCTGCTGT	678

20βHSD	CCTGGATGGGTGAGAACAGACATGGCAGGTCCAAAGGCCCTAAATCACCAGAGGAAGGG	840
predicted20βHSD	CCTGGATGGGTGAGAACAGACATGGCAGGTCCAAAGGCCCTAAATCACCAGAGGAAGGG	738

20βHSD	GCCGAGACCCTGTTTACTTAGCCCTTCTGCC TTCTGATGCTGATGGTCTCATGGCCAG	900
predicted20βHSD	GCCGAGACCCTGTTTACTTAGCCCTTCTGCC TTCTGATGCTGATGGTCTCATGGCCAG	798

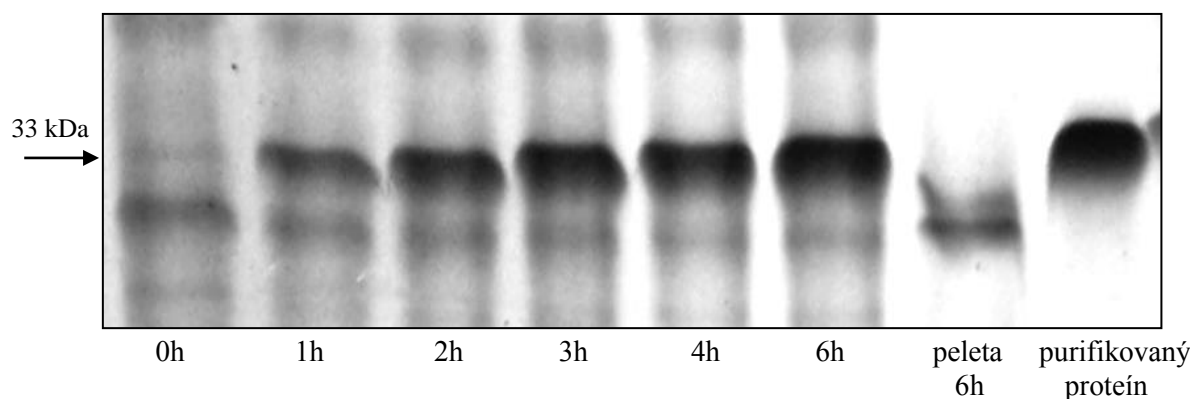
20βHSD	TTTGTAGTGAGAAAAGTGTTCGAACCTGGTAAACTTAACATCTGTGGACCTTGCAAGT	960
predicted20βHSD	TTTGTAGTGAGAAAAGTGTTCGAACCTGGTAAACTTAACATCTGTGGACCTTGCAAGT	858

Obrázok 33. Porovnanie sekvenáciou overenej sekvencie kuracieho proteínu 20β-HSD s počítačom vygenerovanou sekvenáciou uvedenou v databáze Ensemble Project. Predicted20β-HSD = vygenerovaná sekvencia z databázy Ensemble Project, 20β-HSD = navrhnutá a sekvenáciou overená sekvencia.

5.4. PRÍPRAVA A PURIFIKÁCIA REKOMBINANTNÉHO PROTEÍNU

20 β -HSD

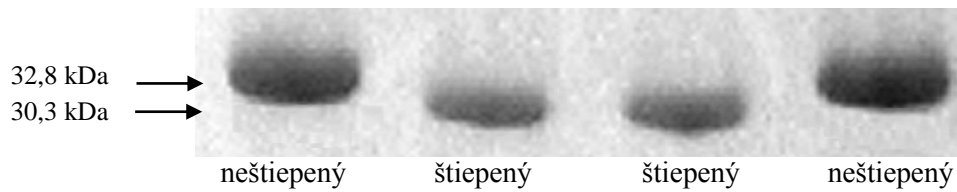
Baktérie *Escherichia coli* kmeňa BL21 (DE3) boli transformované plazmidom pET-15b obsahujúcim sekvenciu kuracieho enzýmu 20 β -HSD. Po dosiahnutí optickej denzity kultúry OD₆₀ = 0,4 – 0,6 (stredne-logaritmická fáza rastu), bola po pridaní IPTG indukovaná tvorba rekombinantného proteínu. Po 6 hodinovej indukcií bol rekombinantný proteín v bunkách, odobratých v hodinových intervaloch, stanovený metódou SDS-Page elektroforézy v polyakrylamidovom géle (**Obrázok 34**). Na obrázku je jasne vidieť, v závislosti od času inkubácie, zvyšujúcu sa expresiu proteínu s veľkosťou približne 33 kDa. Dĺžka indukovaného proteínu tak odpovedala teoretickej veľkosti kuracieho proteínu (30,3 kDa) predĺženej o sekvenciu 6xHis a sekvenciu pre štiepenie proteázou trombín (spolu 2,5 kDa)



Obrázok 34. SDS-Page polyakrylamidový gél vzoriek s 6-hodinovou indukciou expresie fúzneho proteínu. 0h – 6h = vzorky cytosolu s indukovanou expresiou proteínu, peleta 6h = membránová frakcia vyzolovaná z buniek po 6-hodinovej indukcií expresie.

Z **obrázku 34** je zjavné, že exprimovaný kurací proteín bol prítomný výhradne v cytosolárnej frakcii buniek a nie v bunkovej membráne (žiadny signál vo vzorke s označením peleta 6h). Indukovaný proteín bol následne izolovaný nanesením homogenátu bakteriálnej kultúry na chromatografickú kolónu s obsahom Ni-NTA agarózy. Množstvo indukovaného proteínu po 6 hodinovej inkubácii s IPTG predstavovalo približne 30 % z celkového množstva bunkového proteínu. Čistota purifikovaného rekombinantného proteínu bola overená SDS-Page elektroforézou v polyakrylamidovom géle (**obrázok 34**). Po odstránení vysokej koncentrácie imidazolu (0,25 M) z roztoku proteínu jeho dialýzou oproti roztoku 0,25 M sacharózy, bola z proteínu, 5 hodinovou inkubáciou v kolóne s obsahom trombínovej agarózy, úspešne

odštiepená sekvencia 6xHis. Na **obrázku 35** je SDS-Page polyakrylamidový gél s indukovaným proteínom pred a po štiepení proteázou trombín.



Obrázok 35. SDS-page elektroforéza v polyakrylamidovom géle. Štiepenie fúzneho proteínu pomocou trombínovej agarózy.

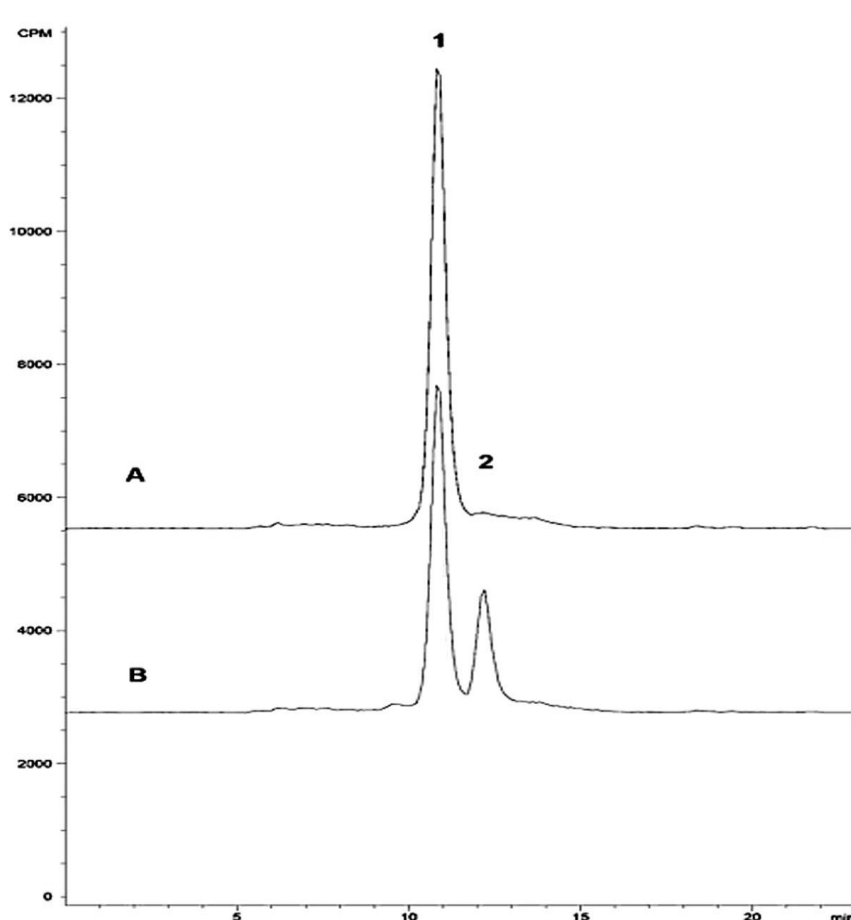
U purifikovaného kuracieho proteínu 20β -HSD bola následne stanovená jeho substrátová a kofaktorová špecificita inkubáciou s neznačenými i rádioaktívne značenými steroidnými substrátmi.

5.5. MERANIE SUBSTRÁTOVEJ ŠPECIFICITY ENZÝMU 20 β -HSD

5.5.1. Meranie substrátovej špecificity enzýmu 20 β -HSD - rádiometrická assay

5.5.1.1. Konverzia [^3H]kortikosterónu

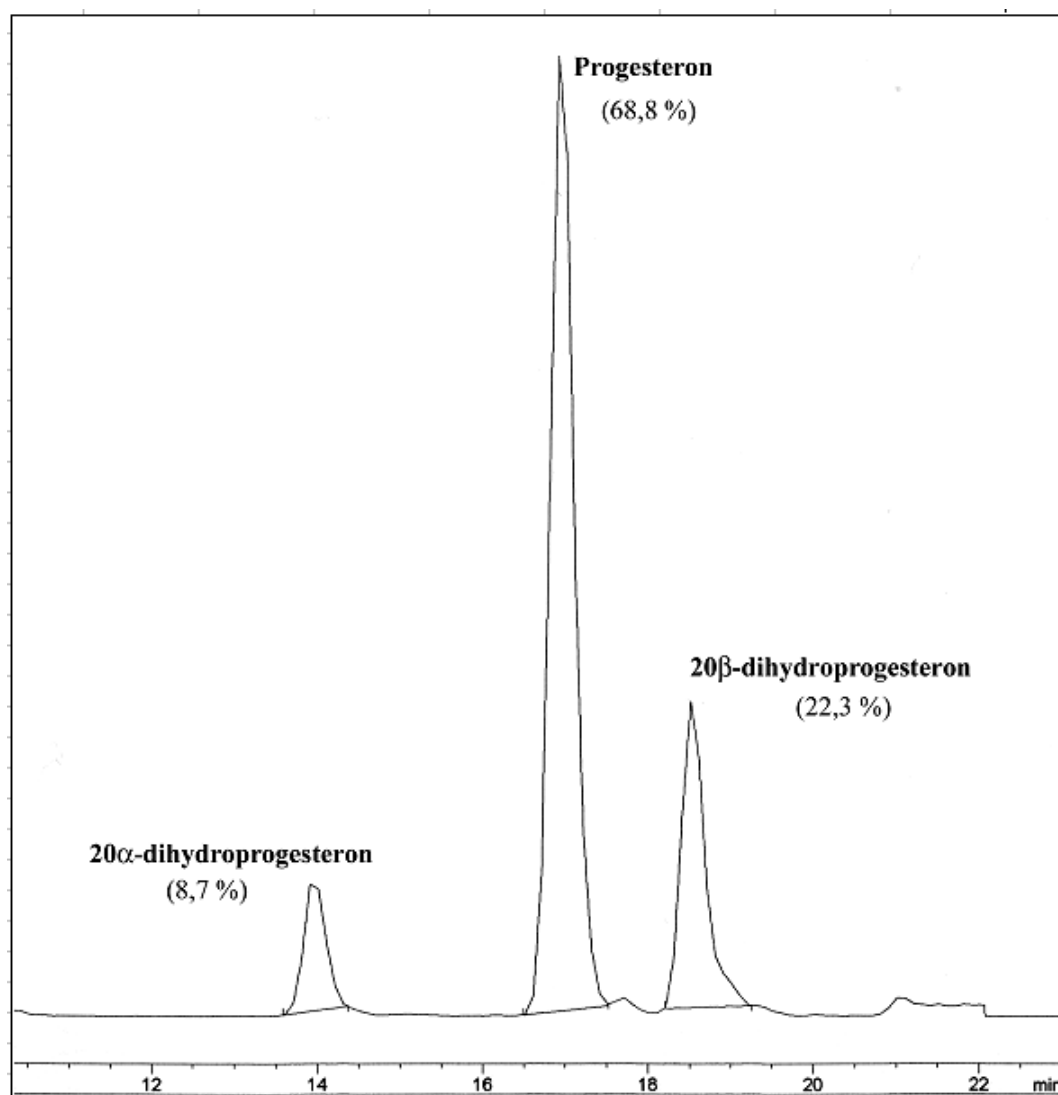
Rádioaktívne označený kortikosterón (45 nM) bol rekombinantným proteínom v prítomnosti kofaktora NADPH metabolizovaný na 20 β -dihydrokortikosterón. V prítomnosti kofaktora NADH nebola pozorovaná žiadna konverzia substrátu (**Obrázok 36**). Z dôvodu nedostupnosti 20 α -dihydrokortikosterónu však nebolo možné určiť stereošpecificitu enzýmu. Neprítomnosť tretieho signálu (20 α -epimér) na zázname z HPLC, je možné vysvetliť tak, že 20 α -epimér je buď vo vzorkách neprítomný, alebo sa jeho retenčný čas zhoduje s retenčným časom pre 20 β -epimér. Otázku stereošpecificity kuracieho enzýmu preto vyriešil až nasledujúci pokus s inkubáciou proteínu s rádioaktívne značeným progesterónom.



Obrázok 36. HPLC chromatogram konverzie [^3H]kortikosterónu purifikovaným proteínom 20 β -HSD exprimovanom v baktériách *E. coli*; (A) v prítomnosti kofaktora NADH, (B) v prítomnosti kofaktora NADPH. 1 = kortikosterón, 2 = 20 β -dihydrokortikosterón.

5.5.1.2. Konverzia [³H]progesteronu

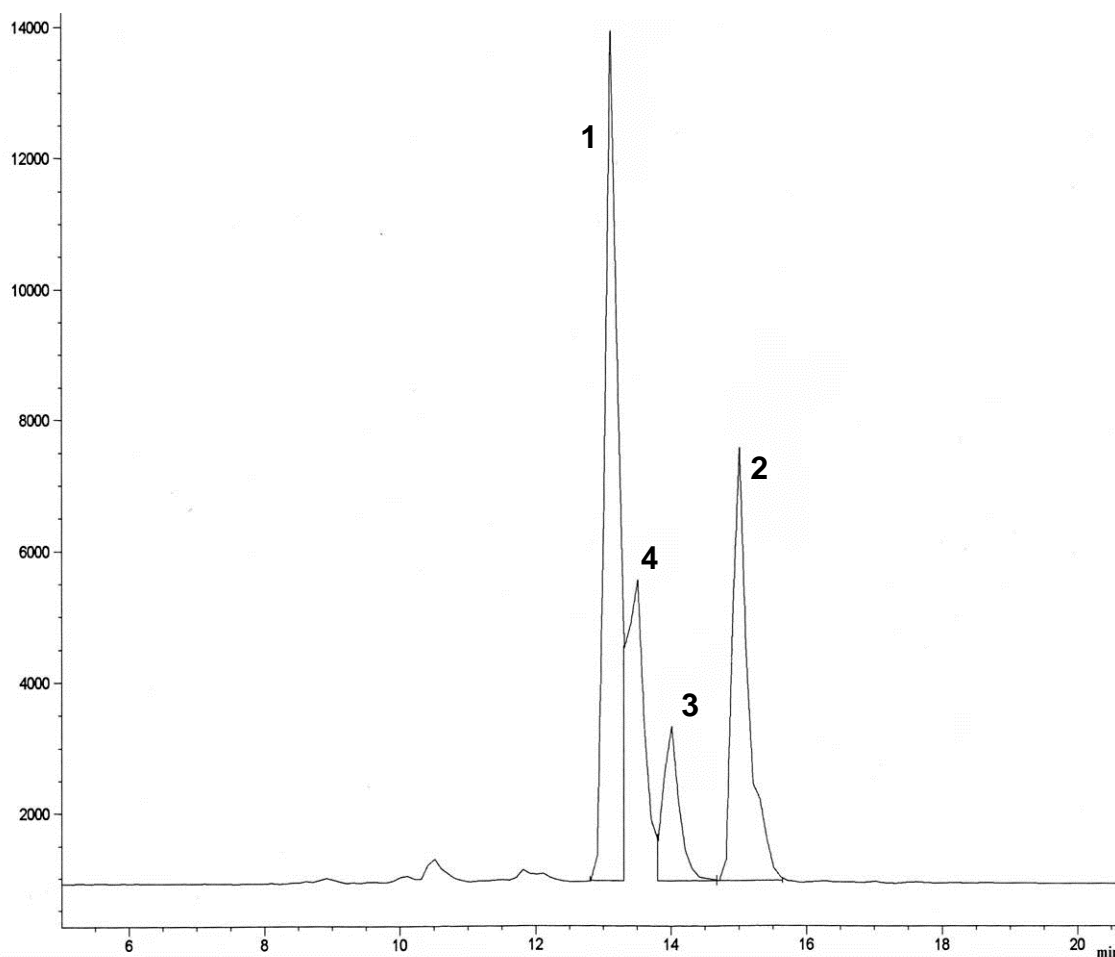
Dostupnosť 20 α - a 20 β -hydroxyepimérov progesterónu, ako aj ich rozdielne retenčné časy, umožnili určiť stereošpecificitu kuracieho rekombinantného proteínu. Purifikovaný proteín konvertoval v prítomnosti kofaktora NADPH rádioaktívne značený progesterón (45 nM) na 20 α - a 20 β -dihydroprogesterón. Množstvo vzniknutého 20 β -dihydroprogesterónu bolo približne 3-krát vyššie ako 20 α -dihydroprogesterónu (11,5 \pm 1 vs. 28 \pm 2,5 pmol/hod.mg proteínu). Na **obrázku 37** je chromatogram znázorňujúci zastúpenie jednotlivých metabolitov vo vzorkách.



Obrázek 37. HPLC chromatogram konverzie [³H]progesteronu purifikovaným proteínom 20 β -HSD v prítomnosti kofaktora NADPH.

5.5.1.3. Konverzia [³H]androstanolónu

V tomto pokuse ma zaujímalo, či kurací rekombinantný proteín, podobne ako jeho homológ u cicavcov, vykazuje okrem vyššie dokázanej 20-reduktázovej aktivity, aj aktivitu 3-reduktázovú. 3-reduktázová aktivita bola sledovaná na C₁₉ steroidnom substráte androstanolóne (5 α -dihydrotestesteróne, 45 nM). Pri inkubácii rádioaktívne značeného androstanolónu s purifikovaným proteínom bol tento substrát metabolizovaný na 3 α - a 3 β -hydroxyderiváty. Zastúpenie 3 β -epiméru bolo pritom takmer 2-krát vyššie ako 3 α -epiméru (147 \pm 4,2 vs. 83,3 \pm 2,5 pmol/hod.mg proteínu) (**obrázok 38**).



Obrázok 38. HPLC chromatogram konverzie [³H]androstanolónu purifikovaným proteínom 20 β -HSD exprimovanom v baktériách *Escherichia coli* v prítomnosti kofaktora NADPH. **1** = 5 α -androstán-3 β -17 β -diol, **2** = 5 α -androstán-3 α -17 β -diol **3** = androstanolón, **4** = neznámy produkt.

Tabuľka 11 sumarizuje výsledky inkubácie rekombinantného proteínu s rádioaktívne značenými substrátmi. Najvyššia aktivita enzýmu bola nameraná pri sledovaní redukcie

androgénu androstanolónu na uhlíku C₃ (230±6,7 pmol steroidu/hod.mg proteínu). Aktivita enzýmu bola pre redukciu C₂₁ steroidov na uhlíku C₂₀ (kortikosterón, progesterón) približne 6-krát nižšia. Výsledky tiež poukazujú na NADPH kofaktorovú špecificitu (kortikosterón, **obrázok 36**) a prevládajúcu 20β- a 3β- substrátovú stereošpecificitu enzýmu (progesterón a androstanolón, **tabuľka 11**).

SUBSTRÁT	PRODUKT	
<i>[³H]kortikosterón</i>	20α-DHK + 20β-DHK 39 ± 0,35	
<i>[³H]progesterón</i>	20α-DHP 11,5 ± 0,9	27,9 ± 2,5
<i>[³H]androstanolón</i>	androstán-3α-17β-diol 83,3 ± 2,5	androstán-3β-17β-diol 146,8 ± 4,2

Tabuľka 11. Konverzia rádioaktívne označených steroidných hormónov rekombinantným enzýmom 20β-HSD. DHK = dihydrokortikosterón, DHP = dihydroprogesterón. Hodnoty sú vyjadrené v pmol steroidu/hod.mg proteínu, n = 6.

5.5.2. Meranie substrátovej špecificity enzýmu 20β-HSD - spektrofotometrická assay

Spektrofotometricky bola sledovaná redukcia a oxidácia funkčných skupín na uhlíkoch C₃, C₂₀ alebo C₁₇ u rôznych 3-, 17- a 20-keto- alebo hydroxy-steroidov rekombinantným proteínom.

5.5.2.1. 20-oxidoreduktázová aktivita

20-oxidázová aktivita rekombinantného proteínu 20β-HSD bola testovaná za použitia C₂₁ steroidných látok s hydroxy-skupinou na uhlíku C₂₀ v prítomnosti kofaktora NADP⁺. U žiadneho z použitých substrátov som nepozoroval oxidáciu sledovanej funkčnej skupiny rekombinantným enzýmom, čo sa prejavilo štatisticky nevýznamným nárastom v absorbancii za jednotku času pri vlnovej dĺžke 340 nm (**tabuľka 12**).

Naproti tomu, v prítomnosti kofaktora NADPH, rekombinantný enzým redukoval všetky použité steroidné substráty s keto-skupinou na uhlíku C₂₀. 20-reduktázová aktivita sa prejavila významným poklesom absorbancie za jednotku času pri vlnovej dĺžke 340 nm. Najvyššia aktivita bola nameraná pri použití substrátov 11-dehydrokortikosterónu, 17-hydroxyprogesterónu, kortikosterónu a 5α-dihydropregnanolónu (**tabuľka 12**).

Kofaktor: NADPH

SUBSTRÁT	AKTIVITA
kortikosterón (4-pregnen-11 β ,21-diol-3,20-dión)	0,876 \pm 0,040
*** progesterón (4-pregnen-3,20-dión)	0,377 \pm 0,024
11-dehydrokortikosterón (4-pregnen-21-ol-3,11,20-trión)	1,833 \pm 0,032
17-hydroxyprogesterón (4-pregnen-17-ol-3,20-dión)	0,916 \pm 0,016
5 α -dihydropregnanolón (5 α -pregnan-3 β -ol-20-ón)	1,120 \pm 0,121
5 β -pregnan-3 α ,21-diol-11,20-dión	0,466 \pm 0,015
5 β -pregnan-3 α ,11 β ,21-triol-20-ón	0,313 \pm 0,072
Kofaktor: NADP⁺	
SUBSTRÁT	AKTIVITA
4-pregnen-20 α -ol-3-ón (20 α -hydroxyprogesterón)	x
4-pregnen-20 β -ol-3-ón (20 β -hydroxyprogesterón)	x
4-pregnen-11 β , 20 β ,21-triol-3-ón (20 β -dihydrokortikosterón)	x
4-pregnen-20 β , 21-diol-3,11-dión (11-dehydro-20dihydrokortikosterón)	x

Tabuľky 12. Hodnoty 20-oxidoreduktázovej aktivity rekombinantného proteínu pre rôzne substráty (100 μ M). Hodnoty sú vyjadrené v nmol steroidu/hod.mg proteínu \pm SEM, n = 6.

x = hodnota aktivity sa významne nelíši od nuly

*** progesterón: v pokuse v dôsledku nízkej rozpustnosti vo vode (max. 30 μ M) bola použitá koncentrácia 30 μ M

5.5.2.2. 3-oxidoreduktázová aktivita

V tomto pokuse som sledoval schopnosť rekombinantného proteínu metabolizovať C₁₉ steroidné látky na uhlíku C₃. V prítomnosti kofaktora NADPH a substrátu androstanolónu (5 α -androstán-17 β -ol-3-ón) bola pozorovaná vysoká 3-reduktázaová aktivita rekombinantného proteínu. Testosterón bol enzýmom tiež redukovaný, avšak s približne 6-krát nižšou

účinnosťou. Na rozdiel od vysokej 3-reduktázovej aktivity som u rekombinantného enzýmu v prítomnosti kofaktora NADP⁺ nezaznamenal žiadnu 3-oxidázovú aktivitu (**Tabuľka 13**).

Kofaktor: NADP⁺

SUBSTRÁT	AKTIVITA
<i>5α-androstan-3α-ol-17-ón</i>	x
<i>5α-androstan-3β-ol-17-ón</i>	x
Kofaktor: NADPH	
SUBSTRÁT	AKTIVITA
<i>androstanolón (5α-androstan-17β-ol-3-ón)</i>	29,81 \pm 2,09
<i>testosterón (4-androstén-17β-ol-3-ón)</i>	4,76 \pm 0,35

Tabuľka 13. Hodnoty 3-oxidoreduktázovej aktivity rekombinantného proteínu pre rôzne substráty. x = aktivita sa významne nelíši od nuly. Hodnoty sú vyjadrené v nmol steroidu/hod.mg proteínu \pm SEM, n = 6.

5.5.2.3. 17-oxidoreduktázová aktivita

Mnohé steroidné dehydrogenázy vykazujú viac než jeden typ dehydrogenázovej aktivity. Preto som u kuracieho proteínu okrem 3- a 20-oxidoreduktázovej aktivity meral aj konverziu funkčnej skupiny C₁₉ steroidov na uhlíku C₁₇. Vysoká aktivita rekombinantného proteínu 20 β -HSD bola pozorovaná pri jeho inkubácii so substrátmi obsahujúcimi vo svojej štruktúre 17-keto alebo 17-hydroxy skupinu. Enzým účinne oxidoval androgén androstanolón (5 α -androstan-17 β -ol-3-ón) v prítomnosti kofaktora NADP⁺, ako aj účinne redukoval 17-keto-steroid 5 α -androstan-3 β -ol-17-ón v prítomnosti NADPH (**tabuľka 14**). Pri použití 3 α -epiméru (5 α -androstan-3 α -ol-17-ón) bola zistená približne 30 x nižšia 17-reduktázová aktivita než tomu bolo v prípade 3 β -epiméru (5 α -androstan-3 β -ol-17-ón). Dokazuje to výraznú preferenciu rekombinantného proteínu k 17-redukcii 3 β -hydroxy-epiméru oproti 3 α -hydroxy-epiméru.

Kofaktor: NADP⁺

SUBSTRÁT	AKTIVITA
<i>androstanolón</i> (<i>5α-androstan-17β-ol-3-ón</i>)	11,07 ± 0,26
<i>testosterón</i> (<i>4-androstén-17β-ol-3-ón</i>)	2,16 ± 0,15
Kofaktor: NADPH	
SUBSTRÁT	AKTIVITA
<i>5α-androstan-3α-ol-17-ón</i>	0,49 ± 0,09
<i>5α-androstan-3β-ol-17-ón</i>	14,27 ± 0,37

Tabuľka 14. Hodnoty 17-oxidoreduktázovej aktivity rekombinantného proteínu pre rôzne substráty. Hodnoty sú vyjadrené v nmol steroidu/hod.mg proteínu ± SEM, n = 6.

* štatisticky významný rozdiel oproti *5α-androstan-3α-ol,17β-ón* (P < 0,05)

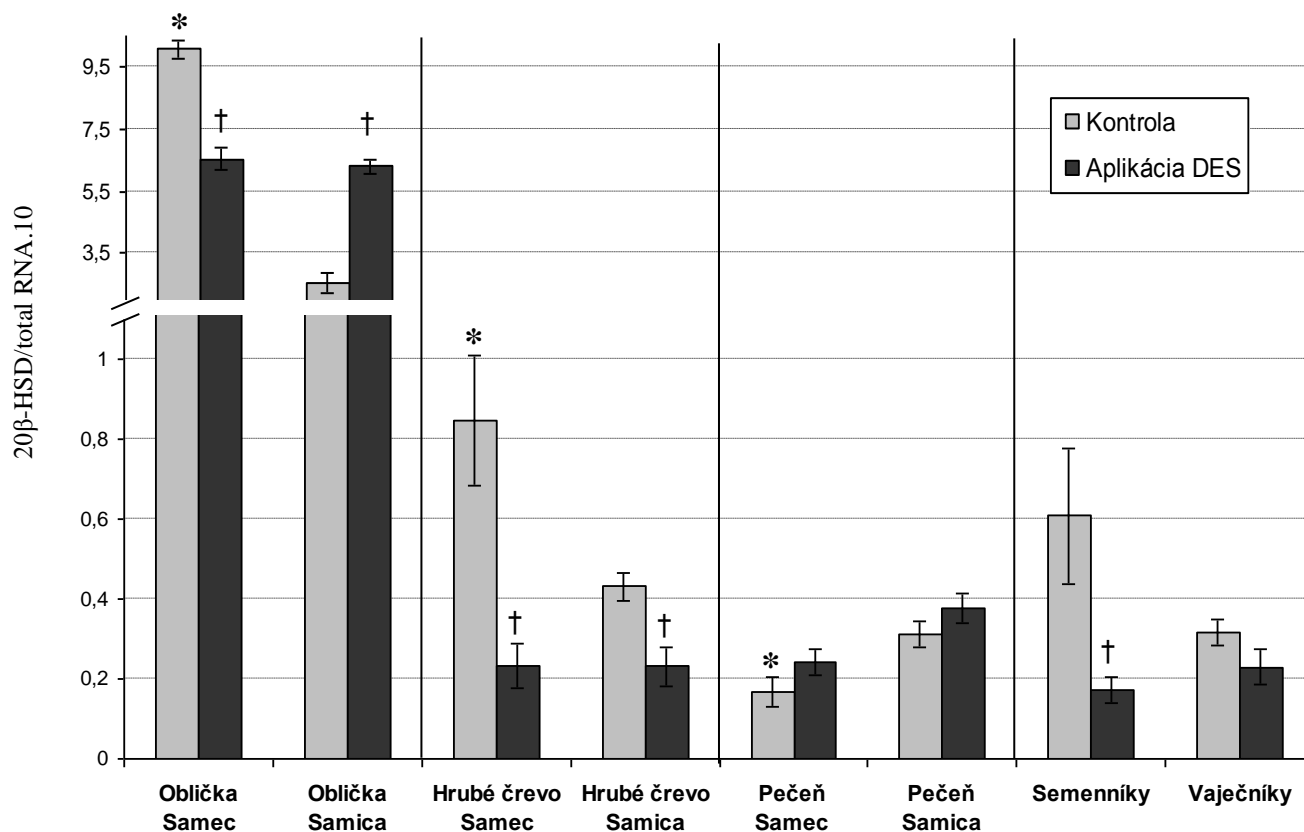
Z výsledkov inkubácie rekombinantného proteínu so steroidnými substrátmi je zjavné, že 3-reduktázová aktivita predstavovala najvyššiu nameranú aktivitu, keďže bola približne 2-krát vyššia než maximálna zistená 17-reduktázová aktivita a viac než 15-krát vyššia než 20-reduktázová aktivita nameraná pri pokusoch s C₂₁ steroidnými substrátmi.

5.6. KVANTIFIKÁCIA EXPRESIE mRNA ENZÝMU 20β-HSD V KURACÍCH TKANIVÁCH METÓDOU „REAL-TIME“ PCR

V tomto pokuse bola sledovaná expresia mRNA naklonovaného enzýmu 20β-HSD v kuracích tkanivách. Jedným zo zámerov bolo zistiť, či úroveň expresie mRNA v kuracích tkanivách približne odpovedá výsledkom o distribúcii 20-reduktázovej aktivity z pokusov na tkanivových rezoch v kapitole 5.1.1. Okrem toho boli sledované rozdiely v expresii mRNA medzi pohlaviami, keďže napríklad v práci Imamura *et al.*, (2001) bola u prasiat pozorovaná výrazná aktivita enzýmu 20β-HSD v obličke samcov, zatiaľ čo u samíc, bola veľmi nízka.

Na **obrázku 39** je graf znázorňujúci relatívnu expresiu mRNA zloženej sekvencie kuracieho proteínu 20β-HSD v rôznych tkanivách. Najvyššia expresia bola nameraná v obličke samcov a samíc, kde bola približne 10-krát vyššia než v hrubom čreve a pohlavných orgánoch; v pečeni bola expresia najnižšia. Z uvedených výsledkov sú zjavné výrazne rozdiely v expresii tohto enzýmu medzi pohlaviami. V obličkách samcov bola zistená približne 3-krát vyššia a

v hrubom čreve 2-krát vyššia expresia mRNA 20 β -HSD než u samíc. Aj v pohlavných orgánoch bola expresia približne 2-krát vyššia v semenníkoch než vo vaječníkoch. Z výsledkov je zjavné, že expresia enzýmu 20 β -HSD je u samcov kurčiat vyššia než u samíc. Výnimku predstavuje len tkanivo pečene, v ktorom bola nameraná významne vyššia expresia u samíc.



	Oblička		Hrubé črevo		Pečeň		Pohlavné orgány	
	Samec	Samica	Samec	Samica	Samec	Samica	Semenníky	Vaječníky
Kontrola	10,09±0,27*	2,56±0,33	0,85±0,16*	0,43±0,03	0,17±0,04*	0,31±0,03	0,61±0,17	0,32±0,03
DES	6,53±0,37†	6,30±0,23†	0,23±0,06†	0,23±0,05†	0,24±0,03	0,38±0,04	0,17±0,03†	0,23±0,04

Obrázok 39 a tabuľka 15. Graf a hodnoty relatívnej expresie mRNA kuracieho proteínu 20 β -HSD v rôznych kuracích tkanivách po aplikácii a bez aplikácie DES. Hodnoty sú vyjadrené ako pomer relatívnej koncentrácie mRNA enzýmu ku množstvu celkovej RNA použitej na reverznú transkripciu \pm SEM, n = 5.

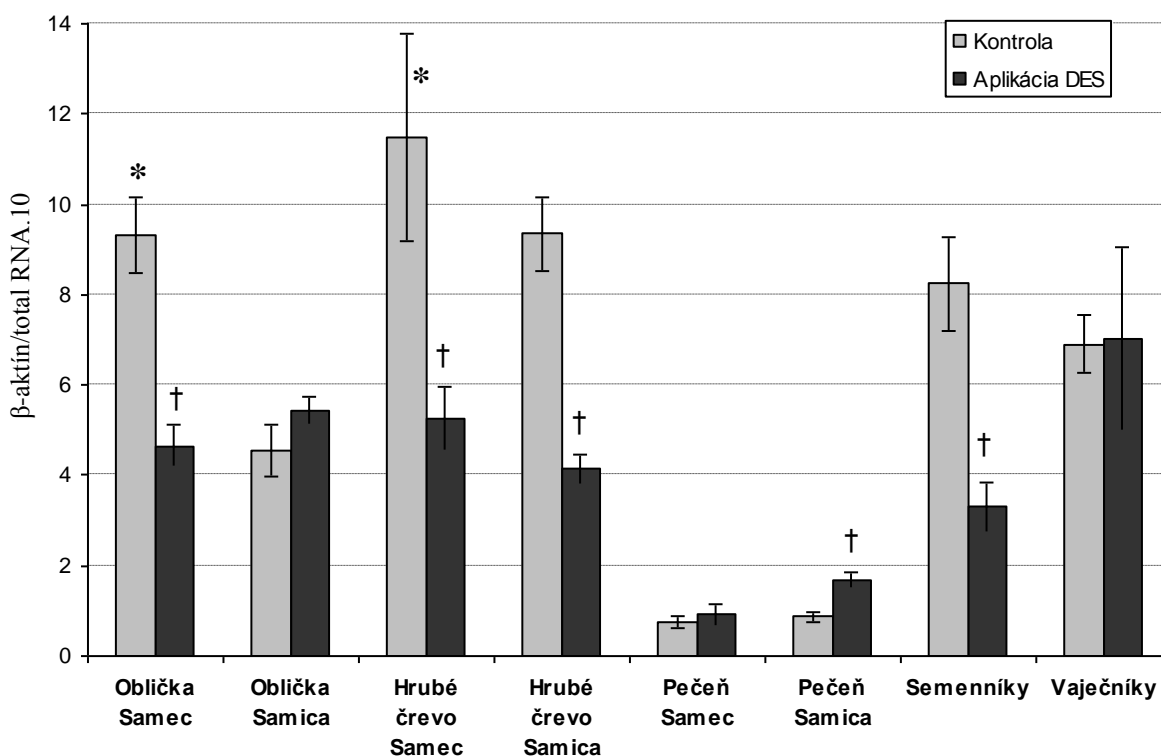
* štatisticky významný rozdiel medzi pohlaviami (P < 0,05)

† štatisticky významný rozdiel po aplikácii DES (P < 0,05)

Prítomnosť pohlavných rozdielov v expresii enzým 20 β -HSD u kurčiat poukazuje na možnosť, že expresia je regulovaná plazmatickými koncentraciami pohlavných hormónov. U samcov a samíc cicavcov bola expresia 20 β -HSD indukovateľná androgénmi (Imamura *et*

al., 2001). Preto bolo tiež zaujímavé sledovať reguláciu expície tohto enzýmu pohlavnými hormónmi (estrogén dietylstilbesterol, DES) v kuracích tkanivách. Podľa výsledkov na **obrázku 39** a v **tabuľke 15** mala aplikácia DES u samíc za následok viac ako dvojnásobný nárast expície mRNA enzýmu 20 β -HSD v obličke. Vo väčšine sledovaných tkanív však po aplikácii DES došlo buď k významnému poklesu expície mRNA (oblička, črevo a semenníky samcov, črevo samíc), alebo sa hodnoty expície pred a po aplikácii DES u samcov a samíc medzi sebou významne nelíšili.

Na **obrázku 40** je graf zobrazujúci rozdiely v expícii mRNA pre gén β -aktín v rôznych sledovaných tkanivách, rozdiely medzi pohlaviami a po aplikácii DES. U väčšiny sledovaných tkanív došlo po aplikácii DES k výraznému poklesu expície mRNA pre β -aktín. Rozdiely v expícii boli tiež pozorované medzi typmi tkanív (pečeň, oblička \leftrightarrow ostatné tkanivá). Preto boli vyššie uvedené výsledky expície mRNA enzýmu 20 β -HSD vztiahnuté na celkové množstvo RNA pôvodne použité na reverznú transkripciu.



Obrázok 40. Rozdiely v expícii mRNA génu β -aktínu v rôznych tkanivách u samcov a samíc pred a po aplikácii estrogénov. Hodnoty expície β -aktínu boli prepočítané na celkovú RNA a vyjadrené v relatívnych jednotkách ako priemer \pm SEM, $n = 5$.

* štatisticky významný rozdiel medzi pohlaviami ($P < 0,05$)

† štatisticky významný rozdiel po aplikácii DES ($P < 0,05$)

6. DISKUSIA

Medzi významné prínosy tejto práce patrí úspešné klonovanie a charakterizácia kuracieho enzýmu 20 β -HSD ako aj viaceré dôkazy o tom, že u vtákov, podobne ako je tomu u iných stavovcov, sú mnohé tkanivá schopné účinne metabolizovať steroidné hormóny ako sú glukokortikoidy, progestíny a androgény.

U vtákov k inaktivácii kortikosterónu dochádza z veľkej časti za využitia iných enzýmov (20 β -HSD), než aké boli doposiaľ identifikované u väčšiny cicavcov (11 β -HSD). Moje výsledky analýzy konverzie steroidných substrátov kortikosterónu a progesterónu tkanivovými rezmi kurčiat jasne poukazujú na to, že konverzia steroidných hormónov na uhlíku C₂₀ predstavuje bežnú a dôležitú vlastnosť mnohých kuracích tkanív. Pôvodné štúdie z rokov 1989 (DiBattista *et al.*, 1989) a neskôr z roku 1998 (Vylitova *et al.*, 1998) dokázali prítomnosť enzýmov s 20-reduktázovou aktivitou len v čreve kačíc a kurčiat, a preto táto práca poskytuje prvý dôkaz o takmer všadeprítomnej distribúcii tohto enzýmu vo vtáčích tkanivách. Najvyššia 20-reduktázová aktivita bola, pri použití substrátu kortikosterónu, nameraná v obličke a tenkom čreve, hlavných tkanivách účinku aldosterónu (mineralokortikoidné cieľové tkanivá). Pomerne vysoká aktivita bola tiež zaznamenaná v nemineralokortikoidných cieľových tkanivách ako sú pečeň a semenníky. Z výsledkov inkubácie tkanív s kortikosterónom je tiež zjavné, že 11 β -oxidázová aktivita je v tkanivách vtákov významne nižšia než 20-reduktázová aktivita. Najvyššiu 11 β -oxidázovú aktivitu som zaznamenal v mineralokortikoidných cieľových tkanivách (obličky a črevo) a vo vajcovode, zatiaľ čo kompletne chýbala v pečeni, pohlavných orgánoch a mozgu. Vysoká 11 β -oxidázová aktivita v týchto tkanivách (obličky a črevo) pravdepodobne, podobne ako u cicavcov (Stewart a Krozowski, 1999), predstavuje aktivitu izoformy 11 β -HSD2. U cicavcov má tento enzým významnú úlohu v lokálnom metabolizme glukokortikoidov a zabezpečuje tak špecificitu účinku aldosterónu v mineralokortikoidných cieľových tkanivách. Relatívne vysoká 11 β -oxidázová aktivita nameraná u vtákov vo vajcovode by tiež mohla ochraňovať tento orgán pred účinkom vysokých koncentrácií glukokortikoidov. Je totiž známe, že tvorba niektorých z proteínov vaječného bielka je regulovaná estrogénmi, progestínmi, androgénmi a glukokortikoidmi. Platí však, že väčšina týchto génov je počas primárnej stimulácie špecifická na estrogény a môžu byť indukované progestínmi, androgénmi a glukokortikoidmi až po sekundárnej opätovnej stimulácii estrogénmi (Muramatsu a Sanders, 1995).

Fyziologická úloha enzýmu 20 β -HSD v tkanivách kurčiat nie je doposiaľ presne objasnená. Práce Sandor *et al.*, (1989) a Rafestin-Oblin *et al.*, (1989) dokazujú, že MR vtákov

viaže aldosterón aj kortikosterón približne s rovnakou afinitou. Rosenberg a Hurwitz, (1987) vo svojej štúdií poukazujú na omnoho vyššie cirkulujúce koncentrácie kortikosterónu v krvi vtákov než je tomu u aldosterónu. V mineralokortikoidných cieľových tkanivách, ako sú obličky a črevo, by preto enzým 20 β -HSD spolu s 11 β -HSD mohol hrať úlohu v ochrane MR pred väzbou s kortikosterónom. Redukcia kortikosterónu na 20 β -dihydrokortikosterón tak pravdepodobne predstavuje systém alternatívny k 11 β -oxidácii, keďže tento metabolit podľa DiBattista *et al.*, (1989) nevykazuje významnú afinitu k MR.

Podľa údajov v dostupnej literatúre sa zdá, že u väčšiny cicavcov sa 20-keto-steroid dehydrogenázy predovšetkým podieľajú na regulácii aktivity progesterónu a nezúčastňujú sa metabolizmu kortikosterónu a iných 11-keto C₂₁ steroidov (Takada *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 2001; Nakajin *et al.*, 1988a). Moje výsledky analýzy konverzie progesterónu tkanivom obličky a čreva kurčiat dokazujú prítomnosť enzýmov redukujúcich progesterón na uhlíku C₂₀ v kuracích tkanivách. Progesterón bol takmer výhradne metabolizovaný na 20 β -dihydroprogesterón, čo poukazuje na prítomnosť enzýmov s výraznou 20 β -stereošpecifitou v čreve a obličke vtákov. Podobne aj DiBattista *et al.*, (1989) identifikovali β -epiméry kortikosterónu a progesterónu ako hlavné produkty ich metabolizmu v čreve kačíc. Je možné, že u vtákov je ten istý enzým zodpovedný za redukciu oboch substrátov, progesterónu ako aj kortikosterónu, na uhlíku C₂₀. Nedá sa však ani vylúčiť účasť iných, doposiaľ presne neurčených enzýmov s 20 β -HSD aktivitou. Z literatúry je známe, že 20-redukcia progestínov u cicavcov významne znižuje ich biologickú aktivitu. Naopak u nižších stavovcov (ryby), má 20-redukcia za následok tvorbu biologicky aktívnejších zlúčenín. Príkladom je tvorba 17 α ,20 β -dihydroprogesterónu ako dôležitého maturačného faktora u niektorých druhov rýb (Nagahama, 1997).

U cicavcov bol enzým 20 β -HSD po prvý krát identifikovaný v semenníkoch prasiat a okrem 20 β -dehydrogenázovej aktivity bola u neho zistená aj vysoká 3 α / β -dehydrogenázová aktivita (Nakajin *et al.*, 1988a; Ohno *et al.*, 1991). Prítomnosť 3 α / β -dehydrogenázovej aktivity u prasačieho enzýmu tak poukazuje na jeho účasť na metabolizme C₁₉ steroidov, androgénov. Neskoršie štúdie imunochemicky a imunohistochemicky dokázali prítomnosť tohto enzýmu aj v iných tkanivách prasiat, ako sú obličky, pečeň, pľúca, srdce, mozog a semenníky (Kobayashi *et al.*, 1996). Preto som sa aj ja pri analýze konverzie steroidných substrátov, okrem kortikosterónu a progesterónu, zamerlal aj na sledovanie konverzie rádioaktívne značeného C₁₉ steroidu 5 α -DHT (androstanolónu) niektorými tkanivami. Výsledky týchto pokusov dokazujú prítomnosť enzýmov s 3 α / β -dehydrogenázovou aktivitou v sledovaných tkanivách. Kým

v čreve významne prevládala 3β -reduktázová aktivita, tak vo vajcovode bola 3α -reduktázová aktivita približne dvojnásobne vyššia a v mozgu boli obidve reduktázové aktivity približne rovnaké. Zdá sa preto pravdepodobné, že okrem enzýmu 20β -HSD je tento substrát v sledovaných tkanivách metabolizovaný aj inými steroidnými dehydrogenázami s 3α - a 3β -reduktázovou aktivitou.

Význam existencie dvoch systémov inaktivácie kortikosterónu (11β -HSD a 20β -HSD) nie je u vtákov doposiaľ presne objasnený. Niektorí autori sa domnievajú, že by funkčné prepojenie 11β -oxidácie s 20 -redukciou cez kosubstráty, mohlo výrazne stimulovať účinok týchto steroidných dehydrogenáz (Mercer a Krozowski, 1992). Podľa tejto teórie by redukované kofaktory vznikajúce aktivitou enzýmu 11β -HSD2 mohli byť v ďalšom kroku využité enzýmom 20β -HSD na redukciiu molekuly kortikosterónu, avšak v tomto prípade na uhlíku C_{20} . Teóriu o možnom kosubstrátovom prepojení spomínaných enzýmov podporuje aj skutočnosť, že enzým 20β -HSD je cytozolárny proteín a 11β -HSD2 (prítomný v membráne endoplazmatického retikula) má katalytickú časť molekuly orientovanú tiež smerom do cytozolu.

Existujú aj dôkazy o tom, že by C_{20} -redukcia 11-dehydrokortikosterónu mohla ešte výraznejšie znižovať jeho biologickú aktivitu (Sabatini *et al.*, 1993). Už v roku 1989 Sandor *et al.* dokázali, že u kura domáceho 11β -redukcia kortikosterónu približne 10-násobne znižuje afinitu tohto substrátu k MR. Moje výsledky z vytesňovacieho experimentu, zameraného na charakterizáciu MR z hľadiska jeho afinity k 11-dehydro- a 20-dihydro-derivátom kortikosterónu, sú v súlade s týmito prácami. 11-dehydrokortikosterón v mojich pokusoch vykazoval približne 5-krát nižšiu afinitu k MR než kortikosterón. Okrem toho som v experimente zaznamenal zvýšenie hodnoty EC_{50} u substrátu 11-dehydro-20-dihydrokortikosterónu oproti hodnote EC_{50} u substrátu 11-dehydrokortikosterónu. Tieto výsledky dokazujú, že 20 -redukcia 11-dehydrokortikosterónu znižuje jeho afinitu k MR približne dvojnásobne. Zaujímavým bolo aj zistenie, že v prípade redukcie molekuly kortikosterónu na uhlíku C_{20} (20β -dihydrokortikosterón), bez súčasnej oxidácie funkčnej skupiny aj na uhlíku C_{11} , došlo k ešte výraznejšiemu poklesu afinity substrátu k MR. Tento pokles však nebol štatisticky významný v porovnaní s dvojitou modifikáciou molekuly kortikosterónu. Celý experiment dokazuje, že 20 -redukcia molekuly kortikosterónu v tkanivách kurčiat, je z hľadiska ochrany MR pred nešpecifickou väzbou s kortikosterónom účinnejšia než 11β -oxidácia.

20β -redukcia kortikosterónu má v porovnaní s 11β -oxidáciou, okrem toho, že spôsobuje výraznejší pokles afinity kortikosterónu k MR, aj ďalšie výhody. Na rozdiel od 11β -HSD

schopnej redukovať len C₂₁ steroidy s 11-keto skupinou (glukokortikoidy), môže 20 β -HSD svojou 20 β -reduktázovou a 3 α / β -oxidoreduktázovou aktivitou navyše účinne zasahovať do modulácie účinku progestínov a androgénov.

Štúdium prítomnosti či neprítomnosti aktivity konkrétnej steroidnej dehydrogenázy na celom tkanive, alebo zmesi buniek, však vo väčšine prípadov neumožňuje presne určiť aktivitu tejto dehydrogenázy. Steroidné dehydrogenázy často metabolizujú široké spektrum steroidných substrátov, prekrývajúce sa so spektrom iných dehydrogenáz s podobnými aktivitami. Podrobnejšie charakterizovať kurací enzým 20 β -HSD mi umožnila jeho rekombinantná expresia v baktériách *Escherichia coli* s jeho následnou purifikáciou.

Enzým 20 β -HSD prasiat bol prvou identifikovanou a naklonovanou monomérou karbonyl reduktázou (Tanaka *et al.*, 1992) u ktorej bola v roku 2001 určená kryštalová štruktúra a identifikované aminokyseliny podstatné pre väzbu substrátu a enzymatickú katalýzu (Ghosh *et al.*, 2001). Mne sa podarilo identifikovať a klonovať sekvenciu kuracieho enzýmu 20 β -HSD. Táto sekvencia kodovala proteín s dĺžkou 276 aminokyselín, čo predstavovalo proteín o 12 aminokyselín kratší než prasačí enzým. Nakajin *et al.*, (2001) zistili, že 12 extra aminokyselín na C-konci prasačieho proteínu nie je prítomných u známych sekvencií iných stavovcov. Autori tiež určili, že u prasačieho proteínu má tento krátky peptid stabilizačnú funkciu pre väzbu niektorých androgénov, progestínov, iných steroidných látok a koenzýmov.

O tom, že zložená sekvencia skutočne predstavuje kurací enzým 20 β -HSD, svedčia výsledky získané jej porovnaním so známymi sekvenciami *in silico*, ako aj analýza enzymatickej aktivity purifikovaného enzýmu, získaného rekombinantnou expresiou v baktériách *E. coli*. V roku 2001 Ghosh *et al.* podrobne popísali terciárnu štruktúru prasačieho proteínu a identifikovali u neho katalyticky významné motívy a aminokyseliny. Vysoká sekvenčná homológia zloženej kuracej sekvencie s prasačím proteínom (78 %) a identická lokalizácia aminokyselín Rosmanovho záhybu (Gly-X-X-X-Gly-X-Gly) a triády aminokyselín katalytického miesta (Ser140, Tyr194, Lys198) vo vytvorenom trojrozmernom modeli, predstavovali dôležité indikátory toho, že sa skutočne jedná o kurací homológ enzýmu 20 β -HSD.

Ešte významnejšie sú z tohto hľadiska moje výsledky o polyfunkčnej enzymatickej aktivite kuracieho proteínu, pripraveného rekombinantnou expresiou v baktériách, dokazujúce jeho 3 α / β -reduktázovú, 17-oxidoreduktázovú a 20 α / β -oxidoreduktázovú aktivitu. Podľa Ohno *et al.*, (1991), prasačí enzým 20 β -HSD tiež vykazoval 3 α / β ,20 β -reduktázovú aktivitu, kým u rýb (Thibaut a Porte, 2004) bola identifikovaná 20 α - aj 20 β -HSD aktivita, avšak nie je známe, či sa u nich jedná o jeden, alebo dva rôzne enzýmy. U purifikovaného kuracieho

proteínu predstavovala 20-reduktázová aktivita najnižšiu nameranú aktivitu, pričom 3-reduktázová a 17-oxidoreduktázová aktivita ju niekoľkonásobne prevyšovali. Tieto výsledky sú v súlade s prácami Ohno *et al.*, (1991) a Nakajin *et al.*, (2001), v ktorých autori namerali u purifikovaného proteínu 20 β -HSD prasiat približne 10-15 krát vyššiu 3-reduktázovú než 20-reduktázovú aktivitu. Na rozdiel od prasačieho proteínu, som však u kuracieho proteínu nenameral žiadnu 3-oxidázovú aktivitu, potrebnú pre spätnú oxidáciu biologicky neaktívnych 3 α - a 3 β -redukovaných androgénov. Ďalším výrazným rozdielom oproti dostupným údajom o aktivite cicavčieho enzýmu 20 β -HSD je fakt, že na rozdiel od proteínu cicavcov, kurací rekombinantný proteín významne redukoval, ako aj spätne oxidoval, 17-keto-skupinu androgénu androstanolónu a testosterónu. Doposiaľ bolo u cicavcov popísaných viacero typov a izoformiem 17 β -HSD, ktoré patria medzi AKR aj SDR steroidné dehydrogenázy (Mindnich *et al.*, 2004a). 17-oxidoreduktázová aktivita týchto enzýmov sa predovšetkým významne uplatňuje v steroidogenéze a reverzibilnej konverzii androgénov (Luu-The, 2001). Peltoketo *et al.*, (1999) a Luu-The, (2001) poukazujú vo svojich prácach na fakt, že mnohé izoformy enzýmu 17 β -HSD *in vitro* vykazujú oxidázovú aj reduktázovú aktivitu, avšak *in vivo* vždy účinkujú buď len ako oxidáza, alebo reduktáza. Keďže sa v prípade kuracieho enzýmu jedná o cytozolárny proteín preferujúci kofaktory NADP⁺ a NADPH a cytosol je predovšetkým charakteristický prítomnosťou kofaktorov NAD⁺ a NADPH (Luu-The, 2001), je možné predpokladať, že *in vivo* bude tento enzým predovšetkým katalyzovať 17-redukciu a 3-redukciu androgénov. V takom prípade by kurací enzým, vzhľadom na svoj vysoký stupeň expície v tkanivách a vysokú 3-reduktázovú a 17-reduktázovú aktivitu, účinne zasahoval do modulácie účinku androgénov v tkanivách vtákov.

Okrem priameho regulačného účinku na aktivitu androgénov môže enzým 20 β -HSD, podľa Nakajin *et al.*, (1998b) aj nepriamo modulovať syntézu androgénov a estrogénov v pohlavných orgánoch. Títo autori zistili, že 20 β -hydroxyderiváty C₂₁ steroidov vznikajúce účinkom 20 β -HSD sú schopné výrazne inhibovať aktivitu cytochrómu P450_{C17}, dôležitého pre biosyntézu androgénov a estrogénov a exprimovaného v pohlavných, ako aj iných orgánoch vtákov (Boswell *et al.*, 1995; Schlinger *et al.*, 1999).

Zaujímavé sú rozdiely vo výsledkoch určujúcich stereošpecificitu rekombinantného enzýmu 20 β -HSD na substráte progesterónu (**tabuľka 11**), pri ich porovnaní s výsledkami z inkubácie kuracích tkanív s týmto substrátom (graf na **obrázku 28**). Kým výsledky získané pri inkubácii tkaniva tenkého čreva s progesterónom približne odpovedajú stereošpecificite purifikovaného proteínu (20 β -epimér:20 α -epimér = 3:1), tkanivo obličky redukovalo progesterón len na 20 β -dihydroprogesterón. Výsledky z kvantifikácie expície mRNA

klonovaného enzýmu pritom jasne dokazujú, že tento enzým je v obličke exprimovaný vo vysokom množstve. Je možné, že v tkanive obličky sú, na rozdiel od čreva, prítomné dehydrogenázy konvertujúce vznikajúci 20α -dihydroderivát na bližšie neurčené deriváty. Ďalej môže v bunkách tkaniva obličky dochádzať k postranlačným modifikáciám enzýmu (napr. glykozyláciou) spôsobujúcim zmenu jeho substrátovej špecificity.

Pôvodne bola 20β -reduktázová aktivita enzýmu 20β -HSD identifikovaná v semenníkoch neonatálnych prasiat, kde sa tento enzým podieľa na regulácii koncentrácie steroidných hormónov počas ontogenetického vývinu (Nakajin *et al.*, 1988a). Neskoršie štúdie však dokázali jeho širokú distribúciu aj v ostatných tkanivách neonatálnych prasiat (Kobayashi *et al.*, 1996) a u rýb (Guan *et al.*, 1999). To je v súlade s mojimi výsledkami z kvantifikácie expresie mRNA identifikovaného kuracieho enzýmu 20β -HSD. Enzým bol exprimovaný vo všetkých analyzovaných tkanivách, pričom úroveň expresie sa medzi nimi výrazne líšila. Najvyššia expresia mRNA bola zistená v obličke, hrubom čreve a semenníkoch kurčiat; najnižšia vo vaječníkoch a pečeni. Výsledky kvantifikácie expresie sa tak približne zhodujú s výsledkami o distribúcií 20 -reduktázovej aktivity z pokusu s inkubáciou tkanivových rezov, kedy najvyššia 20 -reduktázová aktivita bola nameraná v obličke, čreve a semenníkoch kurčiat a najnižšia vo vaječníkoch a pečeni. Zdá sa preto pravdepodobné, že 20 -reduktázová aktivita nameraná v pokusoch s tkanivovými rezmi predstavuje aktivitu naklonovaného enzýmu 20β -HSD.

Výsledky kvantifikácie expresie tiež dokazujú existenciu výrazných pohlavných rozdielov v expresii mRNA enzým 20β -HSD. Relatívne množstvo mRNA bolo vo všetkých sledovaných tkanivách, buď významne vyššie u samcov než u samíc, alebo medzi pohlaviami neboli zistené významné rozdiely. Expresia mRNA v obličkách, čreve a pohlavných orgánoch bola u samcov kurčiat významne vyššia než u samíc, čo je v súlade s výsledkami Imamura *et al.*, (2001). Títo autori dokázali významné pohlavné rozdiely v aktivite 20β -HSD v mikrozómoch izolovaných z obličiek potkanov. 20β -reduktázová aktivita u samíc potkanov bola v porovnaní so samcami výrazne nižšia a bola u nich indukovateľná aplikáciou androgénov. Aj Takada *et al.*, (2000) namerali v mikrozómoch izolovaných z pečene potkanov výrazne vyššiu 20β -reduktázovú aktivitu u samcov, než u samíc. Moje výsledky kvantifikácie cDNA v tkanivách kurčiat, pred a po aplikácii estrogénu DES, poukazujú na reguláciu expresie 20β -HSD estrogénmi. Na rozdiel od androgénov u cicavcov (Imamura *et al.*, 2001), mali estrogény vo väčšine sledovaných tkanív u kurčiat výrazný inhibičný vplyv na expresiu enzýmu 20β -HSD. Tento inhibičný vplyv bol predovšetkým výrazný u samcov, u ktorých sú plazmatické koncentrácie estrogénov štandardne veľmi nízke a androgénov vysoké. Zdá sa

preto pravdepodobné, že u samcov kurčiat je vysoká expresia mRNA 20 β -HSD v tkanivách výsledkom stimulačného účinku androgénov, kým u samíc nižšia expresia súvisí s inhibičným vplyvom estrogénov.

V pokusoch som hodnoty kvantifikácie expresie mRNA v tkanivách vyjadril ako pomer relatívnej koncentrácie mRNA génu ku množstvu totálnej RNA pôvodne použitej na reverznú transkripciu. Bolo dokázané, že totálna RNA pritom pozostáva z 85-90 % z ribozomálnych rRNA, ktorých expresia je všeobecne veľmi stabilná (Barbu a Dautry, 1989; De Leeuw *et al.*, 1989; Bhatia *et al.*, 1994; Bustin, 2000). Ďalším z dôvodov pre použitie celkovej RNA a nie niektorého z tradičných vnútorných štandardov („housekeeping“ génov) bolo, že v dostupnej literatúre dodnes chýbajú práce, ktoré by sa venovali variabilite expresie rôznych „housekeeping“ génov v tkanivách kurčiat. Vhodný „housekeeping“ gén by musel byť stabilne exprimovaný vo všetkých sledovaných tkanivách a to u oboch pohlaví a zároveň by jeho expresia nemala byť ovplyvniteľná exogénnou aplikáciou estrogénov. Z hľadiska sledovania rozdielov v expresii spôsobených aplikáciou estrogénov sa javil ako vhodný vnútorný štandard gén pre β -aktín. Na to poukazujú napríklad práce Kamata *et al.*, (2005) a Ace a Okulicz, (1995), ktorí sledovali zmeny v expresii hlavných používaných „housekeeping“ génov ako sú β -aktín, cyklofilín A, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) a ribosomálny proteín L19 (RPL19) v maternici primátov a ovariectomizovaných potkanov po aplikácii exogénnych estrogénov. Medzi týmito génmi vykazoval práve β -aktín najstabilnejšiu expresiu. β -aktín a ďalšie tradične používané „housekeeping“ gény (napr. GAPDH) však patria medzi gény s vysokou variabilitou expresie pri porovnaní ich expresie medzi rôznymi typmi tkanív (Hsiao *et al.*, 2001; Warrington *et al.*, 2000). To dokazuje aj **obrázok 40**, ktorý znázorňuje rozdiely v expresii β -aktínu v rôznych tkanivách samcov a samíc pred a po aplikácii estrogénov v mojich pokusoch. Expresia β -aktínu bola výrazne ovplyvnená aplikáciou estrogénov a boli pozorované aj značné pohlavné rozdiely v expresii v rámci jedného typu tkaniva.

Moje výsledky z kvantifikácie expresie enzýmu 20 β -HSD, spolu s výsledkami o aktivite rekombinantného proteínu, dokazujú jeho expresiu v mnohých kuracích tkanivách a vysokú 3 α / β -reduktázovú, 17-oxidoreduktázovú a 20 α / β -reduktázovú aktivitu. Tento enzým sa preto bude významne podieľať na modulácii biologického účinku C₁₉ a C₂₁ steroidov ako sú glukokortikoidy, androgény a progestíny v kuracích tkanivách.

7. SÚHRN

Podarilo sa mi dokázať, že mnohé kuracie tkanivá sú schopné účinne metabolizovať steroidné hormóny ako sú glukokortikoidy, androgény a progestíny, a tak modulovať ich biologický účinok. Glukokortikoid kortikosterón bol v sledovaných tkanivách, podobne ako u cicavcov, oxidovaný na uhlíku C₁₁ enzýmom 11 β -HSD. Na rozdiel od cicavcov bol však tento substrát predovšetkým redukovaný na uhlíku C₂₀. 20-reduktázová aktivita bola prítomná vo všetkých sledovaných tkanivách a vo väčšine z nich bola významne vyššia než 11 β -oxidázová aktivita.

Význam dvojitej modifikácie molekuly kortikosterónu (11 β -oxidácia a 20-redukcia) a možnú spoluprácu enzýmu 20 β -HSD s enzýmom 11 β -HSD pri ochrany MR pred nešpecifickou väzbou s týmto substrátom, som dokázal vytesňovacím experimentom. Experimentom som zistil, že 20-redukcia molekuly kortikosterónu významnejšie znižuje jeho afinitu k MR než 11 β -oxidácia. Dvojitá modifikácia kortikosterónu (11 β -oxidácia spolu s 20-redukciou) mala, v porovnaní s 11-dehydrokortikosterónom (iba 11 β -oxidácia), za následok približne dvojnásobný pokles jeho afinity k MR. Samotnou 20-redukciou došlo k ešte výraznejšiemu poklesu afinity kortikosterónu k MR než u dvojitej modifikácie, avšak tento rozdiel nebol štatisticky významný.

Pokusy s inkubáciou tkanivových rezov ďalej dokázali, že ako u cicavcov tak aj u vtákov, sa enzýmy s 20-reduktázovou aktivitou podieľajú na metabolizme progesterónu. Tento substrát bol tkanivom obličky metabolizovaný len na 20 β -dihydro-epimér, kým tkanivo tenkého čreva redukovalo progesterón na 20 α - a 20 β -dihydro-epimér v pomere 1:3.

Všetky sledované tkanivá vykazovali vysokú 3-reduktázovú aktivitu. Táto enzymatická aktivita u mnohých polyfunkčných steroidných dehydrogenáz predstavuje jednu z ich aktivít a uplatňuje sa predovšetkým pri modifikácii účinku androgénov. Sledované tkanivá metabolizovali biologicky aktívny androgén 5 α -dihydrotestosterón (androstanolón) na 3 α - a 3 β -hydroxy-epiméry v rôznom pomere. Tieto výsledky tak poukazujú na prítomnosť viacerých steroidných dehydrogenáz s 3 α / β -reduktázovou aktivitou.

Na základe podobnosti so sekvenciami cicavcov som identifikoval a rekombinantne exprimoval kurací enzým 20 β -HSD v baktériách *E. coli* a ďalšími pokusmi dokázal, že je zodpovedný za 3- a 20-reduktázovú aktivitu nameranú v kuracích tkanivách. Sekvencia enzýmu vykazovala vysoký stupeň aminokyselinovej homológie so sekvenciami u iných stavovcov (cicavce ~ 75 %, ryby ~ 61 %). Vysoká sekvenčná homológia a takmer identická trojrozmerná štruktúra sekvencie kuracieho a prasačieho proteínu boli dôležité indikátory toho,

že identifikovaná sekvencia skutočne predstavuje kurací homológ sekvencie enzýmu 20 β -HSD prasiat.

Definitívny dôkaz o tom, že sa skutočne jednalo o enzým 20 β -HSD poskytli výsledky dokazujúce polyfunkčnú aktivitu proteínu pripraveného rekombinantnou expresiou v baktériách *Escherichia coli*. U purifikovaného proteínu bola nameraná vysoká 3 α / β -reduktázová, 17-oxidoreduktázová a nižšia 20 α / β -reduktázová aktivita. Inkubáciou enzýmu s androgénmi som zistil, že 3-reduktázová a 17-oxidoreduktázová aktivita enzýmu v prítomnosti kofaktorov NADP(H), predstavovali najvyššie namerané aktivity. 20-reduktázová aktivita bola pritom približne 10 - 15-krát nižšia. Konverzia rádioaktívne značeného progesterónu rekombinantným proteínom navyše dokázala jeho 20 α / β -stereošpecificitu, so zastúpením 20 α - a 20 β -hydroxy-epimérov v podobnom pomere (1:3), ako v prípade výsledkov z inkubácie tkaniva tenkého čreva s progesterónom.

Distribúcia transkriptu enzýmu korelovala s aktivitou nameranou na tkanivových rezoch a poskytovala tak ďalší dôkaz o tom, že identifikovaný a exprimovaný enzým 20 β -HSD predstavoval enzým zodpovedný za redukciu C₂₁ steroidov na uhlíku C₂₀ u kura. Expresia mRNA bola najvyššia v obličke a hrubom čreve; nižšia v pohlavných orgánoch a pečeni.

Kvantifikáciou expresie som navyše dokázal pohlavné rozdiely v expresii mRNA pre sledovaný enzým, ako aj reguláčný vplyv estrogénov u oboch pohlaví. Expresia bola vo väčšine tkanív vyššia u samcov než u samíc a po aplikácii estrogénov došlo u oboch pohlaví k jej významnému poklesu.

8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Ace CI, Okulicz WC. (1995). Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol*. 115(1):95-103.
- Adamkis J, Jakob FJ. (2001). A guide to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 171:1-4.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Agarwal AK, Monder C, Eckstein B, White PC. (1989). Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 β -dehydrogenase. *J Biol Chem*. 264:18939-18943.
- Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. (1994). Cloning and tissue distribution of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 105:R11-R17.
- Amelung D, Hubener HJ, Roka L, Meyerheim G. (1953). Conversion of cortisone to compound F. *J Clin Endocrinol Metab* 13:1125-1126.
- Arai R, Tamaoki B. (1967). Steroid biosynthesis in vitro by testes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol* 8:305-313.
- Arcos M. (1975). Steroid hormones in the ovarian blood of the laying turkey. *Steroids*. 25(2):169-175.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM. (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1(9):887-900.
- Baker ME. (1997). Steroid receptor phylogeny and vertebrate origins. *Mol Cell Endocrinol* 135(2):101-107.
- Baker ME. (2003). Evolution of adrenal and sex steroid action in vertebrates: a ligand-based mechanism for complexity. *Bioessays* 25(4):396-400.
- Baker ME. (2004). Co-evolution of steroidogenic and steroid-inactivating enzymes and adrenal and sex steroid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 215(1-2):55-62.
- Balthazart J, Schumacher M, Prove E. (1986). Brain testosterone metabolism during ontogeny in the zebra finch. *Brain Res* 378(2):240-250.
- Barbu V, Dautry F. (1989). Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe. *Nucleic Acids Res* 17:7115.
- Beato M, Herrlich P, Schutz G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857.

- Bernal AL, Flint AP, Anderson AB, Turnbull AC. (1980). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity (E.C. 1.1.1.146) in human placenta and decidua. *J Steroid Biochem* 13(9):1081-1087.
- Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA. (1994). Comparison of glycer- aldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* 216(1):223-6.
- Bhujle BV, Nadkarni VB. (1978). Hydroxysteroid dehydrogenases in the interrenal gland and the ovary of stork-billed kingfisher, *Pelargopsis capensis* (Linn.): a histochemical study. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 124:878-884.
- Biswas NM, Chaudhuri GR, Sarkar M, Sengupta R. (2000). Influence of adrenal cortex on testicular activity in the toad during the breeding season. *Life Sci* 66(13):1253-1260.
- Blum A, Raum A, Martin H, Maser E. (2001). Human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1/carbonyl reductase: additional domains for membrane attachment? *Chem Biol Interact* 130-132(1-3):749-59.
- Bocchi B, Fagart J, Cluzeaud F, Fay M, Rafestin-Oblin ME, Farman N. (2003). Glucocorticoid metabolism by 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 modulates human mineralocorticoid receptor transactivation activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(2-3):239-244.
- Borg B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol C* 109:219-245.
- Boswell T, Hall AR, Goldsmith AR. (1995). Testosterone is secreted extragonadally by European quail maintained on short days. *Physiol Zool* 68(6):967-984.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brem AS, Matheson KL, Conca T, Morris DJ. (1989). Effect of carbenoxolone on glucocorticoid metabolism and Na transport in toad bladder. *Am J Physiol* 257:F700-704.
- Brem AS, Morfia DJ. (1993). Interactions between glucocorticoids and mineralocorticoids in the regulation of renal electrolyte transport. *Mol Cell Endocrinol* 97:C1-C5.
- Breton R, Housett D, Mazza C., Fonticella-Camps JC. (1996). The structure of complex of human 17b-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure* 4:905-915.
- Bruchovsky N, Wilson JD. (1968). The conversion of testosterone to 5alpha-androstan-17beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 243:2012-2021.

- Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. (1999). Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140:3188-3196.
- Bury NR, Sturm A, Le Rouzic P, Lethimonier C, Ducouret B, Guigen Y, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Prunet P. (2003). Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol* 31:141-156.
- Bush IE, Hunter SA, Meigs RA. (1968). Metabolism of 11-oxygenated *Steroids* Metabolism in vitro by preparations of liver. *Biochem J* 107:239-258.
- Bustin SA. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25(2):169-193.
- Butler DG, Wilson JX, Youson JH. (1978). Transformation of corticosterone to 11-dehydrocorticosterone by nasal, Harderian, and lacrymal glands of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 34(4):475-9.
- Callard IP, Lance V, Salhanick AR, Barad D. (1978). The annual ovarian cycle of *Chrysemys picta*: correlated changes in plasma steroids and parameters of vitellogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 35(3):245-257.
- Campbell CM, Fostier A, Jalabert B, Truscott B. (1980). Identification and quantification of steroids in the serum of rainbow trout during spermiation and oocyte maturation. *J Endocrinol* 85:371-378.
- Canario AVM, Scott AP. (1990). Effects of steroids and human chorionic gonadotrophin on in vitro oocyte final maturation in two marine flatfish: The dab, *Limanda limanda*, and the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Gen Comp Endocrinol* 77:161-176.
- Canosa LF, Pozzi AG, Rosembit C, Ceballos NR. (2003). Steroid production in toads. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5):227-233.
- Claire M, Rafestin-Oblin ME, Michaud A, Corvol P, Venot A, Roth-Meyer C, Boisvieux C, Mallet A. (1978). Statistical test of models and computerized parameter estimation for aldosterone binding in rat kidney. *FEBS Lett* 88:295-299.
- Colombo L, Belvedere PC, Prando P, Scaffai P, Cisotto T. (1977). Biosynthesis of 11-deoxycorticosteroids and androgens by the ovary of the newt *Triturus alpestris alpestris* Laur. *Gen Comp Endocrinol* 33(4):480-495.
- Day JM, Tutill HJ, Newman SP, Purohit A, Lawrence HR, Vicker N, Potter BV, Reed MJ. (2006). 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 and Type 2: association between mRNA expression and activity in cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2):246-249.

- De Leeuw WJ, Slagboom PE, Vijg J. (1989). Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Res* 17(23):10137-10138.
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A, Davidson B, Di Gregorio A, Gelpke M, Goodstein DM, Harafuji N, Hastings KE, Ho I, Hotta K, Huang W, Kawashima T, Lemaire P, Martinez D, Meinertzhagen IA, Necula S, Nonaka M, Putnam N, Rash S, Saiga H, Satake M, Terry A, Yamada L, Wang HG, Awazu S, Azumi K, Boore J, Branno M, Chin-Bow S, DeSantis R, Doyle S, Francino P, Keys DN, Haga S, Hayashi H, Hino K, Imai KS, Inaba K, Kano S, Kobayashi K, Kobayashi M, Lee BI, Makabe KW, Manohar C, Matassi G, Medina M, Mochizuki Y, Mount S, Morishita T, Miura S, Nakayama A, Nishizaka S, Nomoto H, Ohta F, Oishi K, Rigoutsos I, Sano M, Sasaki A, Sasakura Y, Shoguchi E, Shin-i T, Spagnuolo A, Stainier D, Suzuki MM, Tassy O, Takatori N, Tokuoka M, Yagi K, Yoshizaki F, Wada S, Zhang C, Hyatt PD, Larimer F, Detter C, Doggett N, Glavina T, Hawkins T, Richardson P, Lucas S, Kohara Y, Levine M, Satoh N, Rokhsar DS. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298(5601):2157-2167.
- Denari D, Ceballos NR. (2005). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Bufo arenarum*: changes in its seasonal activity. *Gen Comp Endocrinol* 143(2):113-120.
- DiBattista JA, Mehdi AZ, Sandor T. (1989). Steroid C-20 oxidoreductase activity of duck intestinal mucosa: the interrelations of the enzymatic activity with steroid binding. *Gen Comp Endocrinol*. 74(1):136-147.
- Draper N, Stewart PM. (2005). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol*. 186(2):251-271
- Dubowsky S, Smalley KN. (1993). Testosterone induced growth of the oviduct in the frog, *Rana pipiens*: evidence for local aromatization. *Gen Comp Endocrinol* 89:276-282.
- Dufort I, Rheault P, Huang XF, Soucy P, Luu-The V. (1999). Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140(2):568-74.
- Dufort I, Labrie F, Luu-The V. (2001). Human types 1 and 3 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: differential lability and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 86(2):841-846.
- Ebrahimi M, Scott AP, Kime DE. (1996). Extragonadal production of 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in vitro in cyprinid fish. *Gen Comp Endocrinol* 104(3):296-303.

- Eckstein B, Azoury R. (1979). Enzymes of steroid hormone metabolism in ovarian tissue of teleosts. *Comp Biochem Physiol B* 64:309-312.
- Edwards CRW. (1990). Renal 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase: A mechanism ensuring mineralocorticoid specificity. *Horm Res* 34:114-117.
- Erulkar SD, Kelley DB, Jurman ME, Zemlan FP, Schneider GT, Krieger NR. (1981). Modulation of the neural control of the clasp reflex in male *Xenopus laevis* by androgens: a multidisciplinary study. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(9):5876-5880.
- Escriva H, Delaunay F, Laudet V. (2000). Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22:717-727
- Farber GK a Petsko GA. (1990). The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci* 15(6):228-234.
- Farman N, Rafestin-Oblin ME. (2001). Multiple aspects of mineralocorticoid selektivita. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F181-F192.
- Foskett JK, Bern HA, Machen TE, Conner M. (1983). Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. *J Exp Biol* 106:255-281.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242:583-585.
- Funder JW. (1999). Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science* 259:1132-1133.
- Furukawa A, Ohnishi T, Huang D, Araki N, Ichikawa Y. (2000). cDNA cloning and characterization of peroxisomal short-chain dehydrogenase / reductase that reduces all-trans retinal to retinol. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Gaeggeler HP, Edwards CR, Rossier BC. (1989). Steroid metabolism determines mineralocorticoid specificity in the toad bladder. *Am J Physiol* 257:F690-695.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31(13):3784-3788.
- Germain P, Altucci L, Bourguet W, Rochette-Egly C, Gronemeyer H. (2003). Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling *Pure Appl Chem* 11-12:1619-1664.
- Ghosh D, Petnev V.Z, Zhu D.W, Warwzak Z, Duax W.L, Pangborn W, Labrie F. and Lin S.X. (1995). Structure of human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.2 Å resolution. *Structure* 3:503-513.

- Ghosh D, Sawicki M, Pletnev V, Erman M, Ohno S, Nakajin S, Duax WL. (2001). Porcine carbonyl reductase. structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* 276(21):18457-18463.
- Gonzalez B, Sapra A, Rivera H, Kaplan WD, Yam B, Forrest GL. (1995). Cloning and expression of the cDNA encoding rabbit liver carbonyl reductase. *Gene* 154(2):297-298.
- Gouder BY, Nadkarni VB, Hooli MA, Saidapur SK, Bhujle BV. (1975). Steroid dehydrogenases in the kidney of musk shrew, *Crocidura caerulea*: a histochemical study. *Acta Histochem* 54:230-235.
- Griffin LD, Mellon SH. (1999). Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23):13512-13517.
- Grubb BR, Bentley PJ. (1992). Effects of corticosteroids on short-circuit current across the cecum of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J Comp Physiol B* 162(8):690-695.
- Guan G, Tanaka M, Todo T, Young G, Yoshikuni M, Nagahama Y. (1999). Cloning and expression of two carbonyl reductase-like 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase cDNAs in ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochem Biophys Res Commun* 255(1):123-128.
- Guex N, Peitsch MC. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- HAMPL R, Lapci O, Hill M, Klak J, Kasal A, Novacek A, Sterol I, Sterol J, Starka L. (2000). 7-Hydroxydehydroepiandrosterone- a natural antigluocorticoid and a candidate for steroid replacement therapy. *Physiol Res* 49:S107-S112.
- Hara A, Imamura Y, Abe H, Inoue S, Ishikura S. (2001). "Molecular characterization of mammalian carbonyl/retinal reductases. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Hellal-Levy C, Couette B, Fagart J, Souque A, Gomez-Sanchez C, Rafestin-Oblin M. (1999). Specific hydroxylations determine Selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Lett* 464:9-13.
- Hierholzer K, Siebe H, Fromm M. (1990). Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its effect on epithelial sodium transport. *Kidney Int* 38(4):673-678.
- Hoog SS, Pawlowski JE, Alzari PM, Penning TM, Lewis M. (1994). Three-dimensional structure of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(7):2517-2521.
- Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, Dillon W, Lee KF, Clark KE, Haverty P, Weng Z, Mutter GL, Frosch MP, Macdonald ME, Milford EL, Crum CP, Bueno R, Pratt RE, Mahadevappa M, Warrington JA, Stephanopoulos G, Stephanopoulos

- G, Gullans SR. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 7(2):97-104.
- Hsing AW. (2001). Hormones and prostate cancer: what's next. *Epidemiol Rev* 23:42-58.
- Hundertmark S, Buhler H, Ragosch V, Dinkelborg L, Arabin B, Weitzel HK. (1995). Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in fetal lung. *Endocrinology* 136 2573-2578.
- Chen Z, Jiang JC, Lin ZG, Lee WR, Baker ME, Chang SH. (1993). Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis. *Biochemistry* 32:3342-3346.
- Cherradi N, Defaye G, Chambaz EM. (1994). Characterization of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology* 134:1358-1364.
- Chester-Jones I, Ingleton PM, Philips JG. (1987). Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. *Plenum Press*, New York. 3-56.
- Imamura Y, Takada H, Kamizono R, Otagiri M. (2001). Hormonal regulation of male-specific 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase with carbonyl reductase-like activity present in kidney microsomes of rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78(4):373-378.
- Jamieson P, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. (1995). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 β -reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physiochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 136:4754-4761.
- Jenkins JS. (1966). The metabolism of cortisol by human extra-hepatic tissues. *J Endocrinol* 34:51-56.
- Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 326:625-36.
- Kamata R, Koda T, Morohoshi K, Umezu T, Morita M. (2005). RNA constitution and estrogen-responsive gene expression in the ovariectomized rat uterus. *Anal Biochem* 341(1):131-140.
- Kazeto Y, Ijiri S, Matsubara H, Adachi S, Yamauchi K. (2000). Cloning of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-I cDNAs from Japanese eel ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 279:451-456.
- Kime DE. (1977). Measurement of 1 α -hydroxycorticosterone and other corticosteroids in elasmobranch plasma by radioimmunoassay. *Gen Comp Endocrinol* 33(3):344-351.
- Kime DE, Hews EA. (1978). Androgen biosynthesis in vitro by testes from amphibia. *Gen Comp Endocrinol* 35(3):280-288.

- Kime DE, Hews EA, Rafter J. (1980). Steroid biosynthesis by testes of the hagfish *Myxine glutinosa*. *Gen Comp Endocrinol* 41(1):8-13.
- Kime DE, Rafter JJ. (1981). Biosynthesis of 15-hydroxylated steroids by gonads of the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*, in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 44(1):69-76.
- Kime DE, Callard GV. (1982) Formation of 15 alpha-hydroxylated androgens by the testis and other tissues of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 46(2):267-270.
- Kime DE, Scott AP, Canario AV. (1992). In vitro biosynthesis of steroids, including 11-deoxycortisol and 5alpha-pregnane-3beta,7alpha,17,20beta-tetrol, by ovaries of the goldfish *Carassius auratus* during the stage of oocyte final maturation. *Gen Comp Endocrinol* 87(3):375-384.
- Ketterson ED, Nolan V. (1994). Hormones and life histories: An integrative approach. *Am Nat* 140:S33-S62.
- Klemcke HG, Sampath Kumar R, Yang K, Vallet JL, Christenson RK. (2003). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in porcine placentae: effects of stage of gestation, breed, and uterine environment. *Biol Reprod* 69(6):1945-50.
- Kobayashi K, Ohno S, Shinoda M, Toyoshima S, Nakajin S. (1996). Immunochemical distribution and immunohistochemical localization of 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase in neonatal pig tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59(5-6):485-493.
- Kreze A, Langer P, Klimeš I, Lichardus B. (1993). Praktická endokrinológia. *Slovak Academy Press*, Bratislava. 239-250.
- Krozowski Z. (1994). Short chain alcohol dehydrogenases super - family: variations on a common theme. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51:125-130.
- Krozowski Z. (1999). The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2):121-127.
- Krozowski ZS, Funder JW. (1983). Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(19):6056-6060.
- Kusakabe M, Nakamura I, Young G. (2003). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression, and seasonal changes in gonads. *Endocrinology* 144:2534-2545.

- Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton J, Belanger A. (1997). The key role of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62:148-158.
- Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Belanger A. (2000). Intracrinology: role of the family of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* 25:1-16.
- Lakshmi V, Monder C. (1988). Purification and characterization of the corticosteroid 11beta-dehydrogenase component of the rat liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology* 123(5):2390-2398.
- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA. (1995). Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 16(9):295-303.
- Langer LJ, Engel LL. (1958). Human placental estradiol-17beta dehydrogenase. I. Concentration, characterization and assay. *J Biol Chem* 233:583-588.
- Licht P, Wood J, Owens DW, Wood F. (1979). Serum gonadotropins and steroids associated with breeding activities in the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Gen Comp Endocrinol* 39:274-289.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. (1996a). Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 39(11):1299-1305.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR, Seckl JR. (1996b). Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* 27(6):1200-1204.
- Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. (1994). The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 135:834-840.
- Lowartz S, Petkam R, Renaud R, Beamish FW, Kime DE, Raeside J, Leatherland JF. (2003). Blood steroid profile and in vitro steroidogenesis by ovarian follicles and testis fragments of adult sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 134(2):365-376.
- Lowartz SM, Renaud RL, Beamish FW, Leatherland JF. (2004). Evidence for 15alpha- and 7alpha-hydroxylase activity in gonadal tissue of the early-life stages of sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138(2):119-127.
- Luu-The V. (2001). Analysis and characteristics of multiple types of human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:143-151.

- Luu-The V, Coté J, Labrie F. (1988). Purification and characterization of human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-4- isomerase. *Clin Invest Med*. 11:C32.
- Ma YX, Matsuda K, Uchiyama M. (2005). Seasonal variations in plasma concentrations of sex steroid hormones and vitellogenin in wild male Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*) collected from different sites of the Jinzu river basin. *Zoolog Sci* 22(8):861-868.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83(6):841-850.
- Mascrez B, Mark M, Dierich A, Ghyselinck NB, Kastner P, Chambon P. (1998). The RXR α ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* 125:4691-4707.
- Maser E, Volker B, Frieberthausen J. (2002). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* 41(7):2459-2465.
- McPherson RJ, Boots LR, MacGregor R, Marion KR. (1982). Plasma steroids associated with seasonal reproductive changes in a multiclutched freshwater turtle, *Sternotherus odoratus*. *Gen Comp Endocrinol* 48:440-451.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. (1999). Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51(1):63-81.
- Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. (2001). Anatomical and biochemical evidence for the synthesis of unconjugated and sulfated neurosteroids in amphibians. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):13-24.
- Mercer WR, Krozowski ZS. (1992). Localization of an 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity to the distal nephron. Evidence for the existence of two species of dehydrogenase in the rat kidney. *Endocrinology* 130(1):540-543.
- Miksik I, Mikulikova K, Pacha J, Kucka M, Deyl Z. (2004). Application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for study of steroid-converting enzymes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 800(1-2):145-53.
- Mindnich R, Moller G, Adamski J. (2004a). The role of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 218(1-2):7-20.
- Mindnich R, Deluca D, Adamski J. (2004b). Identification and characterization of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the zebrafish, *Danio rerio*. *Mol Cell Endocrinol* 215(1-2):19-30.

- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. (1991). Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Biochem Res* 12:241-248.
- Moore CC, Mellon SH, Murai J, Siiteri PK, Miller WL. (1993). Structure and function of the hepatic form of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucocorticoid resistance. *Endocrinology* 133:368-375.
- Moore FL, Lowry CA, Rose JD. (1994). Steroid-neuropeptide interactions that control reproductive behaviors in an amphibian. *Psychoneuro Endocrinology* 19(5-7):581-92.
- Moore FL, Boyd SK, Kelley DB. (2005a). Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Horm Behav* 48(4):373-83.
- Moore S, Alexander L, Brownstein M, Guan L, Lobo S, Meng Y, Tanaguchi M, Wang Z, Yu J, Prange C, Schreiber K, Shenmen C, Wagner L, Bala M, Barbazuk S, Barber S, Babakaiff R, Beland J, Chun E, Del Rio L, Gibbon S, Hanson R, Kirkpatrick R, Liu J, Matsuo C, Mayo M, Santos RR, Stott J, Tsai M, Wong D, Siddiqui A, Holt R, Jones SJ, Marra MA. (2005b). *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Morris DJ, Souness GW, Brem AS, Oblin ME. (2000). Interactions of mineralocorticoids and glucocorticoids in epithelial target tissues *Kidney Int* 57:1370-1373.
- Muller C, Hennebert O, Morfin R. (2006). The native anti-glucocorticoid paradigm. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100(1-3):95-105.
- Muramatsu T, Sanders MM. (1995). Regulation of ovalbumin gene expression. *Poultry Avian Biol Rev* 6:107-123.
- Nagahama Y, Adachi S. (1985). Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev Biol* 109:428-435.
- Nagahama Y. (1997). 17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62(1):190-196.
- Nakajin S, Ohno S, Shinoda M. (1988a). 20β-Hydroxysteroid dehydrogenase of neonatal pig testis: Purification and some properties. *J Biochem* 104(4):565-569.
- Nakajin S, Takahashi K, Shinoda M. (1988b). Inhibitory effects and spectral changes in pig testicular cytochrome P-450(17 alpha-hydroxylase/lyase) by 20 beta-hydroxy-C21-steroids. *Yakugaku Zasshi* 108(12):1188-95.
- Nakajin S, Tamura F, Takase N, Toyoshima S. (1997). Carbonyl reductase activity exhibited by pig testicular 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biol Pharm Bull* 20(11):1215-1218.

- Nakajin S, Itoda M, Ohno S, Takase N, Toyoshima S, Baker ME. (2001). Deletion of 12 carboxyl-terminal residues from pig 3 α /beta,20 β -hydroxysteroid dehydrogenase affects steroid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1550(2):175-182.
- Nakanishi M, Deyashiki Y, Nakayama T, Sato T, Hara A. (1993). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding tetrameric carbonyl reductase of pig lung. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1311-1316.
- Nakanishi M, Deyashiki Y, Ohshima K, Hara A. (1995). Cloning, expression and tissue distribution of mouse tetrameric carbonyl reductase. Identity with an adipocyte 27-kDa protein. *Eur J Biochem* 228:381-387.
- Ohno S, Nakajin S, Shinoda M. (1991). 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase of neonatal pig testis: 3 α /beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities catalyzed by highly purified enzyme. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38(6):787-794.
- Olefsky JM. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276(40):36863-36864.
- Ottenwaelder B, Obermaier B, Deutschenbaur S, Schaipp A, Mewes HW, Weil B, Amid C, Osanger A, Fobo G, Han M, Wiemann S. (2004). *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Ozaki Y, Higuchi M, Miura C, Yamaguchi S, Tozawa Y, Miura T. (2006). Roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology* 147(11):5139-5146.
- Ozols J. (1995). Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 270:2305-2312.
- Ozon R, Fouchet C, Perin F. (1974). Transformation of testosterone into 17 β -hydroxy-5 β -androstan-3-one by *Rana esculenta* skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta* 348:425-437.
- Pacha J, Miksik I. (1994). Distribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase along the rat intestine. *Life Sci* 54(11):745-749.
- Pacha J, Miksik I. (1996). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine. *J Endocrinol* 148(3):561-566.
- Payne AH, Hales DB. (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocr Rev.* 25(6):947-970.
- Peitsch MC. (1995). Protein modeling by E-mail *Biotechnology (N Y)*. 13:658-660.
- Peltoketo H, Luu-The V, Simard J, Adamski J. (1999). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23(1):1-11.

- Penning TM. (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 18:281-305.
- Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K. (2000). Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351:67-77.
- Penning TM. (2003). Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum Reprod Update* 9(3):193-205.
- Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M. (2003). Structure-function relationships in 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5):247-255.
- Pu X, Yang K. (2000). Guinea pig 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and catalytic properties. *Steroids* 65(3):148-156.
- Puranen T, Poutanen M, Ghosh D, Vihko R, Vihko P. (1997). Origin of substrate specificity of human and rat 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, using chimeric enzymes and site-directed substitutions. *Endocrinology* 138:3532-3539.
- Rafestin-Oblin ME, Couette B, Radanyi C, Lombes M, Baulieu EE. (1989). Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine. Oligomeric structure and transformation. *J Biol Chem* 264(16):9304-9309.
- Rajan V, Chapman KE, Lyons V, Jamieson P, Mullins JJ, Edwards CRW, Seckl JR. (1995). Cloning, sequencing and tissue distribution of mouse 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:141-147.
- Reed MJ, Singh A, Ghilchik MW, Goldham NG, Purohit A. (1991). Regulation of estradiol 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in Brest tissues: the role of growth factors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:791-798.
- Rizner TL, Lin HK, Peehl DM, Steckelbroeck S, Bauman DR, Penning TM. (2003). Human type 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells. *Endocrinology* 144(7):2922-2932.
- Rheume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 5:1147-1157.

- Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?. *Trends Genet* 17(10):554-556.
- Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. (2003). The nuclear receptor superfamily *J Cell Sci* 116:585-586.
- Rodriguez-Maldonado E, Velazquez PN, Juarez-Oropeza MA, Pedernera E. (1996). Steroid metabolism in theca externa cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 101(2):173-179.
- Rosenberg J, Hurwitz S. (1987). Concentration of adrenocortical hormones in relation to cation homeostasis in birds. *Am J Physiol* 253:R20-4.
- Ryan KJ, Engel LL. (1953). The interconversion of estrone and estradiol by human tissue slices. *Endocrinology* 52:287-291
- Sabatini S, Hartsell A, Meyer M, Kurtzman NA, Hierholzer K. (1993). Corticosterone metabolism and membrane transport. *Miner Electrolyte Metab* 19(6):343-350.
- Saegusa H, Nakagawa Y, Liu YJ, Ohzeki T. (1999). Influence of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) inhibition on glucose metabolism and 11beta-HSD regulation in adult offspring of rats. *Metabolism* 48(12):1584-1588.
- Samuels L, Helmreich M, Lassater N, Reich M. (1951). An enzyme in endocrine tissues which oxidizes 5-3 hydroxy steroids to Δ^5 -3 unsaturated ketones. *Science* 113:490-491.
- Sandeep TC, Walker BR. (2001). Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Trends Endocrinol Metab* 12(10):446-453.
- Sandor T, Skadhauge E, DiBattista JA, Mehdi AZ. (1989). Interrilation of the intestina glucocortikoid and mineralokortikoid receptor systéme with salt homeostasic. V: Hughes MR, Chadwick A (eds.). Progres in Avian Osmoregulation. *Leeds Philosophical and literáty Society, Leeds*. 305-332.
- Sanchez R, de Launoit Y, Durocher F, Belanger A, Labrie F, Simard J. (1994). Formation and degradation of dihydrotestosterone by recombinant members of the rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase family. *Mol Cell Endocrinol* 103:29-38.
- Sauer LA, Chapman JC, Dauchy RT. (1994). Topology of 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase in adrenal Vortex mitochondria and microsomes. *Endocrinology* 134:751-759.
- Seckl, J.R, Cleasby, M, Nyirenda, M.J. (2000). Glucocorticoids, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney Int* 57:1412-1417.

- Schlinger BA. (1998). Sexual differentiation of avian brain and behavior: current views on gonadal hormone-dependent and independent mechanisms. *Annu Rev Physiol* 60:407-429.
- Schlinger BA, Lane NI, Grisham W, Thompson L. (1999). Androgen synthesis in a songbird: a study of *cyp17* (17 α -hydroxylase/C17,20-lyase) activity in the zebra finch. *Gen Comp Endocrinol* 113(1):46-58.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31:3381-3385.
- Schwarz M, Lund EG, Lathe R, Bjorkhem I, Russell DW. (1997). Identification and characterization of a mouse oxysterol 7- α hydroxylase cDNA. *J Biol Chem* 272:23995-24001.
- Siiteri PK. (2005). The continuing saga of dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Clin Endocrinol Metab* 90(6):3600-3605.
- Silverin B, Baillien M, Balthazart J. (2004). Territorial aggression, circulating levels of testosterone, and brain aromatase activity in free-living pied flycatchers. *Horm Behav* 45(4):225-234.
- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. (2005). Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26(4):525-582.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. (2002). Aromatase—a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64:93-127.
- Sluder AE, Mathews SW, Hough D, Yin VP, Maina CV. (1999). The Nuclear Receptor Superfamily Has Undergone Extensive Proliferation and Diversification in Nematodes. *Genome Res* 9:103-120.
- Smith HE, Smith RG, Toft DO, Neergaard JR, Burrows EP, O'Malley BW. (1974). Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus. *J Biol Chem* 249(18):5924-5932.
- Soma KK, Schlinger BA, Wingfield JC, Saldanha CJ. (2003). Brain aromatase, 5 α -reductase, and 5 β -reductase change seasonally in wild male song sparrows: relationship to aggressive and sexual behavior. *J Neurobiol* 56(3):209-221.
- Soma KK. (2006). Testosterone and aggression: Berthold, birds and beyond. *J Neuroendocrinol* 18(7):543-51.
- Sorensen PW, Ščoty AP. (1994). The evolution of hormonal sex pheromones in teleost fish; poor correlation between the pattern of steroid release by goldfish and olfactory

- sensitivity suggests that these cues evolved as a result of chemical spying rather than signal specialization. *Acta Physiol Scand* 152:191-205.
- Staub NL, DeBeer M. (1997). The role of androgens in female vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 108:1-24.
- Stewart PM, Krozowski ZS. (1999). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 57:249-324.
- Stewart PM, Murry BA, Mason JI. (1994). Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. *J Clin Endocrinol Metab* 79(2):480-484.
- Strausberg,R.L, Feingold,E.A, Grouse,L.H, Derge,J.G, Klausner,R.D, Collins,F.S, Wagner,L, Shenmen,C.M, Schuler,G.D, Altschul,S.F, Zeeberg,B, Buetow,K.H, Schaefer,C.F, Bhat,N.K, Hopkins,R.F, Jordan,H, Moore,T, Max,S.I, Wang,J, Hsieh,F, Diatchenko,L, Marusina,K, Farmer,A.A, Rubin,G.M, Hong,L, Stapleton,M, Soares,M.B, Bonaldo,M.F, Casavant,T.L, Scheetz,T.E, Brownstein,M.J, Usdin,T.B, Toshiyuki,S, Carninci,P, Prange,C, Raha,S.S, Loquellano,N.A, Peters,G.J, Abramson,R.D, Mullahy,S.J, Bosak,S.A, McEwan,P.J, McKernan,K.J, Malek,J.A, Gunaratne,P.H, Richards,S, Worley,K.C, Hale,S, Garcia,A.M, Gay,L.J, Hulyk,S.W, Villalon,D.K, Muzny,D.M, Sodergren,E.J, Lu,X, Gibbs,R.A, Fahey,J, Helton,E, Kettelman,M, Madan,A, Rodrigues,S, Sanchez,A, Whiting,M, Madan,A, Young, A.C, Shevchenko,Y, Bouffard,G.G, Blakesley,R.W, Touchman,J.W, Green,E.D, Dickson,M.C, Rodriguez,A.C, Grimwood,J, Schmutz,J, Myers,R.M, Butterfield,Y.S, Krzywinski,M.I, Skalska,U, Smailus,D.E, Schnerch,A, Schein,J.E, Jones,S.J. and Marra,M.A. (2005). *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Sturm A, Bury N, Dengreville L, Fagart J, Flouriot G, Rafestin-Oblin ME, Prunet P. (2005). 11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 146(1):44-46.
- Sugiyama T, Ohno S, Ghosh D, Nakajin S. (2004). 3alpha/beta,20beta-hydroxysteroid dehydrogenase (porcine testicular carbonyl reductase) also has a cysteine residue that is involved in binding of cofactor NADPH. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88(4-5):393-398.
- Takada H, Uchida A, Kamizono R, Otagiri M, Imamura Y. (2000). Further studies on 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase with carbonyl reductase-like activity present in liver microsomes of male rats. *Life Sci* 67(17):2075-2082.
- Tanaka M, Ohno S, Adachi S, Nakajin S, Shinoda M, Nagahama Y. (1992). Pig testicular 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase exhibits carbonyl reductase-like structure and

- activity: cDNA cloning of pig testicular 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 276(19):13451-13455.
- Tanaka M, Nakajin S, Kobayashi D, Fukada S, Guan G, Todo T, Senthilkumaran B, Nagahama Y. (2002). Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biol Reprod* 66(5):1498-1504.
- Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC. (1991). The human gene for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 266:16653-16658.
- Terada T, Sugihara Y, Nakamura K, Sato R, Sakuma S, Fujimoto Y, Fujita T, Inazu N, Maeda M. (2001). Characterization of multiple Chinese hamster carbonyl reductases. *Chem Biol Interact* 130-132(1-3):847-861.
- Tetsuka M, Yamamoto S, Hayashida N, Hayashi KG, Hayashi M, Acosta TJ, Miyamoto A. (2003). Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 177(3):445-452.
- Thibaut R, Porte C. (2004). Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92(5):485-494.
- Thomas JL, Mason JI, Blanco G, Veisaga ML. (2001). The engineered, cytosolic form of human type I 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase: purification, characterization and crystallization. *J Mol Endocrinol* 27:77-83.
- Thomas JL, Duax WL, Addlagatta A, Brandt S, Fuller RR, Norris W. (2003). Structure/function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *J Biol Chem* 278:35483-35490.
- Thornton J.W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5671-5676.
- Tsutsui K, Matsunaga M, Miyabara H, Ukena K. (2006). Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305(9):733-42.
- Usami N, Ishikura S, Abe H, Nagano M, Uebuchi M, Kuniyasu A, Otagiri M, Nakayama H, Imamura Y, Hara A. (2003). Cloning, expression and tissue distribution of a tetrameric form of pig carbonyl reductase. *Chem Biol Interact* 143:353-361.

- Velázquez P, Gómez Y, González del Pliego M, and Pedernera E. (1991). Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol* 83:243-248.
- Vylitova M, Miksik I, Pacha J. (1998). Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. *Gen Comp Endocrinol* 109(3):315-324.
- Wajima Y, Furusawa T, Kawauchi S, Wakabayashi N, Nakabayashi O, Nishimori K, Mizuno S. (1999). The cDNA cloning and transient expression of an ovary-specific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase of chickens. *Gene* 233:75-82.
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2(3):143-7.
- Watanabe K, Sugawara C, Ono A, Fukuzumi Y, Itakura S, Yamazaki M, Tashiro H, Osoegawa K, Soeda E, Nomura T. (1998). Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2. *Genomics* 52:95-100.
- Wei J, Dlouhy SR, Hara A, Ghetti B, Hodes ME. (1996). Cloning a cDNA for carbonyl reductase (Cbr) from mouse cerebellum: murine genes that express cbr map to chromosomes 16 and 11. *Genomics* 34(1):147-148.
- Weisbart M, Dickhoff WW, Gorbman A, Idler DR. (1980). The presence of steroids in the sera of the Pacific hagfish, *Eptatretus stouti*, and the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Gen Comp Endocrinol* 41(4):506-19.
- Wermuth B. (1981). Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J Biol Chem* 256(3):1206-1213.
- Wermuth B, Bohren KM, Heinemann G, von Wartburg JP, Gabbay KH. (1988). Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J Biol Chem* 263:16185-16188.
- Wermuth B, Mader-Heinemann G, Ernst E. (1995). Cloning and expression of carbonyl reductase from rat testis. *Eur J Biochem* 228(2):473-479.
- White PC, Mune T, Agarwal AK. (1997). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev* 18(1):135-56.
- Wibbels T, Owens DW, Limpus CJ, Reed PC, Amoss MS (1990). Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Gen Comp Endocrinol* 79:154-164.

- Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S. (1993). Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268(17):12964-12969.
- Yang K, Smith CL, Dales D, Hammond GL, Challis JR. (1992). Cloning of an ovine 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid: tissue and temporal distribution of its messenger ribonucleic acid during fetal and neonatal development. *Endocrinology* 131:2120-2126.
- Yoshida K, Shimada K, Saito N. (1996). Expression of P450(17-alfa) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 102:233-240.
- Yoshida S, Honda A, Matsuzaki Y, Fukushima S, Tahala N, Takagiwa A, Fujimoto Y, Miyazaki H, Salen G. (2003). Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines. *Steroids* 68:73-83.
- Young G, Adachi S, Nagahama Y. (1986). Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance (17a,20[3-dihydroxy-4-pregnen-3-one). *Dev Biol* 118:1-8.
- Zhao HF, Rheaume E, Trudel C, Couet J, Labrie F, Simard J. (1990). Structure and sexual dimorphic expression of a liver-specific rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *Endocrinology* 127:3237-3239.

9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

[³H]CS	[³ H]kortikosterón
11deCS	11-dehydrokortikosterón
11de20diCS	11-dehydro-20-dihydrokortikosterón
17α,20β-DHP	17 α ,20 β -dihydroxyprogesterón
20diCS	20-dihydrokortikosterón
5α-DHT	5 α -dihydrotestosterón
AA	akrylamid-bis
AKR	„aldo-keto reductases“
AME	„apparent mineralocorticoid excess“
APS	amónium persulfát
AR	androgénový receptor
bp	bázový pár
CBG	„corticosteroid binding globulin“
CBR	karbonyl reduktáza
CBX	karbenoxolón
cDNA	komplementárna DNA
CS	kortikosterón
DBD	DNA viažuca doména
DCC	„dextran-coated charcoal suspension“
DES	dietylstilbesterol
DHEA	dehydroepiandrosterón
DHP	dihydroxyprogesterón
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	ditiotreitól
EDTA	kyselina etylén-diamino-tetraoctová
ER	estrogénový receptor
GABA	kyselina gamma-aminomaslová
Gly	glycín
GR	glukokortikoidný receptor
His	histidín
HRE	„hormone response elements“

HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HSD	hydroxysteroid dehydrogenáza
IPTG	izopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
K_M	Michaelisova konštanta
K_d	disociačná konštanta
LB	Luria-Bertrani kultivačné médium
LBD	ligand viažuca doména
Lys	lyzín
Met	metionín
MR	mineralokortikoidný receptor
mRNA	mediátorová RNA
n	počet meraní
NAD⁺, NADH	nikotín-amid-adenín-dinukleotid a jeho redukovaná forma
NADP⁺, NADPH	nikotín-amid-adenín-dinukleotid-fosfát a jeho redukovaná forma
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PR	progesterónový receptor
RAR, RXR	receptory retínových kyselín
RNA	kyselina ribonukleová
SDR	„short-chain alcohol dehydrogenases“
SDS	sodium dodecyl-sulfát
Ser	serín
SOC médium	„super optimal catobolite“ kultivačné médium
TEMED	tetrametyl-etyléndiamín
TR	tyroidný receptor
Tris	tris-hydroxymetyl-aminometán
Tyr	tyrozín
UV	ultrafialové svetlo
VDR	receptor pre vitamín D
V_{max}	maximálna rýchlosť enzymatickej reakcie
X-Gal	5-brómo-4-chlóro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozid

10. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ ZA OBDOBIE ŠTÚDIA

Bryndová J, Klusoňová P, Kučka M, Mazancová-Vagnerová K, Mikšík I, Pácha J. (2006). Cloning and expression of chicken 20-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Mol Endocrinol* 37(3):453-62

Mazancová K, Kučka M, Mikšík I, Pácha J. (2005). Glucocorticoid metabolism and Na⁺ transport in chicken intestine. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 303(2):113-22

Mikšík I, Mikulíková K, Pácha J, Kučka M, Deyl Z. (2004). Application of liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry for study of steroid-converting enzymes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 800(1-2):145-53

Kučka M, Vagnerová K, Klusoňová P, Mikšík I, Pácha J. (2006). Corticosterone metabolism in chicken tissues: evidence for tissue-specific distribution of steroid dehydrogenases. *Gen Comp Endocrinol* 147(3):377-83

Pácha J, Mikšík I, Mrnka L, Zemanová Z, Bryndová J, Mazancová K, Kučka M. (2004). Corticosteroid regulation of colonic ion transport during postnatal development: Methods for corticosteroid analysis. *Physiol Res* 53:863-880

V recenznom konaní:

Klusoňová P, Kučka M, Ergang P, Mikšík I, Bryndová J, Pácha J. (2007). Cloning of chicken 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its tissue distribution.

Obsah

1. ÚVOD	5
2. LITERÁRNY PREHĽAD	7
2.1. BIOSYNTÉZA STEROIDNÝCH HORMÓNOV	7
2.2. DEHYDROGENÁZY METABOLIZMU STEROIDNÝCH HORMÓNOV	12
2.2.1. <i>3α-hydroxysteroid dehydrogenáza</i>	15
2.2.2. <i>3β-hydroxysteroid dehydrogenáza</i>	17
2.2.3. <i>17β-hydroxysteroid dehydrogenáza</i>	18
2.2.4. <i>11β-hydroxysteroid dehydrogenáza</i>	20
2.2.4.1. <i>Izofорма 1 enzýmu 11β-hydroxysteroid dehydrogenáza (11β-HSD1)</i>	21
2.2.4.2. <i>Izofорма 2 enzýmu 11β-hydroxysteroid dehydrogenáza (11β-HSD2)</i>	22
2.2.5. <i>3α/β-20β-hydroxysteroid dehydrogenáza (karbonyl reduktáza 1)</i>	24
2.3. STEROIDNÉ HORMÓNY A ICH METABOLIZMUS U CICA VCOV A OSTATNÝCH SKUPÍN STAVO VCOV	28
2.3.1. <i>Androgény</i>	28
2.3.1.1. <i>Ryby</i>	28
2.3.1.2. <i>Obojživelníky</i>	29
2.3.1.3. <i>Plazy</i>	29
2.3.1.4. <i>Vtáky</i>	30
2.3.1.5. <i>Cicavce</i>	30
2.3.2. <i>Estrogény a progestíny</i>	31
2.3.2.1. <i>Ryby</i>	32
2.3.2.2. <i>Obojživelníky</i>	33
2.3.2.2. <i>Plazy</i>	33
2.3.2.3. <i>Vtáky</i>	33
2.3.2.4. <i>Cicavce</i>	34
2.3.3. <i>Glukokortikoidy a mineralokortikoidy</i>	35
2.3.3.1. <i>Ryby</i>	35
2.3.3.2. <i>Obojživelníky</i>	36
2.3.3.3. <i>Vtáky</i>	37
2.3.3.4. <i>Cicavce</i>	38
2.4. RECEPTORY STEROIDNÝCH HORMÓNOV	40
2.4.1. <i>Kortikoidné receptory - mineralokortikoidný receptor</i>	42
2.4.2. <i>Evolúcia steroidných receptorov</i>	45
3. CIELE PRÁCE.....	48
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	49

4.1. POUŽITÉ ZVIERATÁ	49
4.2. POUŽITÉ PRÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, DATABÁZY A SOFTWARE	49
4.3. KONVERZIA STEROIDNÝCH SUBSTRÁTOV TKANIVOVÝMI REZMI	52
4.3.1. <i>Extrakcia steroidov</i>	53
4.3.2. <i>Vysokoučinná kvapalinová chromatografia – HPLC</i>	53
4.3.2.1. <i>Detekcia kortikosterónu a jeho derivátov</i>	53
4.3.2.2. <i>Detekcia progesterónu a jeho derivátov</i>	54
4.3.2.3. <i>Detekcia androstanolónu a jeho derivátov</i>	54
4.4. CHARAKTERIZÁCIA MINERALOKORTIKOIDNÉHO RECEPTORA: VYTESŇOVACÍ EXPERIMENT	55
4.4.1. <i>Izolácia cytozolu z buniek tkaniva obličky</i>	55
4.4.2. <i>Vytesňovací experiment s jedným väzbovým miestom</i>	56
4.5. IDENTIFIKÁCIA cDNA SEKVENCIE KURACIEHO ENZÝMU 20β-HSD	58
4.5.1. <i>Izolácia RNA</i>	59
4.5.2. <i>Reverzná transkripcia</i>	60
4.6. REKOMBINANTNÁ EXPRESIA 20β-HSD V BAKTÉRIÁCH <i>ESCHERICHIA COLI</i>	61
4.6.1. <i>Charakterizácia expresného vektoru pET-15b</i>	61
4.6.2. <i>Príprava a štiepenie plazmidu pET-15b</i>	63
4.6.3. <i>Príprava a štiepenie sekvencie 20β-HSD</i>	65
4.6.4. <i>Ligácia DNA sekvencie enzýmu 20β-HSD do plazmidu pET-15b a transformácia baktérií <i>Escherichia coli</i></i>	67
4.6.5. <i>Expresia fúzneho proteínu 20β-HSD</i>	70
4.6.5.1. <i>Spracovanie buniek s indukovanou tvorbou fúzneho proteínu 20β-HSD metódou SDS – Page</i>	71
4.6.5.2. <i>Purifikácia fúzneho proteínu</i>	72
4.6.5.3. <i>Vyštiepenie enzýmu 20β-HSD z fúzneho proteínu</i>	73
4.6.6. <i>Meranie substrátovej špecificity rekombinantného enzýmu 20β-HSD</i>	74
4.6.6.1. <i>Meranie substrátovej špecificity 20β-HSD – rádiometrická assay</i>	74
4.6.6.2. <i>Meranie substrátovej špecificity 20β-HSD – spektrofotometrická assay</i>	74
4.7. KVANTIFIKÁCIA EXPRESIE mRNA ENZÝMU 20β-HSD V KURACÍCH TKANIVÁCH METÓDOU „REAL-TIME“ PCR	77
4.8. ŠTATISTICKÉ METÓDY	79
5. VÝSLEDKY	80
5.1. KONVERZIA STEROIDNÝCH SUBSTRÁTOV TKANIVOVÝMI REZMI	80
5.1.1. <i>Konverzia kortikosterónu tkanivovými rezmi</i>	80
5.1.2. <i>Konverzia progesterónu tkanivovými rezmi</i>	81
5.1.3. <i>Konverzia androstanolónu tkanivovými rezmi</i>	82
5.2. CHARAKTERIZÁCIA MINERALOKORTIKOIDNÉHO RECEPTORA – VYTESŇOVACÍ EXPERIMENT	84

5.3. IDENTIFIKÁCIA cDNA SEKVENCIE KURACIEHO PROTEÍNU 20β-HSD	86
5.4. PRÍPRAVA A PURIFIKÁCIA REKOMBINANTNÉHO PROTEÍNU 20β-HSD	92
5.5. MERANIE SUBSTRÁTOVEJ ŠPECIFICITY ENZÝMU 20β-HSD	94
5.5.1. <i>Meranie substrátovej špecificity enzýmu 20β-HSD - rádiometrická assay.....</i>	<i>94</i>
5.5.1.1. <i>Konverzia [³H]kortikosterónu.....</i>	<i>94</i>
5.5.1.2. <i>Konverzia [³H]progesteronu.....</i>	<i>95</i>
5.5.1.3. <i>Konverzia [³H]androstanolónu.....</i>	<i>96</i>
5.5.2. <i>Meranie substrátovej špecificity enzýmu 20β-HSD - spektrofotometrická assay</i>	<i>97</i>
5.5.2.1. <i>20-oxidoreduktázová aktivita</i>	<i>97</i>
5.5.2.2. <i>3-oxidoreduktázová aktivita</i>	<i>98</i>
5.5.2.3. <i>17-oxidoreduktázová aktivita</i>	<i>99</i>
5.6. KVANTIFIKÁCIA EXPRESIE mRNA ENZÝMU 20β-HSD V KURACÍCH TKANIVÁCH METÓDOU „REAL-TIME“ PCR	100
6. DISKUSIA	103
7. SÚHRN.....	110
8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	112
9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	131
10. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ ZA OBDOBIE ŠTÚDIA	133
