

## 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 C<sub>11</sub> enzýmom 11 $\beta$ -HSD. Na rozdiel od cicavcov bol však tento substrát predovšetkým redukovaný na uhlíku C<sub>20</sub>. 20-reduktázová aktivita bola prítomná vo všetkých sledovaných tkanivách a vo väčšine z nich bola významne vyššia než 11 $\beta$ -oxidázová aktivita.

Význam dvojitej modifikácie molekuly kortikosterónu (11 $\beta$ -oxidácia a 20-redukcia) a možnú spoluprácu enzýmu 20 $\beta$ -HSD s enzýmom 11 $\beta$ -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 $\beta$ -oxidácia. Dvojitá modifikácia kortikosterónu (11 $\beta$ -oxidácia spolu s 20-redukciou) mala, v porovnaní s 11-dehydrokortikosterónom (iba 11 $\beta$ -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 $\beta$ -dihydro-epimér, kým tkanivo tenkého čreva redukovalo progesterón na 20 $\alpha$ - a 20 $\beta$ -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 $\alpha$ -dihydrotestosterón (androstanolón) na 3 $\alpha$ - a 3 $\beta$ -hydroxy-epiméry v rôznom pomere. Tieto výsledky tak poukazujú na prítomnosť viacerých steroidných dehydrogenáz s 3 $\alpha$ / $\beta$ -reduktázovou aktivitou.

Na základe podobnosti so sekvenciami cicavcov som identifikoval a rekombinantne exprimoval kurací enzým 20 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD prasiat.

Definitívny dôkaz o tom, že sa skutočne jednalo o enzým 20 $\beta$ -HSD poskytli výsledky dokazujúce polyfunkčnú aktivitu proteínu pripraveného rekombinantnou expresiou v baktériách *Escherichia coli*. U purifikovaného proteínu bola nameraná vysoká 3 $\alpha$ / $\beta$ -reduktázová, 17-oxidoreduktázová a nižšia 20 $\alpha$ / $\beta$ -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 naviac dokázala jeho 20 $\alpha$ / $\beta$ -stereošpecificitu, so zastúpením 20 $\alpha$ - a 20 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD predstavoval enzým zodpovedný za redukciu C<sub>21</sub> steroidov na uhlíku C<sub>20</sub> u kura. Expresia mRNA bola najvyššia v obličke a hrubom čreve; nižšia v pohlavných orgánoch a pečeni.

Kvantifikáciou expresie som naviac 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.