

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**ZÁKLADNÍ CHARAKTERIZACE LIDSKÝCH  
ENZYMŮ DHRS7B A DHRS7C**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.**

**Konzultant: PharmDr. Hana Navrátilová, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2017**

**Tereza Tučková**

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškeré zdroje, ze kterých jsem při jejím zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně ocitovány. Práce nebyla použita k získání žádného dalšího titulu.“

V Hradci Králové, dne

Tereza Tučková

**Poděkování:**

„Chtěla bych poděkovat svým školitelkám RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D.  
a PharmDr. Haně Navrátilové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování mé diplomové  
práce a za trpělivost, kterou se mnou po celou dobu měly.“

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických věd**

**Kandidát:** Tereza Tučková

**Školitel:** RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

**Název práce:** Základní charakterizace lidských enzymů DHRS7B a DHRS7C

Lidské enzymy z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem, anglicky „short-chain dehydrogenase/reductase“ (SDR) se účastní mnoha fyziologických pochodů, jako je metabolismus lipidů, sacharidů, aminokyselin, steroidních hormonů, retinoidů, prostaglandinů a dalších. Mimoto hrají roli také v patogenezi některých onemocnění, například hormon-dependentních nádorů, metabolického syndromu a diabetu mellitu. Navíc se některé enzymy podílejí na biotransformaci xenobiotik. Nicméně asi 30 % zástupců SDR bohužel nebylo doposud vůbec charakterizováno. Lidské dehydrogenasy/reduktasy DHRS7B a DHRS7C patří mezi nedostatečně popsané SDR. Na základě bioinformatických dat se předpokládá, že se jedná o membránově vázané proteiny s redukční aktivitou. Cílem této práce bylo určit jejich základní biochemické vlastnosti. Výsledky ukazují, že oba enzymy interagují s membránou endoplazmatického retikula a jsou orientovány do cytosolu. Byl proveden prvotní screening enzymové aktivity. U DHRS7B i DHRS7C převládala redukční aktivita, která dosahovala vyšších hodnot v přítomnosti NADH jako kofaktoru a byla detekována například vůči estronu, androstendionu, progesteronu, glukóze, glycerinaldehydu, prednisonu, ketoprofenu nebo ketotifenu.

# ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Tereza Tučková

**Supervisor:** RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

**Title:** Basic characterization of human enzymes DHRS7B and DHRS7C

Human enzymes of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily play an important role in wide range of biochemical pathways. They are involved in metabolism of lipids, saccharides, amino acids, steroid hormones, retinoids, prostaglandins etc. Besides physiological processes, they take part in development of several serious diseases, e.g. hormone-dependent cancer, metabolic syndrome, diabetes mellitus. Moreover, SDR enzymes contribute to biotransformation of xenobiotics. Nevertheless, approximately 30 % of SDRs remain completely uncharacterized. Human dehydrogenase/reductase SDR family members 7B (DHRS7B) and 7C (DHRS7C) belong to poorly characterized members of the SDR superfamily. According to *in silico* predictions, both enzymes are membrane bound and involved in reductive reactions. The aim of this study was to determine their basic biochemical properties. The results show that both enzymes interact with the membrane of endoplasmic reticulum and face cytosol. The pilot screening of enzymatic activity was performed. Reducing activity was detected towards e.g. estrone, androstendione, progesterone, glucose, glyceraldehyde, prednisone, ketoprofene or ketotifene for both enzymes with higher values in the presence of NAD(H) as cofactor.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Nadrodina SDR enzymů.....	9
2.2	Klasifikace a nomenklatura SDR nadrodiny .....	12
2.3	Lidské SDR enzymy .....	14
2.3.1	Lidské 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy .....	16
2.3.2	Lidské 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy .....	18
2.3.1	Lidské retinoldehydrogenasy .....	21
2.3.2	Lidské dehydrogenasy/reduktasy.....	23
3	CÍL PRÁCE.....	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
4.1	Materiály a pomůcky.....	27
4.1.1	Přístrojové vybavení .....	27
4.1.2	Chemikálie .....	27
4.1.3	Roztoky .....	28
4.1.4	Enzymy.....	28
4.1.5	Protilátky .....	28
4.1.6	Pufry.....	29
4.1.7	Molekulové markery.....	29
4.2	Metody.....	30
4.2.1	Stanovení membránové topologie DHRS7B a DHRS7C.....	30
4.2.2	Screening enzymové aktivity DHRS7B a DHRS7C.....	36
5	VÝSLEDKY .....	38
5.1	Stanovení membránové topologie DHRS7B a DHRS7C.....	38

5.1.1	Alkalická extrakce a extrakce detergentem .....	38
5.1.2	Inkubace s proteinasou K .....	39
5.2	Screening enzymové aktivity DHR57B a DHR57C.....	40
6	DISKUZE .....	50
7	ZÁVĚR.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	57
	Obrázky.....	57
	Tabulky .....	59
	POUŽITÁ LITERATURA.....	60

## 1 ÚVOD

Od 90. let, kdy byl zaveden pojem „SDR“ (short-chain dehydrogenase/reductase) (Persson *et al.*, 2009) a bylo určeno prvních 20 zástupců dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem, postupoval výzkum velmi rychle. Díky využití algoritmu skrytého Markovova modelu bylo identifikováno na 47 000 členů této nadrodiny. V roce 2012 se nacházelo v databázi UniProt více než 160 000 záznamů (Persson and Kallberg, 2013) a tři roky poté již přes 670 000 záznamů (Jörnvall *et al.*, 2015). SDR nadrodina je tedy jednou z nejrozsáhlejších proteinových rodin (Persson and Kallberg, 2013). Zástupci SDR se vyskytují ve všech formách života. Nalezneme je u Archea, bakterií i eukaryot (Bray *et al.*, 2009).

U člověka se SDR enzymy účastní mnoha fyziologických pochodů (například syntézy steroidních hormonů nebo cyklu vidění), ale hrají roli také v patogenezi některých onemocnění. Poruchy funkce těchto enzymů nebo změny v jejich expresi mohou vést k rozvoji metabolického syndromu, Cushingova syndromu nebo hormon-dependentních nádorů prsu a prostaty. Navíc se některé enzymy podílejí na biotransformaci xenobiotik. Díky tomu představují někteří členové SDR nadrodiny potenciální terapeutické cíle. Nicméně značná část z nich je jen poměrně málo charakterizována. Mezi takové zástupce patří i DHRS7B a DHRS7C. Je nezbytné charakterizovat tyto enzymy na úrovni tkáňové i buněčné lokalizace a určit jejich biologickou aktivitu. To nám umožní pochopit jejich funkce v (pato)fyziologických procesech (Štambergová, 2013) a následně využít tyto poznatky pro další výzkum.



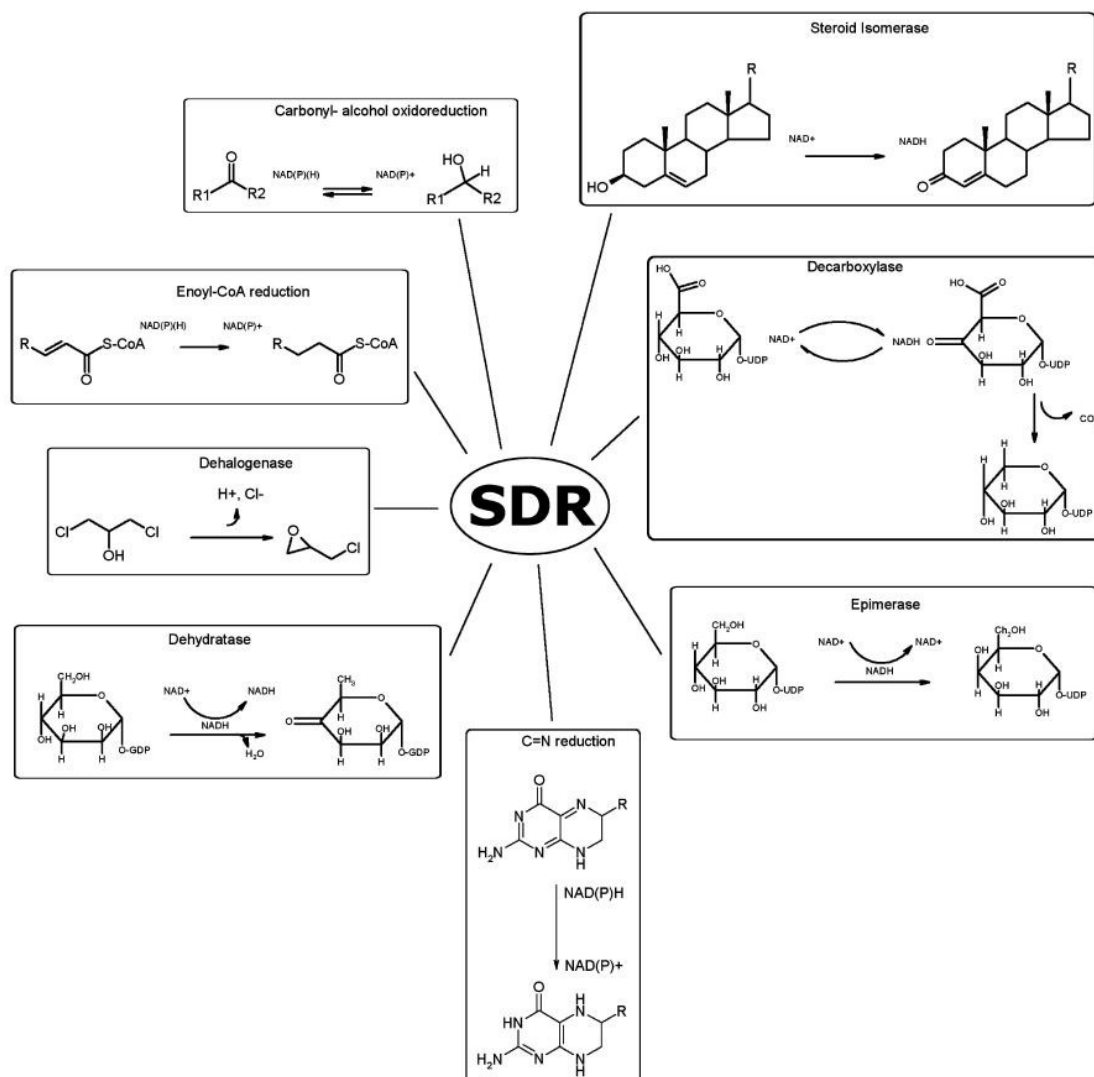
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nadrodina SDR enzymů

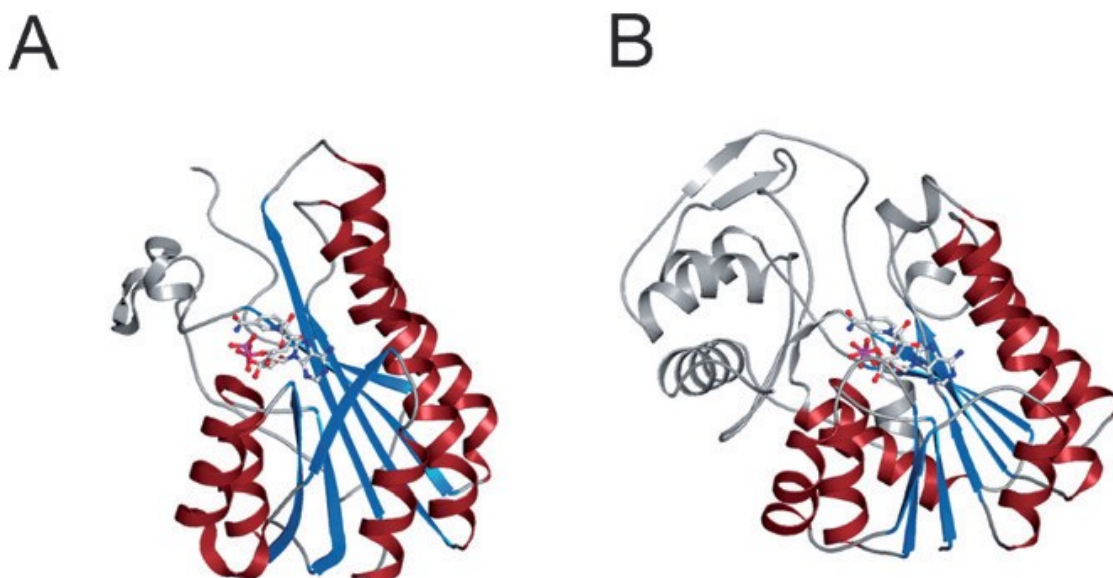
Většinu enzymů SDR nadrodiny představují oxidoreduktasy katalyzující NAD(P)(H)-dependentní reakce se substráty jako jsou například steroidy, retinoidy, lipidy, polyoly, prostaglandiny nebo i xenobiotika. Řadí se sem ale také lyasy, isomerasy, dekarboxylasy, dehalogenasy, dehydratasy, sulfotransferasy nebo epimerasy (Kavanagh *et al.*, 2008; Bray *et al.*, 2009).

Jednotliví zástupci mezi sebou vykazují poměrně nízkou sekvenční identitu, jen 20-30 %. Přesto u nich můžeme pozorovat určité společné znaky (Bray *et al.*, 2009; Kallberg *et al.*, 2010). Polypeptidový řetězec je tvořen přibližně 250 aminokyselinami. U zástupců s prodlouženým C-koncem to může být až 350 aminokyselin (Persson and Kallberg, 2013). Aktivní místo, které je tvořeno pro SDR typickou katalytickou tetradou (Tyr-Lys-Ser-Asn) (Persson and Kallberg, 2013), se nachází na strukturně variabilním C-konci. Díky této variabilitě mohou SDR vázat a metabolizovat rozličné substráty (Obrázek 1) (Bray *et al.*, 2009). Na strukturně konzervativním N-konci se nalézá jedno z důležitých míst pro vazbu kofaktoru, nikotinamidadeninukleotidu (NAD(H)), případně nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP(H)) – motiv bohatý na glycin (Thr-Gly-x-x-Gly-x-Gly), který umožňuje vazbu pyrofosfátové části kofaktoru. Blízko tohoto motivu jsou v řetězci přítomné kyselé nebo zásadité zbytky aminokyselin určující NAD(P)(H) preferenci (Kavanagh *et al.*, 2008; Bray *et al.*, 2009; Štambergová, 2013). V případě enzymů preferujících NAD(H) se jedná o kyselé zbytky aminokyselin. Enzym preferující NADP(H) naopak obsahuje zbytky zásaditých aminokyselin (Bray *et al.*, 2009).

Mechanismus většiny reakcí katalyzovaných SDR enzymy je sekvenčně uspořádaný – dvousubstrátový (tzv. bi-bi). Při něm se kofaktor váže na enzym jako první. Poté se váže substrát a po proběhnutí reakce se odpojí produkt. Jako poslední odstupuje kofaktor (Kavanagh *et al.*, 2008).



Obrázek 1 - Reakce katalyzované enzymy z SDR nadrodiny (Kavanagh *et al.*, 2008).



**Obrázek 2 - Rossmannův záhyb.**

$\beta$ -skládané listy jsou znázorněné modře,  $\alpha$ -helixy červeně.

Kofaktory jsou zakresleny pomocí konformačních vzorců.

A – „Classical“ SDR (3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa; PDB 2hsd),

B – „Extended“ SDR (galaktosaepimerasa; PDB 1xel) (Kavanagh *et al.*, 2008).

SDR mají typické uspořádání terciární struktury poukazující na evoluční příbuznost s dehydrogenasami/reduktasami se středně dlouhým řetězcem, anglicky „medium-chain dehydrogenases/reductases“ (MDR). Jádro enzymu tvoří tzv. Rossmannův záhyb složený ze 6-7 paralelně uspořádaných  $\beta$ -skládaných listů, které jsou z obou stran obklopeny 3-4  $\alpha$ -helixy (Obrázek 2) (Kavanagh *et al.*, 2008; Persson and Kallberg, 2013).

Zástupci SDR nadrodiny se mohou vyskytovat ve formě monomerů, dimerů nebo tetramerů. Na rozdíl od jiných nadrodin enzymů, například MDR, SDR nepotřebují ke své funkci žádný iont kovu (Persson and Kallberg, 2013).

## 2.2 Klasifikace a nomenklatura SDR nadrodiny

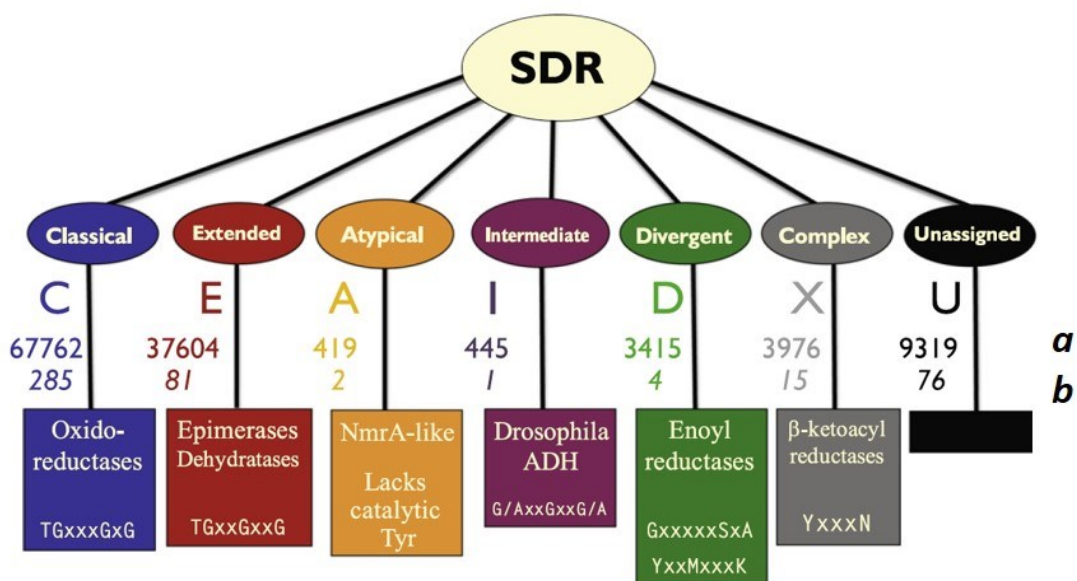
Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o velice různorodou skupinu enzymů, jejíž počet členů se neustále zvyšuje, bylo nutné zavést systém klasifikace a jednotnou nomenklaturu. Pomocí algoritmu skrytého Markovova modelu (Hidden Markov Model, HMM) byl vytvořen semi-automatický klasifikační systém, který rozřazuje proteiny do rodin (Persson *et al.*, 2009; Kallberg *et al.*, 2010; Persson and Kallberg, 2013).

SDR z celé živočišné říše tak byly rozděleny do 464 rodin (Persson and Kallberg, 2013). Zástupce nalezené u člověka lze přiřadit k 47 z nich a jsou označovány nejnižšími čísly. Dále jsou číslovány rodiny, které se vyskytují u savců a jiných eukaryot. Následují rodiny přítomné u bakterií a Archea. Jako poslední se číslovají rodiny, které nalezneme pouze u bakterií, seřazené podle jejich snižujícího se počtu zástupců (Persson *et al.*, 2009).

Na základě charakteristických motivů je uskutečňováno další dělení na 7 typů. Každý z nich má přiřazené písmeno, které se promítne v názvu enzymu – C=„classical“, E=„extended“, A=„atypical“, I=„intermediate“, X=„complex“, D=„divergent“ a U=„unassigned“ (Obrázek 3) (Persson and Kallberg, 2013).

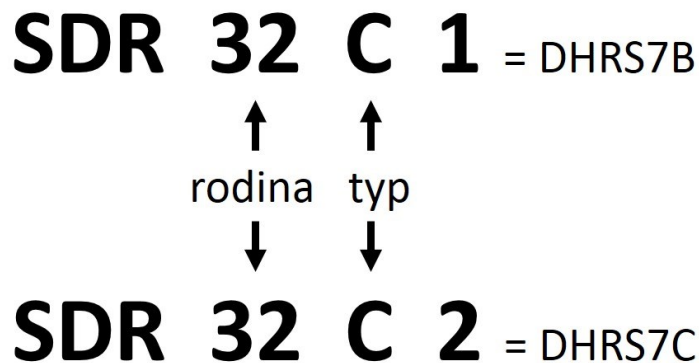
V nomenklatuře je na prvním místě název nadrodiny (SDR), následuje číslo rodiny (u člověka 1-47) a písmeno udávající typ. Poslední číslo značí konkrétního zástupce. Každý enzym má tedy své vlastní označení (Obrázek 4) (Persson *et al.*, 2009).

Někdy je za poslední číslicí uvedeno písmeno „P“, které značí pseudogen. Hvězdička (\*) vyjadřuje, že se u enzymu rozlišují jednotlivé polymorfismy (například SDR11E1\*1, SDR11E1\*2, SDR11E1\*3) (Persson *et al.*, 2009).



**Obrázek 3 - Typy SDR enzymů.**

Čísla uvádějí počty členů (*a*) a rodin (*b*) jednotlivých typů, v obdélnících jsou uvedeny informace o převládající aktivitě jejich zástupců a specifická sekvence aktivního místa (Persson and Kallberg, 2013).



**Obrázek 4 - Nomenklatura SDR enzymů.**

### 2.3 Lidské SDR enzymy

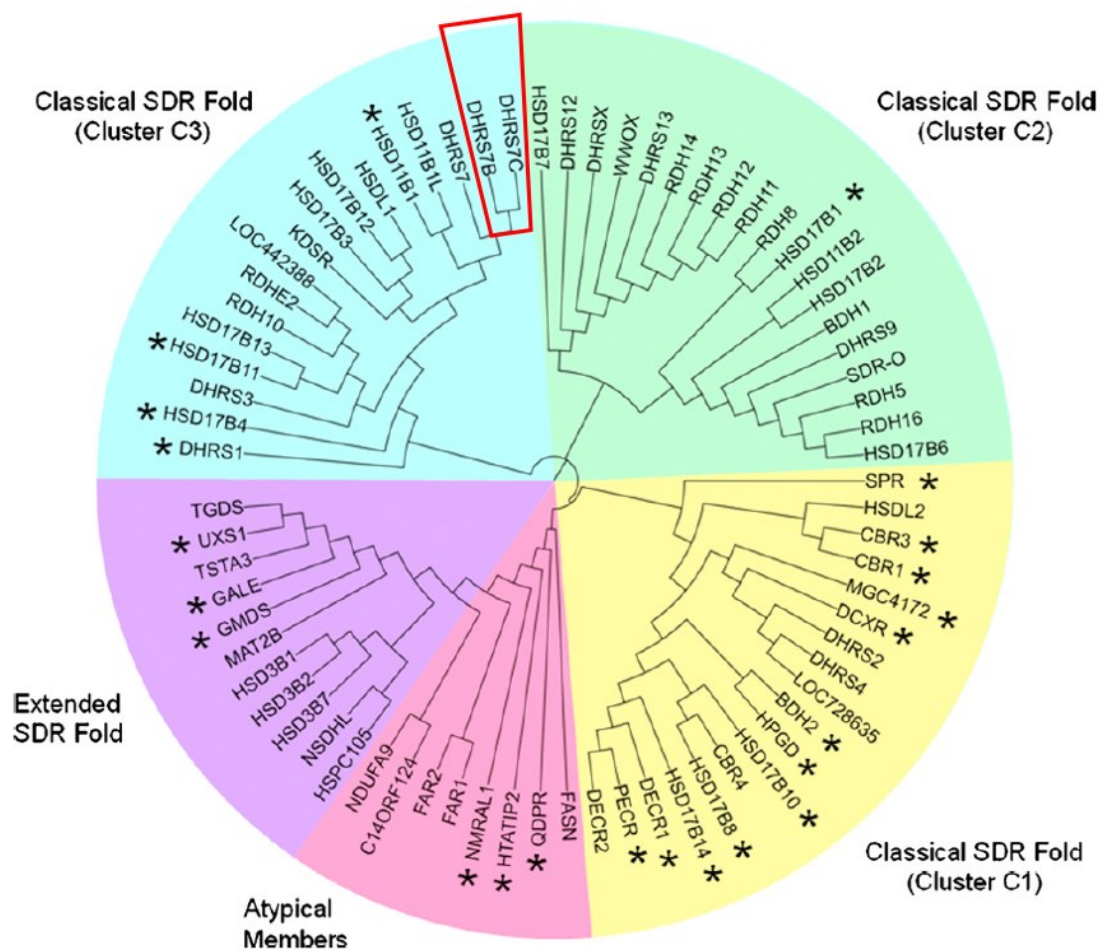
V lidském genomu bylo nalezeno 80 SDR genů pro enzymy SDR nadrodiny, které lze, jak již bylo zmiňováno u nomenklatury, rozdělit do 47 rodin (Persson and Kallberg, 2013; Bhatia *et al.*, 2015). Největší počet zástupců se řadí ke „classical“ (54 členů) a „extended“ (11 členů). Dalších 8 členů bylo prozatím přiřazeno k „atypical“, dokud nebude známo více informací o jejich struktuře (Bray *et al.*, 2009).

Na základě analýzy sekvencí a predikce sekundární struktury byla skupina „classical“ dále rozdělena do tří klastrů (Obrázek 5) (Bray *et al.*, 2009).

Do klastru 1 (C1) se řadí 18 zástupců. Průměrná délka jejich polypeptidového řetězce je ~281 aminokyselin. Většina těchto enzymů není lokalizovaná v membráně. Široké spektrum substrátů zahrnuje látky související s koenzymem A (CoA), prostaglandiny a molekuly podobné chinonu (Bray *et al.*, 2009).

Většinu zástupců z klastru 2 (C2) (19 zástupců) a klastru 3 (C3) (17 zástupců) představují membránově vázané proteiny. Od enzymů z C1 se liší přítomností transmembránové jednotky. Délka polypeptidového řetězce je přibližně 340 aminokyselin. Substrátovou specifitu vykazují především vůči retinoidům a steroidům (Bray *et al.*, 2009).

K zástupcům ze skupiny „extended“ se řadí epimerasy (6 členů) a 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy (3 $\beta$ -HSD) (5 členů). Epimerasy nejsou membránově vázané, jejich polypeptidový řetězec čítá přibližně 360 aminokyselin. Metabolizují sacharidové složky nukleotidů. 3 $\beta$ -HSD jsou membránově vázané, skládají se asi z 375 aminokyselin a podílejí se na metabolismu steroidů (Bray *et al.*, 2009).



Obrázek 5 - Rozdělení lidských SDR enzymů na typy a klastry (Bray *et al.*, 2009).

Na uvedeném diagramu (Obrázek 5) lze pozorovat příbuznost DHR57B a DHR57C (v červeném rámečku) s některými enzymy z klastru 3, například s retinoldehydrogenasami. Dále jsou příbuzné s 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasou 1 (HSD11B1) a 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasami (HSD17B), které patří mezi nejlépe charakterizované SDR enzymy. DHR57B a DHR57C zastupují naopak enzymy, jejichž vlastnosti, jako je preference kofaktoru, lokalizace v buňce nebo uspořádání kvarterní struktury zůstávají prozatím neznámé.

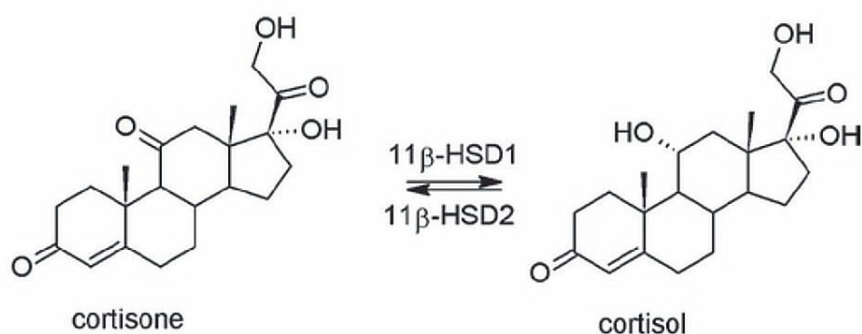
### 2.3.1 Lidské 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy

Kortikosteroidy jsou steroidní hormony produkované v kůře nadledvin. Mají význam pro růst a diferenciaci. Glukokortikoidy (u člověka kortisol) regulují metabolismus, adaptaci organismu na stres a imunitní systém. Mineralokortikoidy (aldosteron) se podílí na udržení homeostázy a regulaci krevního tlaku (Wu *et al.*, 2007; Odermatt and Nashev, 2010; Škarydová and Wsól, 2012; Štambergová, 2013).

Hormony působí prostřednictvím jaderných glukokortikoidních (GR) a mineralokortikoidních receptorů (MR), které se buď přímo naváží na promotor odpovídajícího genu nebo působí nepřímo interakcí s dalšími transkripčními faktory (Odermatt and Nashev, 2010; Škarydová and Wsól, 2012). Pro vazbu kortikosteroidů na receptor je klíčová hydroxyskupina v pozici 11. Její redukcí vznikají inaktivní 11-ketoformy. Reverzibilní konverze mezi biologicky aktivním kortisolem a kortisonem je katalyzována 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasami (11 $\beta$ -HSD) a představuje způsob regulace intracelulárních hladin hormonů (Wu *et al.*, 2007; Odermatt and Nashev, 2010; Škarydová and Wsól, 2012).

Existují dvě 11 $\beta$ -HSD – 11 $\beta$ -HSD1 a 11 $\beta$ -HSD2 (Škarydová and Wsól, 2012). I přes to, že se oba enzymy podílejí na konverzi glukokortikoidů (Obrázek 6), v mnohém se liší. Mají odlišný původ, nízkou sekvenční identitu, a dokonce jsou lokalizovány na jiných chromozomech. 11 $\beta$ -HSD1 (SDR26C1), řadící se do klastru 3, se nejvíce podobá 11 $\beta$ -HSD3 a DHRS7C. 11 $\beta$ -HSD2 (SDR26C3) je nejbližší příbuzná se 17 $\beta$ -HSD2 (obě patří do klastru 2), která přeměňuje estradiol na estron (Odermatt and Nashev, 2010; Škarydová and Wsól, 2012). Rozdílná je také distribuce obou enzymů v různých tkáních, korespondující se směrem reakce, který katalyzují. 11 $\beta$ -HSD1 představuje aktivační systém glukokortikoidů, vyskytuje se tedy v tkáních pro ně cílových (játra, tuková tkáň, plíce, kosterní svalstvo a centrálním nervovém systému (CNS)). 11 $\beta$ -HSD2 snižuje hladinu aktivního hormonu a je exprimována v tkáních, které jsou cílové pro aldosteron (především ledviny a tračník, ale i placenta a vaskulární epitelové buňky). Zajišťuje tak ochranu MR před navázáním kortisolu, který má k MR stejnou afinitu jako ke GR, a umožňuje vazbu aldosteronu (Wu *et al.*, 2007; Odermatt and Nashev, 2010; Škarydová and Wsól, 2012).





**Obrázek 6 - Konverze mezi kortisonem a kortisolem (Škarydová and Wsól, 2012).**

Obě  $11\beta$ -HSD jsou membránové enzymy endoplazmatického retikula (ER), ale jejich topologie je různá, což souvisí i s preferencí kofaktorů.  $11\beta$ -HSD2 směřuje do cytosolu a chová se jako  $\text{NAD}^+$ -dependentní oxidasa.  $11\beta$ -HSD1 je orientována do lumen ER. *In vivo* působí převážně jako  $\text{NADPH}$ -dependentní reduktasa a to díky protein-protein interakci s hexosa-6-fosfátdehydrogenasou (H6PDH). H6PDH vytváří v lumen ER redukovaný kofaktor  $\text{NADPH}$ , který membránou ER neprostupuje (Wu *et al.*, 2007; Atanasov *et al.*, 2008; Odermatt and Nashev, 2010; Škarydová and Wsól, 2012; Štambergová, 2013).

Na rozdíl od  $11\beta$ -HSD2 se  $11\beta$ -HSD1 významně podílí na první fázi biotransformace látek s karbonylovou skupinou (metyrapon, ketoprofen, 4-nitrobenzaldehyd, 4-nitroacetofenon). Tento enzym se uplatňuje i při detoxikaci chinonů, NNK (karcinogen obsažený v tabákovém kouři) a podílí se i na metabolismu oxidovaných derivátů cholesterolu (7-ketocholesterol) (Škarydová and Wsól, 2012; Štambergová, 2013).

$11\beta$ -HSD1 je ve spojení s glukokortikoidy přisuzována role v rozvoji některých onemocnění. Například mutace v genu pro  $11\beta$ -HSD1 nebo pro H6PDH způsobuje tzv. kortison reduktasový deficit. Abnormality v regulaci metabolismu glukokortikoidů mají vliv na obezitu, metabolický syndrom, diabetes druhého typu a kardiovaskulární onemocnění (Miller and Auchus, 2011; Škarydová and Wsól, 2012; Štambergová, 2013).

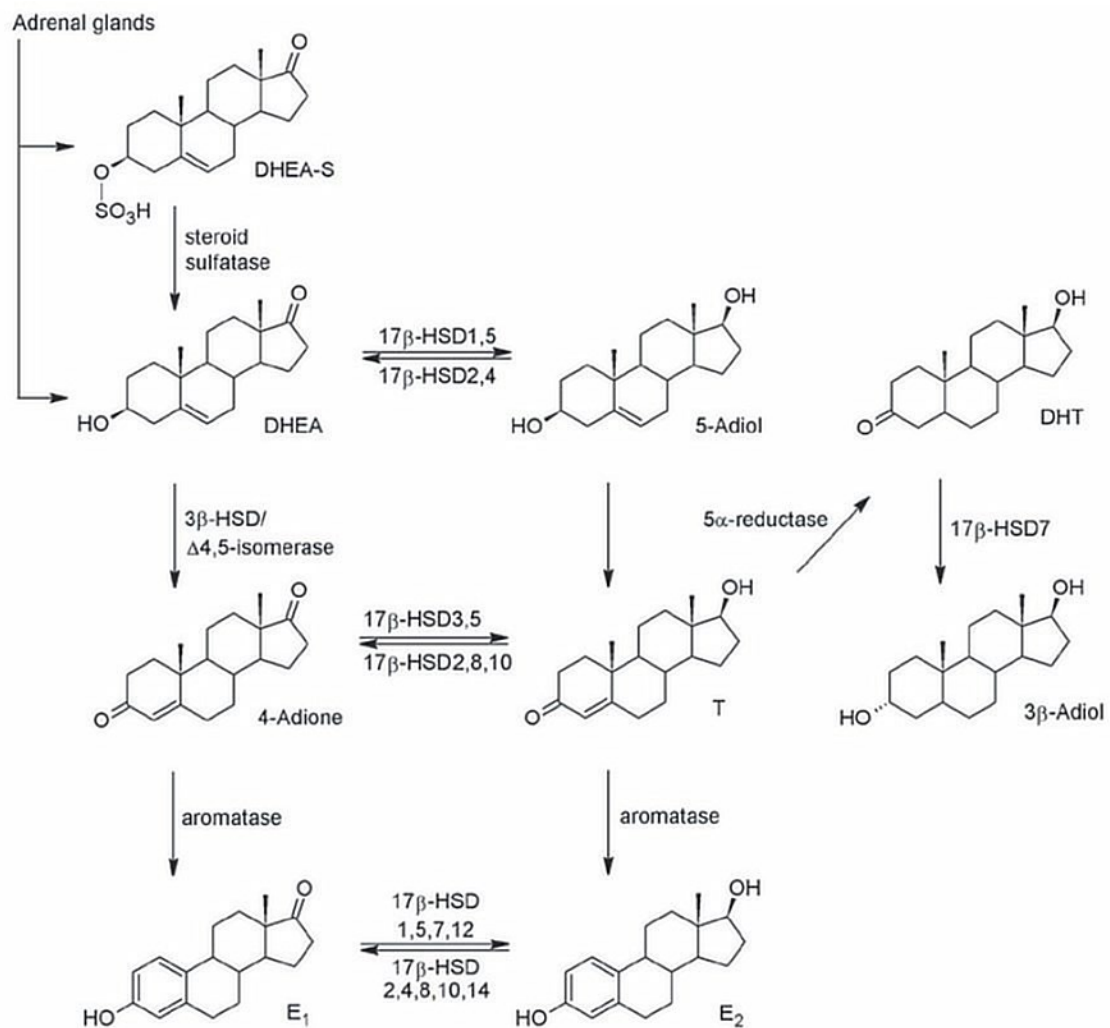
### 2.3.2 Lidské 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy

Pohlavní hormony, androgeny a estrogeny hrají významnou roli ve fyziologii i patologii. Jsou klíčové pro správný vývoj, růst a funkci všech reprodukčních tkání. Jejich syntéza probíhá primárně v pohlavních orgánech, krví jsou transportovány do cílových tkání (endokrinní produkce). Vznikají také v periferních tkáních, z prekurzorů, které mají svůj původ v nadledvinách – dehydroepiandrosteronu (DHEA) a dehydroepiandrosteron-sulfátu (DHEA-S) (Obrázek 7). Tímto mechanismem, tzv. intrakrinní produkcí, vzniká u mužů 30-50 % všech androgenů a u postmenopauzálních žen zajišťuje 100% přísun estrogenů (Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011; Škarydová and Wsól, 2012).

Hormony se váží na specifické intracelulární receptory, estrogenní a androgenní, které zprostředkují indukci nebo represi cílového genu (Škarydová and Wsól, 2012). Pro vazbu na receptor je zásadní hydroxylová skupina v pozici 17. Oboustranná konverze z neaktivní 17-ketoformy na aktivní formu hormonů katalyzují zástupci z rodiny 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenas (17 $\beta$ -HSD) (Obrázek 7). 17 $\beta$ -HSD se tak podílí na pre-receptorovém regulačním mechanismu biologické aktivity pohlavních hormonů (Wu *et al.*, 2007; Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011; Škarydová and Wsól, 2012).

17 $\beta$ -HSD jsou skupinou 14 různých savčích enzymů. 12 zástupců nalezneme u člověka. 17 $\beta$ -HSD6 a 9 byly popsány jen u hlodavců. Kromě 17 $\beta$ -HSD5, která patří do nadrodiny aldoketoreduktas (AKR), se všechny ostatní řadí k nadrodině SDR enzymů (Moeller and Adamski, 2009). Liší se v substrátové specifitě, preferenci kofaktorů, subcelulární lokalizaci i tkáňové distribuci. Můžeme je rozdělit na NAD<sup>+</sup>-dependentní enzymy katalyzující oxidační reakce (17 $\beta$ -HSD typ 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 a 14) a NADPH-dependentní katalyzující redukční reakce (17 $\beta$ -HSD typ 1, 3, 5, 7 a 12). 17 $\beta$ -HSD13 nemůžeme přiřadit k žádné skupině, protože její aktivita nebyla doposud popsána (Lukacik *et al.*, 2006; Škarydová and Wsól, 2012). Šest zástupců lidských 17 $\beta$ -HSD je vázaných k membráně ER (typy 2, 3, 7, 11, 12 a 13). Všechny mikrosomální enzymy se vyskytují ve steroidogenních tkáních. 17 $\beta$ -HSD katalyzující oxidační reakce mají širší tkáňovou distribuci, kde zřejmě plní ochrannou funkci a inaktivační reakcí brání buňky před nadměrným množstvím aktivních steroidů (Škarydová and Wsól, 2012). Některé 17 $\beta$ -HSD se zapojují i do metabolismu dalších sloučenin, například cholesterolu

a žlučových kyselin, ale i nesteroidních látek – mastných kyselin, prostaglandinů a retinoidů (Moeller and Adamski, 2009; Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011). 17 $\beta$ -HSD s redukční aktivitou by mohly hrát roli v biotransformaci xenobiotik. Výzkum se soustřeďuje především na jejich význam při rozvoji hormon-dependentních nádorů (Škarydová and Wsól, 2012).



Obrázek 7 - Zapojení 17 $\beta$ -HSD do intrakrinní produkce pohlavních hormonů (Škarydová and Wsól, 2012).

### 2.3.2.1 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy z klastru 3

17 $\beta$ -HSD3 přeměňuje NADPH-dependentní redukcí 4-androsten-3,17-dion na testosteron, 5 $\alpha$ -androstendion na 5 $\alpha$ -testosteron (Obrázek 7) a estron na estradiol. Primárně se vyskytuje ve varlatech, kde zajišťuje produkci testosteronu. Při rakovině prostaty bývá nadměrně exprimován. Inhibitory 17 $\beta$ -HSD3 by se tak mohly stát významnými terapeutiky v její léčbě (Lukacik *et al.*, 2006; Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011; Škarydová and Wsól, 2012).

17 $\beta$ -HSD4 se od ostatních HSD poněkud liší. Jedná se o peroxisomální enzym. Jeho struktura se dělí na tři domény. První, N-koncová doména, je dehydrogenasová, katalyzuje 17-dehydrogenaci estradiolu (Obrázek 7) a oxidaci hydroxyacylu koenzymu A vyšších mastných kyselin a žlučových kyselin na odpovídající ketoacyl. Druhá, hydratasová doména, přeměňuje *trans*-2-enoyl koenzym A na hydroxyacyl. A třetí doména, „sterol carrier protein 2“ (SCP2), se nejspíše podílí na vazbě lipidových substrátů, nicméně jeho funkce prozatím nebyla objasněna (Lukacik *et al.*, 2006).

17 $\beta$ -HSD11 je pravděpodobně transmembránový enzym lokalizovaný v ER. Jeho enzymová aktivita se uplatňuje spíše v metabolismu mastných kyselin než steroidních sloučenin (Lukacik *et al.*, 2006). Hojně se vyskytuje v epitelu tenkého střeva, kde by mohl působit jako ochrana organismu před toxickými látkami, které jsou přijímány potravou (Škarydová and Wsól, 2012).

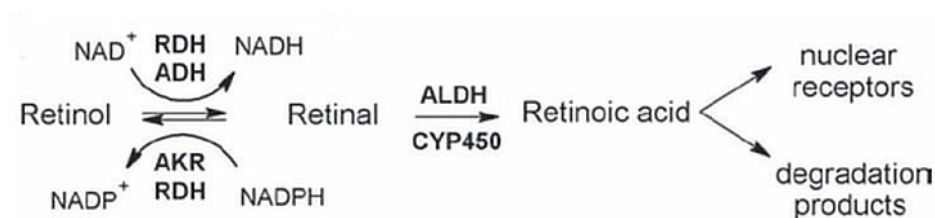
17 $\beta$ -HSD12 se sekvencí nejvíce podobá 17 $\beta$ -HSD3, ale svými vlastnostmi a tkáňovou distribucí se více blíží 17 $\beta$ -HSD7. Jedná se NADPH-dependentní enzym lokalizovaný v membráně ER. Poprvé byl identifikován jako 3-ketoacyl-CoA reduktasa (KAR). Podílí se na elongaci řetězce mastných kyselin. Později byla objevena i jeho aktivita vůči steroidům (Škarydová and Wsól, 2012).

17 $\beta$ -HSD13 je nejnovějším zástupcem této skupiny. Sdílí 78% sekvenční podobnost s 17 $\beta$ -HSD11. Prozatím není známo, zda má redukční, nebo oxidační aktivitu. Exprimována je pouze v játrech, proto se předpokládá, že by mohla být významně zapojena do biotransformace xenobiotik (Škarydová and Wsól, 2012).

### 2.3.1 Lidské retinoldehydrogenasy

Skupina retinoidů zahrnuje více než 4000 přírodních a syntetických derivátů vitamínu A. Některé z nich plní důležité fyziologické funkce. 11-*cis*-retinal je chromoforem zrakového pigmentu. Retinové kyseliny regulují procesy diferenciacce, morfogeneze, reprodukce a vývoje kostí. Interagují se specifickými receptory retinové kyseliny (retinoic acid receptor, RAR) a jako transkripční faktory se váží na regulační sekvence DNA (Škarydová and Wsól, 2012). Retinoidy jsou vysoce hydrofobní látky. V buňkách se vyskytují navázané na specifické proteiny. Tato vazba může mít vliv na jejich metabolismus (Škarydová and Wsól, 2012).

Biosyntéza retinových kyselin z retinolu probíhá ve dvou stupních (Obrázek 8). V prvním kroku je retinol oxidován na retinaldehyd. Tato vratná reakce je katalyzována různými formami cytosolických alkoholdehydrogenas z nadrodiny MDR a mnoha mikrosomálními RDH z SDR nadrodiny. Druhý oxidační krok za vzniku kyseliny retinové zprostředkovávají cytosolické aldehyddehydrogenasy (ALDH), byla popsána i účast CYP450 (1A1 a 1A2). Reakce je nevratná, a proto přísně regulována (Škarydová and Wsól, 2012).



**Obrázek 8 - Metabolismus retinoidů (Škarydová and Wsól, 2012).**

Většina zástupců retinoldehydrogenas (RDH) se řadí do klastru 2. Téměř všechny RDH jsou mikrosomální, lokalizované v membráně ER (kromě RDH13, která byla detekována v mitochondriích). Jedná se o NAD(P)(H)-dependentní enzymy, s redukční a/nebo oxidační aktivitou vůči různým retinoidům i dalším substrátům. U člověka bylo popsáno 11 zástupců (Škarydová and Wsól, 2012).

Nejvíce prostudována je role retinoidů v cyklu vidění. K regeneraci zrakového pigmentu v sítnici je zapotřebí právě RDH. Prvním zde identifikovaným enzymem byla RDH5, jinak nazývána 11-*cis*-retinoldehydrogenasa, která katalyzuje finální krok syntézy 11-*cis*-retinalu (Škarydová and Wsól, 2012; Kedishvili, 2013). RDH se pravděpodobně

podílí i na ochraně sítnice, bohaté na obsah nenasycených mastných kyselin, před produkty lipidové peroxidace. Ty jsou spojovány s rozvojem onemocnění jako je s věkem spojená makulopatie nebo diabetická retinopatie (Štambergová, 2013). Mutace genů pro RDH5 a RDH12 mohou způsobit poruchy zraku (Škarydová and Wsól, 2012; Kedishvili, 2013).

Některé RDH jsou exprimovány jen v oku (například prRDH). Většina z nich se však vyskytuje i v jiných tkáních, například v játrech, plicích nebo ledvinách, kde plní různé důležité fyziologické funkce (Škarydová and Wsól, 2012).

Z RDH se do klastru 3 řadí dva významné enzymy s aktivitou vůči retinoidům – DHRS3 a RDH10. Nedávno bylo prokázáno, že mezi nimi existuje přímá protein-protein interakce, která podmiňuje jejich enzymovou aktivitu. DHRS3 stimuluje retinoldehydrogenasovou aktivitu RDH10 a tím produkci all-*trans*-retinové kyseliny. A jedině v přítomnosti RDH10 se může projevit redukční aktivita DHRS3 vůči retinalu. Tyto dva enzymy mají tedy opačnou funkci a společně vytváří systém regulace hladin kyseliny retinové, který je zásadní především v průběhu embryonálního vývoje (Adams *et al.*, 2014; Belyaeva *et al.*, 2015).

RDH mohou být také spojovány s kancerogenezí. Změny v expresi některých RDH způsobí porušení homeostázy retinových kyselin, které mají vliv na diferenciaci a růst buněk (Škarydová and Wsól, 2012).

Vzhledem ke schopnosti RDH metabolizovat substráty s karbonylovou skupinou a k jejich roli v ochraně před oxidačním stresem se dá předpokládat, že by se RDH mohly podílet i na biotransformaci xenobiotik. Tato oblast skýtá prostor pro další výzkum (Škarydová and Wsól, 2012).

### 2.3.2 Lidské dehydrogenasy/reduktasy

Doposud bylo identifikováno 17 členů ze skupiny dehydrogenas/reduktas SDR rodiny (DHRS). Jednotliví zástupci se v mnohém liší, například buněčnou lokalizací nebo oxidoredukční aktivitou. Řadíme mezi ně i některé retinoldehydrogenasy (například DHRS3 je jen jiný název pro RDH17) a 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy (DHRS10 se nazývá také HSD17B14).

Mezi nejlépe popsané DHRS působící v redukčním směru patří DHRS4 a DHRS3, mezi enzymy aktivní v oxidačním směru pak DHRS8, 9 a 10. U ostatních jsou zatím informace o topologii nebo enzymové aktivitě neúplné nebo zcela chybí. Za nedostatečně charakterizované enzymy jsou považovány i DHRS7B a DHRS7C. Oba náleží do rodiny SDR32, typ „classical“. Společně s DHRS1, 3 a 7 se řadí do klastru 3.

#### 2.3.2.1 DHRS1

Lidská DHRS1 (podle nové nomenklatury SDR19C1) byla objevena při sekvenční analýze cDNA mozku lidského plodu (Wu *et al.*, 2001). Jedná se o NADPH-dependentní enzym, lokalizovaný v membráně ER, orientovaný do cytosolu. Byla detekována jeho aktivita vůči některým eobiotickým (estron, kortison, glukóza) i xenobiotickým (ketotifen) sloučeninám (Šperková, 2016). Z hlediska patofyziologie má DHRS1 zřejmě souvislost s rozvojem nádorů, které vznikají na podkladě mutace v genu pro isocitrátdehydrogenasu 1 (IDH1) (Shibata *et al.*, 2011).

#### 2.3.2.2 DHRS3

DHRS3, také známá jako „retinal short-chain dehydrogenase/reductase 1“ (retSDR1) nebo podle nové nomenklatury SDR16C1, je mikrosomální NADPH-dependentní reduktasa. Jedná se o integrální enzym, nacházející se v membráně ER, s C-koncem směřujícím do cytosolu. Poprvé byla DHRS3 detekována ve fotoreceptorech vnějšího segmentu sítnice a předpokládala se její funkce v cyklu vidění. Později byla nalezena i v jiných tkáních a další studie se zaměřily na roli DHRS3 v metabolismu retinoidů mimo oko (Lundová *et al.*, 2015). Její enzymová aktivita je spjata s koexpresí další RDH10, jak je blíže popsáno v kapitole 2.3.1.

### 2.3.2.3 DHRS7

DHRS7 (SDR34C1) byla prvně detekována v retině, kosterním svalstvu a srdci. Popsána byla jako retSDR4 a předpokládalo se, že je zapojena do metabolismu retinoidů (Haeseleer and Palczewski, 2000; Štambergová *et al.*, 2016). Další výzkum biochemických vlastností DHRS7 určil, že se jedná integrální membránový protein, orientovaný do lumen ER, s redukční aktivitou k některým sloučeninám nesoucím karbonylovou skupinu, jako jsou steroidní hormony a xenobiotika (Štambergová *et al.*, 2014). Navazující studie ukázala vysokou mezidruhovou sekvenční identitu, což napovídá, že by enzym mohl být součástí důležitých biochemických drah. Tkáňová distribuce DHRS7 je poměrně široká a koresponduje s *in vitro* prokázanou enzymatickou aktivitou. Byla detekována aktivita vůči androstendionu a all-*trans*-retinalu. DHRS7 je minimálně *in vitro* schopná redukovat kortison na aktivní formu kortisol. Hlavní enzym zodpovědný za tuto reakci je 11 $\beta$ -HSD1. Vzhledem k blízké příbuznosti těchto dvou enzymů a podobným biochemickým vlastnostem se uvažuje o jejich možné překryvné funkci. Protože se předpokládá role DHRS7 v metabolismu steroidů a retinoidů, intenzivně se studuje její možné zapojení do souvisejících patologických stavů. Byly zaznamenány změny v expresi DHRS7 ve spojitosti s diabetem mellitem typu 2 (Štambergová *et al.*, 2016). Snižující se exprese DHRS7 byla prokázána u karcinomu prostaty (Seibert *et al.*, 2015).

Nejnovější provedená studie některé výše zmíněné informace upřesňuje, ale s jinými se rozchází. Araya *et al.* (2017) prokázali, že kortison je substrátem DHRS7, nicméně není konvertován na kortisol, ale na 20 $\beta$ -dihydrokortison. Androstendion sice může vystupovat jako substrát, ale jen ve vysokých koncentracích. Proto tato aktivita DHRS7 není relevantní pro fyziologické koncentrace. Navíc zjistili, že DHRS7 katalyzuje přeměnu DHT na 3 $\alpha$ -androstendiol, čímž moduluje AR transkripční aktivitu. Na základě jejich experimentu se nepotvrdila původní domněnka Štambergová *et al.*, že aktivita DHRS7 (jakožto NADPH-dependentního enzymu, orientovaného do lumen ER) by mohla být podobně jako 11 $\beta$ -HSD1 svázána s H6PDH. Což je vedlo k pochybování o předem určené membránové topologii. Provedli vlastní měření a došli k opačnému závěru, že DHRS7 je orientována do cytosolu (Araya *et al.*, 2017).

Fylogeneticky nejbližšími příbuznými DHRS7 jsou DHRS7B a DHRS7C.



#### 2.3.2.4 DHRS7B

Gen pro lidskou DHRS7B (podle nové nomenklatury SDR32C1) se nachází na chromosomu 17p12 (Bray *et al.*, 2009). Více o lidské DHRS7B zatím není známo (Štambergová *et al.*, 2016). Myší DHRS7B byla lokalizována na membráně ER (Keller *et al.*, 2009). V jiné studii, kde vystupovala pod anglickým názvem „Peroxisomal Reductase Activating PPAR $\gamma$ “ (PexRAP), byla popsána její funkce v syntéze etherových lipidů jakožto ligandů pro PPAR $\gamma$ , které mají spojitost s adipogenezí (Lodhi *et al.*, 2012; Štambergová *et al.*, 2016).

#### 2.3.2.5 DHRS7C

Gen pro lidskou DHRS7C (podle nové nomenklatury SDR32C1) je lokalizován na chromosomu 17p13.1 (Bray *et al.*, 2009). Enzym DHRS7C byl zatím více popsán také jen u myší (Štambergová *et al.*, 2016).

Lu *et al.*, zabývající se výzkumem srdečního selhávání a hypertrofie myokardu, charakterizovali DHRS7C jako protein lokalizovaný v membráně ER, jehož exprese je v případech těchto patologií podstatně snížena. Navíc prokázali down-regulaci DHRS7C i u vzorků od pacientů s idiopatickou kardiomyopatií a příznaky NYHA III-IV (Lu, Tigchelaar, *et al.*, 2012; Lu, Yu, *et al.*, 2012).

DHRS7C nalezená v kosterním svalu králíka, nazývaná SRP-35, byla popsána jako integrální enzym, lokalizovaný v membráně sarkoplazmatického retikula, směřující do myoplazmy. Jeho zapojení do metabolismu retinoidů by mohlo mít vliv na signalizační dráhu kyseliny retinové a tím na vznik podnětů pro vypuštění Ca<sup>2+</sup>, které vede ke svalové kontrakci (Lodhi *et al.*, 2012; Treves *et al.*, 2012).

Nejnovější studie Arai *et al.* (2017) potvrdila expresi DHRS7C především v myokardu a v kosterním svalstvu myší. Prokázali, že DHRS7C hraje roli v udržování homeostázy Ca<sup>2+</sup> již diferencovaných myotubů. Při poruše funkce nebo depleci DHRS7C dochází k vzrůstu intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup>, což aktivuje procesy vedoucí k hypertrofii (Arai *et al.*, 2017).

### 3 CÍL PRÁCE

Diplomová práce byla zaměřena na studium základních biochemických vlastností lidských enzymů DHRS7B a DHRS7C z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Za použití mikrosomálních frakcí *Sf9* s exprimovanými rekombinantními formami enzymů DHRS7B a DHRS7C bylo cílem určit jejich membránovou topologii a provést screening katalytické aktivity vůči vybraným sloučeninám s karbonylovou skupinou.

Cíl práce můžeme rozdělit na:

1. Stanovení membránové topologie lidské DHRS7B a DHRS7C.
  - Metoda alkalické extrakce a extrakce detergentem.
  - Metoda inkubace s proteinasou K ve vodném prostředí a v prostředí s detergentem.
2. Screening katalytické aktivity mikrosomálních frakcí *Sf9* obsahující lidskou rekombinantní DHRS7B a DHRS7C vůči vybraným ligandům s karbonylovou skupinou z řad eobiotik i xenobiotik.
  - Metoda spektrofotometrického screeningu při vlnové délce 340 nm.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály a pomůcky

#### 4.1.1 Přístrojové vybavení

Centrifuga Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi (Thermo Electron Corporation, USA)

Gel Doc™ XR Documentation System (Bio-Rad, USA)

Minicentrifuga Eppendorf MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)

Mini-PROTEAN® System (Bio-Rad, USA)

Spektrofotometr Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)

ThermomixComfort (Eppendorf, Německo)

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, USA)

#### 4.1.2 Chemikálie

2-merkptoethanol (ME) (Sigma-Aldrich, Německo)

Aceton (Penta, Česká Republika)

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent  
(GE Healthcare Life Sciences, USA)

Isopropylalkohol (IPA) (Sigma-Aldrich, Německo)

Fomadon LQN (Foma, Česká Republika)

Fomafix (Foma, Česká Republika)

Isobutanol, nasycený vodou (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina octová, 10% (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trichloroctová (TCA), 72% (Sigma-Aldrich, Německo)

TEMED (Sigma-Aldrich, Německo)

## 4.1.3 Roztoky

**Alkalický roztok:** 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25mM CH<sub>3</sub>COOK

**Barvicí roztok 0,1% Ponceau S** (0,1 g Ponceau S, 100 ml ultračisté vody)

**Roztok akrylamidu:** 30% akrylamid (AA) + 0,8% bis-akrylamid (bis-AA)

**Roztok APS, 10%**

**Roztok s detergentem:**

1% Triton X-100 v 0,1M sodno-fosfátovém pufru pH 7,4

10% Triton X-100 v 0,1M sodno-fosfátovém pufru pH 7,4

**Roztok na ředění PK:** 20mM Tris pH 7,4, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 50% glycerol

**Roztok PMSF:** 50mM PMSF v IPA

**Roztok SDS, 10%**

**Roztok Tris-HCl:** 1,5M, pH 8,8

0,5M, pH 6,8

## 4.1.4 Enzymy

Mikrosomální frakce *Sf9* obsahující rekombinantní lidskou DHRS7B (KBV FaF UK)

Mikrosomální frakce *Sf9* obsahující rekombinantní lidskou DHRS7C (KBV FaF UK)

Proteinasa K (Proteinase K, New England Biolabs, #P8102S, 20 mg/ml, 60 mg)

## 4.1.5 Protilátky

F7425 Králičí polyklonální protilátka proti FLAG-tagu (Sigma-Aldrich, Německo)

P0217 Prasečí polyklonální protilátka proti králičím protilátkám (Dako, Dánsko)

Ab98880 Specifická králičí polyklonální protilátka proti DHRS7B  
(Abcam, Velká Británie)

Ab116345 Specifická králičí polyklonální protilátka proti DHRS7C  
(Abcam, Velká Británie)

#### 4.1.6 Pufry

##### **0,1M sodno-fosfátový pufr pH 7,4**

100mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

100mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

##### **Blokovací pufr (3%)**

3 g Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, USA), 100 ml TBT-T pufru

##### **Blokovací pufr (5%)**

5 g Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, USA), 100 ml TBT-T pufru

##### **Blotovací pufr**

1,51 g 25mM Tris, 7,21 g 192mM glycin, 100 ml 20% methanol

doplnit ultračistou vodou do 500 ml

##### **Elektrodový pufr (1× koncentrovaný)**

200 ml 5× koncentrovaného zásobního elektrodového pufru pH 8,3  
(15,1 g Tris, 72,0 g glycin, 5,0 g SDS, 1000 ml ddH<sub>2</sub>O)

800 ml ultračisté vody

##### **TBS-T (1× koncentrovaný)**

100 ml 10× koncentrovaného zásobního TBS pufru, pH 7,6  
(24 g Tris, 88 g NaCl, 1000 ml ddH<sub>2</sub>O)

900 ml ultračisté vody

1 ml TWEEN 20

##### **Zásobní vzorkový pufr (5× koncentrovaný)**

6,25 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 3,75 ml glycerolu

1 g SDS, 2,5 mg bromfenolové modři

#### 4.1.7 Molekulové markery

Precision Plus Protein™ All Blue Standards, marker pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Stanovení membránové topologie DHRS7B a DHRS7C

Ke stanovení membránové topologie enzymů byly využity metody alkalické extrakce, solubilizace detergentem (4.2.1.1) a inkubace s proteinasou K (4.2.1.2).

Další analýza vzorků proběhla metodami SDS-PAGE elektroforézy (4.2.1.3), Western Blot (4.2.1.4) a imunodetekcí (4.2.1.5).

#### 4.2.1.1 Alkalická extrakce a extrakce detergentem

##### Popis metody

Metoda alkalické extrakce a extrakce detergentem umožňuje rozlišit integrální a periferní membránové proteiny. Periferní proteiny jsou k membráně vázány pouze slabými vazebnými interakcemi. K narušení této vazby postačí změna pH. Integrální proteiny jsou do membrány pevně zabudovány. Je tedy nutné použít detergenty, které naruší strukturu membrány, aby mohlo dojít k uvolnění proteinu (Štambergová, 2013).

##### Provedení extrakce

V případě alkalické extrakce bylo k 20  $\mu\text{g}$  *Sf9* mikrosomů s overexprimovanou DHRS7B nebo DHRS7C přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 25mM  $\text{CH}_3\text{COOK}$ . Pro solubilizaci detergentem bylo k 20  $\mu\text{g}$  mikrosomů přidáno 100  $\mu\text{l}$  1% Tritonu X-100. V obou případech následovala inkubace na ledu po dobu 30 minut. Dalším krokem byla centrifugace, 60 minut při 4°C, 38 000 rpm (což odpovídá 149 700 $\times$  g pro rotor TST 60.4).

Supernatanty byly precipitovány přidáním 72% TCA v poměru 1:1 (100  $\mu\text{l}$ ) a inkubací 30 minut na ledě. Následně proběhla centrifugace roztoků, 12 000 $\times$  g, 10 minut při laboratorní teplotě. Pelety byly dvakrát omyty ledovým acetonem, aby se odstranily zbytky detergentu a TCA. Zbytky acetonu byly odpařeny.

Následovalo rozpuštění vzniklých pelet v 0,1M sodno-fosfátovém pufru pH 7,4 a vzorkovém pufru pro SDS v poměru 4:1 (1 díl vzorkového pufru s ME na 4 díly vzorku).

Vzorky byly připraveny k analýze metodou SDS-PAGE elektroforézy (4.2.1.3), Western Blotu (4.2.1.4) a imunodetekcí (4.2.1.5).

## 4.2.1.2 Inkubace s proteinasou K

Popis metody

Inkubací s proteinasou K ve vodném prostředí a v prostředí detergentu lze rozlišit, zda je enzym orientován do cytosolu nebo do lumen ER. Orientace na membráně představuje důležitou charakteristiku, protože je úzce spjata s enzymovou aktivitou, a tudíž má vliv na dostupnost substrátů i kofaktorů. Proteinasa K patří mezi serinové proteasy, která dokáže štěpit peptidové vazby na karboxylovém konci alifatických, aromatických a hydrofobních kyselin. Pokud je analyzovaný enzym orientován do lumen ER, ve vodném prostředí ho integrita membrány ochrání před proteolytickým působením proteinasy K. Degradace enzymu je umožněna až po solubilizaci, narušením celistvosti membrány detergentem (Štambergová, 2013). Pokud je protein orientován do cytosolu, bude kompletně degradován již ve vodném prostředí.

Provedení inkubace

Příprava vzorků proběhla podle rozpisu (Tabulka 1). Ke kontrolním vzorkům byla přidána pouze voda. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C. Reakci ukončilo přidání 1,32  $\mu$ l roztoku 50mM PMSF (výsledná koncentrace 5mM).

Vzorky byly přímo smíchány se vzorkovým puforem pro SDS a připraveny k analýze metodou SDS-PAGE elektroforézy (4.2.1.3), Western Blotu (4.2.1.4) a imunodetekcí (4.2.1.5).

**Tabulka 1 - Složení jednotlivých vzorků pro inkubaci s proteinasou K.**

	mikrosomy	proteinasa K 0,5 mg/ml	Triton X-100 finální koncentrace 1 %	voda
<b>Vz.1 vodné prostředí</b>	10 $\mu$ l 1 mg/ml	2 $\mu$ l	-	1,2 $\mu$ l
<b>Vz.2 prostředí detergentu</b>	10 $\mu$ l 1 mg/ml	2 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l, 10%	-
<b>Vz.3 kontrola</b>	10 $\mu$ l 1 mg/ml	-	-	3,2 $\mu$ l

## 4.2.1.3 SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Popis metody

SDS-PAGE gelová elektroforéza je separační metoda, při které dochází k dělení denaturovaných, zlinearizovaných proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti (Rumlova *et al.*, 2003). Jedná se o jednorozměrnou gelovou elektroforézu ve vertikálním uspořádání, pomocí které lze získat informace o čistotě proteinu a velikosti jeho podjednotek (Průša, 1997; Rumlova *et al.*, 2003).

Provedení elektroforézy

K analýze byl použit 0,75mm gel (složení zaostřovacího i separačního gelu viz Tabulka 2). K 5× koncentrovanému zásobnímu roztoku vzorkového pufru (složení viz 4.1.6) se přidalo 25 µl ME na 200 µl vzorkového pufru. Připravené roztoky byly zdenaturovány 4 minuty při 96°C.

Elektroforetická cela se naplnila 1× zředěným zásobním roztokem elektrodového pufru (složení viz 4.1.6). Považené vzorky a 3 µl molekulového markeru byly nanášeny do jamek gelu. Elektroforéza probíhala 20 minut při 100 V v zaostřovacím gelu a 75 minut při 150 V v separačním gelu (provedení viz Obrázek 9).

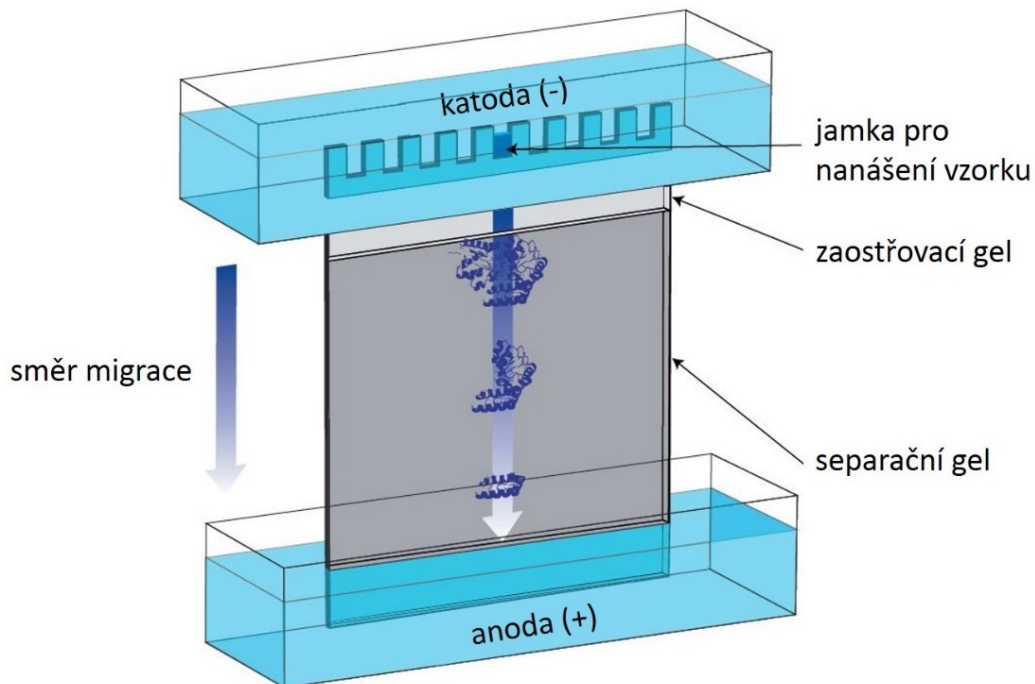
**Tabulka 2 – Složení gelu pro SDS-PAGE elektroforézu (AKR | SDR Research Group, 2014).**

1 gel, 0,75 mm	Separací gel (12,7%)	Zaostřovací gel (4%)
ddH <sub>2</sub> O	1,6 ml	953 µl
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml	-
0,5M Tris-HCl pH 6,8	-	391 µl
10% SDS	50 µl	16 µl
30% roztok akrylamidu	2,1 ml	203 µl

Zahájení polymerace:

10% APS	50 µl	32 µl
TEMED	2,5 µl	1,6 µl





**Obrázek 9 - Provedení elektroforézy (GE Healthcare Life Sciences, 2014).**

#### 4.2.1.4 Western Blot (WB)

##### Popis metody

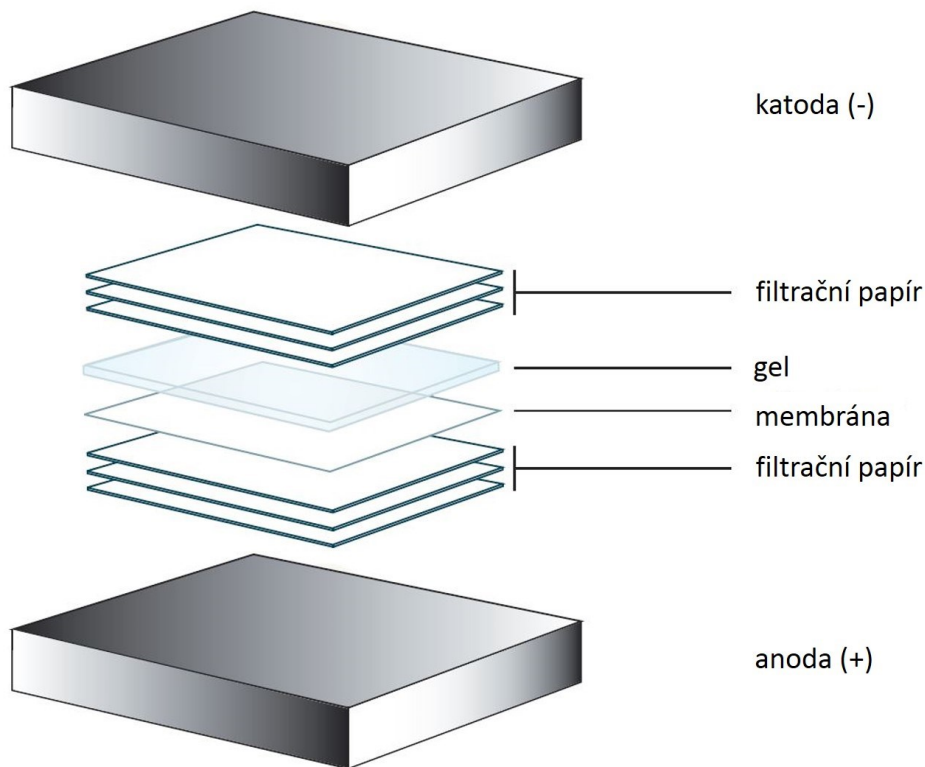
Metoda Western Blotu se používá k přenesení analyzovaných proteinů z gelu po elektroforéze na membránu. Využívá k tomu elektrické pole. Blotovací aparát (viz Provedení Western Blotu) je uzavřen v kazetě, která je připojena ke konstantnímu napětí. Negativně nabitě proteiny migrují z gelu ke kladně nabitě elektrodě. Membrána je zastaví a zachytí. Všechna nespecifická místa na membráně jsou poté zablokována použitím roztoku obsahující protein (BSA nebo odtučněné mléko). Po přidání protilátky se molekuly imunoglobulinů nemohou nespecificky navázat na membránu a dochází pouze ke specifické reakci s přeblovaným antigenem. Aplikace sekundární protilátky pak umožní vizualizaci analyzovaných proteinů (Rumlova *et al.*, 2003).

##### Provedení Western Blotu

Separální část gelu s oddělenými fragmenty proteinu, 0,45 mm nitrocelulósová membrána a dva kusy filtračních papírů se 15 minut ekvilibrovaly v blotovacím pufru (složení viz 4.1.6). Blotovací aparát byl sestaven dle schématu (Obrázek 10).

Blotování probíhalo 20 minut při konstantním napětí 25 V (Trans-Blot® Turbo™, BioRad). Ke kontrole přenosu proteinů na membránu se využil barvicí roztok

0,1% Ponceau S, který nespecificky interaguje se všemi proteiny. Poté byla membrána odbarvena 10% kyselinou octovou a omyta TBS-T pufrem (složení viz 4.1.6). Následovalo blokování membrány 5% roztokem netučného mléka (složení viz 4.1.6) na orbitální třepače 80 rpm po dobu 60 minut.



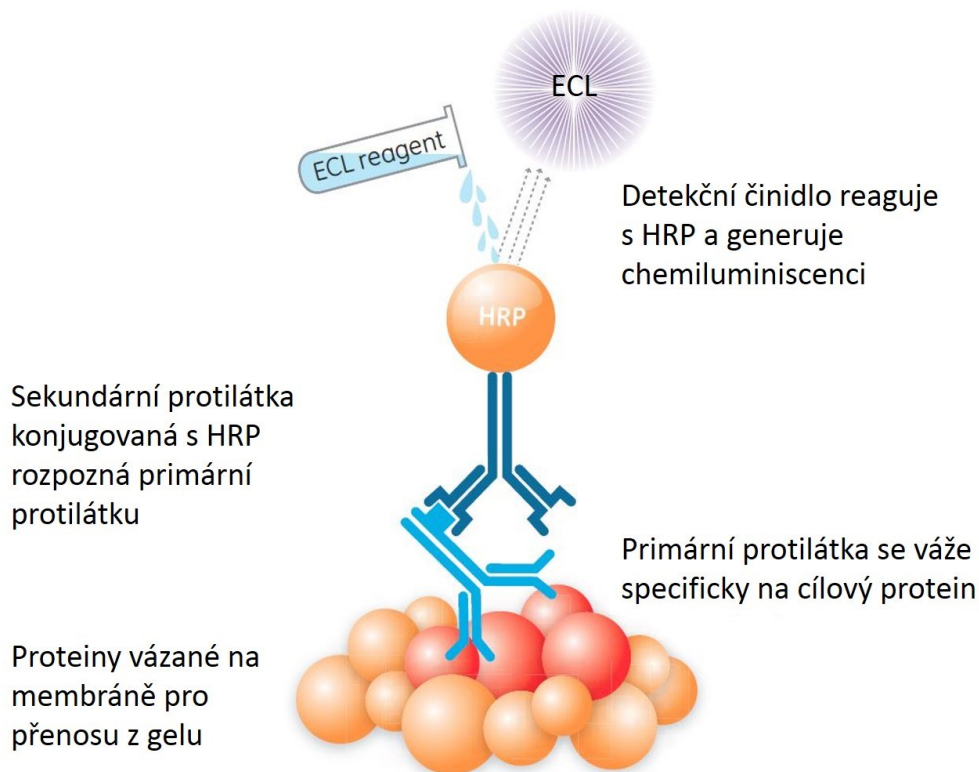
**Obrázek 10 - Schéma blotovacího aparátu (GE Healthcare Life Sciences, 2014).**

#### 4.2.1.5 Imunodetekce

Pro imunodetekci byla použita primární polyklonální králičí protilátka proti FLAG-tagu v 3% blokovacím mléce (složení viz 4.1.6) o koncentraci 1:50 000, nebo specifické králičí protilátky proti DHRS7B a DHRS7C (Abcam) v 3% blokovacím mléce o koncentraci 1:1 000. Inkubace probíhala přes noc (cca 16 hodin) na orbitální třepače 80 rpm při teplotě 8°C. Poté byla membrána 3× krátce opláchnuta a 3× 10 minut omyta TBS-T pufrem. Následovala aplikace sekundární protilátky. V obou případech, při aplikaci nespecifické i specifické králičí primární protilátky, byla aplikována sekundární persečí polyklonální protilátka proti králičí o koncentraci 1:20 000 v 3% blokovacím mléce. Inkubace probíhala 90 minut při laboratorní teplotě. Membrána byla opět 3× krátce opláchnuta a 3× 10 minut omyta TBS-T pufrem.

## 4.2.1.6 Vizualizace

K vizualizaci byl použit detekční systém Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (0,05 ml/cm<sup>2</sup>). Činidlo obsahuje lumiol, který je oxidován v přítomnosti křenové peroxidázy (horseradish peroxidase – HRP) konjugované se sekundárními protilátkami. Při této reakci vzniká chemiluminiscence (enhanced chemiluminiscence – ECL) (Obrázek 11). Ta se zaznamenávala na fotografický film. Čas expozice byl 10-30 minut.



**Obrázek 11 - Imunodetekce a vizualizace (GE Healthcare Life Sciences, 2014).**

#### 4.2.2 Screening enzymové aktivity DHRS7B a DHRS7C

Enzymová aktivita DHRS7B a DHRS7C se testovala pomocí spektrofotometrického stanovení založeného na měření nárůstu nebo poklesu absorbance NAD(P)H v reakční směsi. Při reakci dochází k přeměně NAD(P)H na NAD(P), který při 340 nm neabsorbuje.

Ke screeningu byly vybrány eobiotické (Tabulka 3 a 5) i xenobiotické (Tabulka 4 a 6) sloučeniny s karbonylovou funkční skupinou. Jako rozpouštědlo posloužila destilovaná voda, ethanol (finální koncentrace nebyla více než 2 %), methanol nebo DMSO, v závislosti na rozpustnosti jednotlivých sloučenin. Celkový objem reakční směsi činil 100  $\mu$ l. Koncentrace ligandu byla 50  $\mu$ M v případě eobiotik a 100  $\mu$ M u xenobiotik, koncentrace kofaktoru NAD(P)(H) 200  $\mu$ M. Po 5minutové preinkubaci (při 37 °C) směsi kofaktoru s mikrosomální frakcí *Sf9* s overexprimovanou DHRS7B nebo DHRS7C (15  $\mu$ g proteinu v reakci) se odstartovala reakce přidáním této směsi (90  $\mu$ l) k roztokům ligandů (10  $\mu$ l) v destičce. Ke kontrole byla použita netransfekovaná mikrosomální frakce *Sf9*.

Byla provedena 2-3 nezávislá měření v tripletech.

**Tabulka 3 – Eobiotika použitá pro screening redukční aktivity.**

<b>dodavatel</b>	<b>ligand</b>	<b>rozpouštědlo</b>
BDH Laboratories	<b>3-glyceraldehyd</b>	EtOH
Sigma (Fluka)	<b>4-androsten-3,17-dion</b>	EtOH
Sigma	<b>Dihydrotestosteron</b>	MeOH
Sigma	<b>Estron</b>	EtOH
Penta	<b>Glukóza</b>	EtOH
Sigma	<b>Kortison</b>	EtOH
Santa Cruz	<b>PGE1</b>	EtOH
Santa Cruz	<b>PGE2</b>	EtOH
Sigma	<b>Prednison*</b>	EtOH
Sigma	<b>Progesteron</b>	EtOH

\*V případě prednisonu se sice jedná o xenobiotikum, ale protože je blízkým derivátem eobiotika, je vhodné s ním pracovat v podobných koncentracích.

Tabulka 4 – Xenobiotika použitá pro screening redukční aktivity.

<b>dodavatel</b>	<b>ligand</b>	<b>rozpuštědlo</b>
Sigma	<b>1,2-naftochinon</b>	EtOH
Alfa Aesar	<b>4,4-dimethylbenzil</b>	EtOH
Alfa Aesar	<b>4-benzolpyridin</b>	EtOH
Sigma	<b>4-nitroacetofenon</b>	EtOH
Sigma	<b>4-nitrobenzaldehyd</b>	DMSO
Sigma	<b>9,10-fenanthrenchinon</b>	EtOH
Sigma (Fluka)	<b>Acetohexamid</b>	EtOH
Sigma	<b>Benzil (Difenylethandion)</b>	EtOH
Sigma	<b>Dihydroxyaceton fosfát lithný</b>	EtOH
Sigma	<b>Hexan-3,4-dion</b>	ddH <sub>2</sub> O
Sigma (Fluka)	<b>Isatin</b>	EtOH
TRC	<b>Ketoprofen</b>	EtOH
Sigma	<b>Ketotifen</b>	EtOH
Sigma	<b>Kys. fenofibrová</b>	EtOH
Sigma	<b>Kys. flufenamová</b>	EtOH
Sigma	<b>Menadion</b>	DMSO
Sigma	<b>Metyrapon</b>	EtOH
TRC	<b>NNK</b>	ddH <sub>2</sub> O
TRC	<b>Oxkarbazepin</b>	ddH <sub>2</sub> O
Sigma	<b>p-benzochinon</b>	ddH <sub>2</sub> O

Tabulka 5 – Eobiotika použitá pro screening oxidační aktivity.

<b>dodavatel</b>	<b>ligand</b>	<b>rozpuštědlo</b>
Sigma	<b>Estradiol</b>	EtOH
Sigma	<b>Hydrokortison</b>	EtOH
Sigma	<b>Testosteron</b>	EtOH

Tabulka 6 – Xenobiotika použitá pro screening oxidační aktivity.

<b>dodavatel</b>	<b>ligand</b>	<b>rozpuštědlo</b>
Sigma	<b>4,4-dimethylbenzoin</b>	EtOH
Sigma	<b>4-nitrobenzylalkohol</b>	EtOH
Sigma	<b>Benzoin</b>	EtOH
Sigma	<b>Prednisolon</b>	EtOH

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení membránové topologie DHR57B a DHR57C

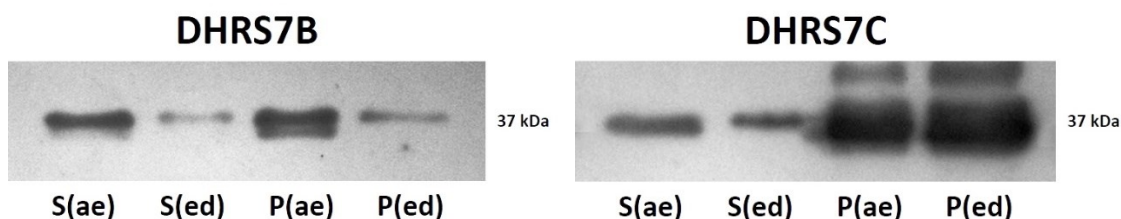
Při předchozích experimentech na KBV FaF UK byla prokázána exprese lidských rekombinantních forem DHR57B a DHR57C v mikrosomální frakci *Sf9*, proto byla membránová topologie studována právě na tomto modelu.

#### 5.1.1 Alkalická extrakce a extrakce detergentem

Jako první metoda studia interakce daných enzymů s membránou byla použita metoda alkalické extrakce a extrakce detergentem. Extrakce byly u obou enzymů provedeny současně a za shodných podmínek.

Při inkubaci mikrosomální frakce DHR57B v alkalickém prostředí a v prostředí detergentu se v obou případech část proteinu uvolnila do supernatantu a část zůstala v peletě (Obrázek 12). Samotná změna pH a iontové síly na její kompletní uvolnění nestačí, jako tomu je u periferních proteinů, které jsou vázané jen slabými nekovalentními vazbami. V případě DHR57B se tedy jedná o enzym interagující s membránou.

U mikrosomální frakce DHR57C přešel protein také do supernatantu, ale v peletě zůstala jeho větší část (Obrázek 12). Interakce s membránou je silnější než u DHR57B, pravděpodobně se jedná o transmembránový protein.



**Obrázek 12 - Alkalická extrakce a extrakce detergentem mikrosomální frakce s DHR57B a DHR57C.**

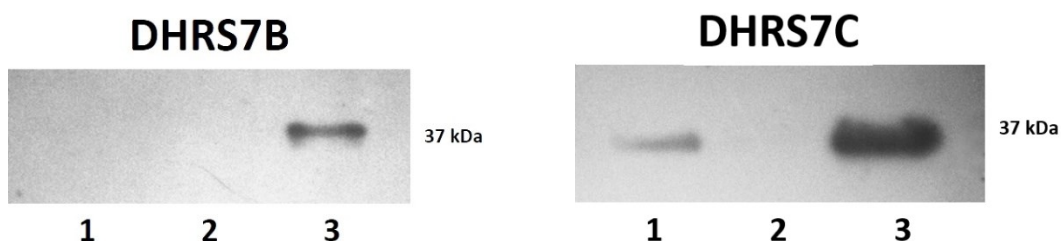
Byla použita primární králičí protilátka proti FLAG-tagu (1:50 000) a sekundární prasečí protilátka proti králičí (1:20 000). Molekulový marker Precision Plus Protein (10-250 kDa). S(ae) – alkalická extrakce – supernatant, S(ed) – extrakce detergentem – supernatant, P(ae) – alkalická extrakce – peleta, P(ed) – extrakce detergentem – peleta.

### 5.1.2 Inkubace s proteinasou K

Druhou metodou využitou pro stanovení membránové topologie DHRS7B a DHRS7C s membránou byla inkubace s proteinasou K. Metoda byla provedena současně u obou enzymů za stejných podmínek.

Při inkubaci mikrosomů s overexprimovanou DHRS7B došlo ke kompletní degradaci proteinu již ve vodném prostředí (Obrázek 13), což značí, že enzym je orientován do cytosolu.

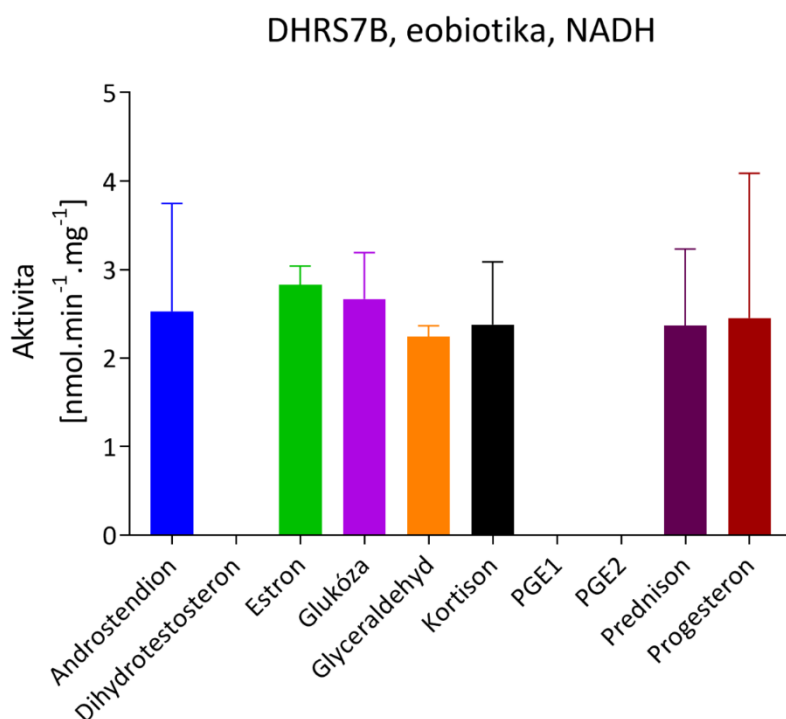
V případě inkubace mikrosomální frakce DHRS7C s proteinasou K ve vodném prostředí zůstal oproti kontrole jen slabý proužek (Obrázek 13) – enzym bude pravděpodobně orientován také do cytosolu.



**Obrázek 13 – Inkubace mikrosomálních frakcí DHRS7B a DHRS7C s proteinasou K**  
Byla použita primární králičí protilátka proti FLAG-tagu (1:50 000) a sekundární prasečí protilátka proti králičí (1:20 000). Molekulový marker Precision Plus Protein (10-250 kDa). 1 – proteinasa K ve vodném prostředí, 2 – proteinasa K v prostředí detergentu, 3 – kontrola bez proteiny K.

## 5.2 Screening enzymové aktivity DHR57B a DHR57C

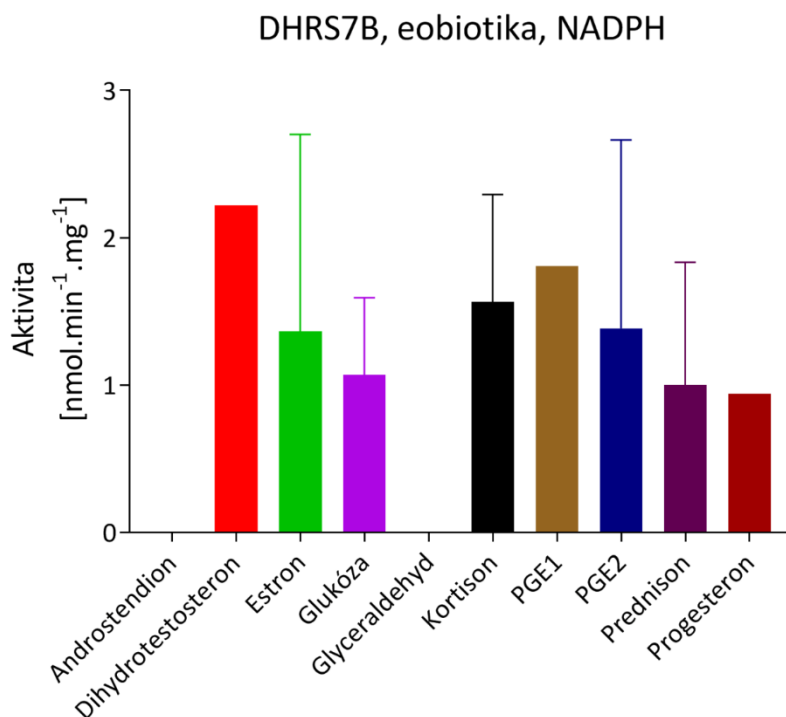
Screening redukční i oxidační aktivity mikrosomálních frakcí DHR57B a DHR57C byl proveden spektrofotometricky za shodných podmínek. Měření aktivity vůči všem testovaným látkám bylo provedeno v tripletech. Po odečtení hodnot kontrolního vzorku byla vypočtena aktivita za využití molárního extrakčního koeficientu pro NAD(P)(H)  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , vyjádřena jako specifická aktivita v nmol přeměněného kofaktoru na mg proteinu za minutu ( $[\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$ ) a vynesena do sloupcových grafů (Obrázek 14-29). Z grafů je patrné, že oba enzymy v *in vitro* podmínkách byly více aktivní v redukčním směru. Obecně byla naměřena vyšší aktivita v přítomnosti NADH.



**Obrázek 14 - Screening redukční enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADH.**

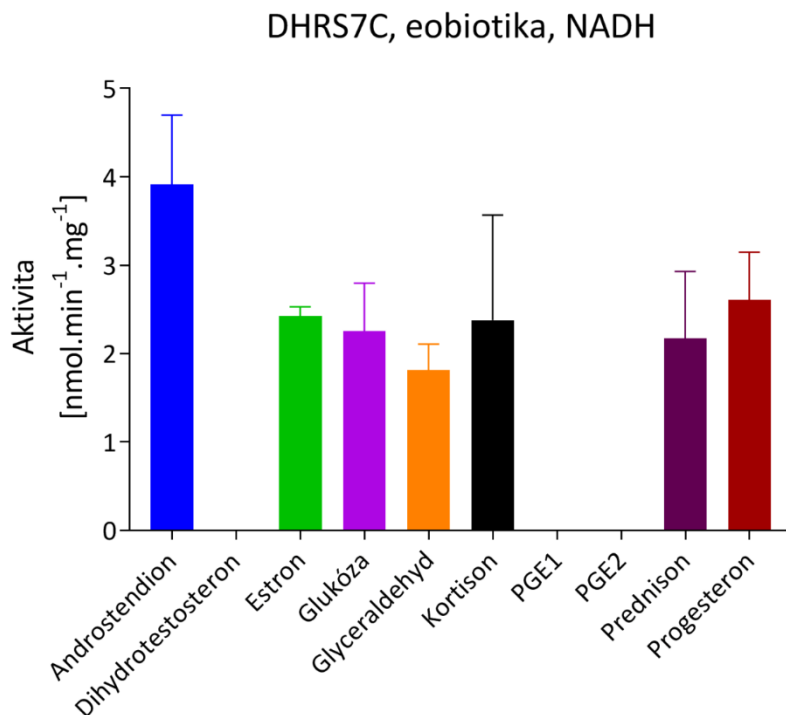
V případě DHR57B v přítomnosti NADH byla detekována přibližně stejná aktivita vůči eobiotikům – estronu, glukóze, androstendionu, progesteronu, kortisonu, prednisonu (xenobiotikum) a glyceraldehydu (Obrázek 14).





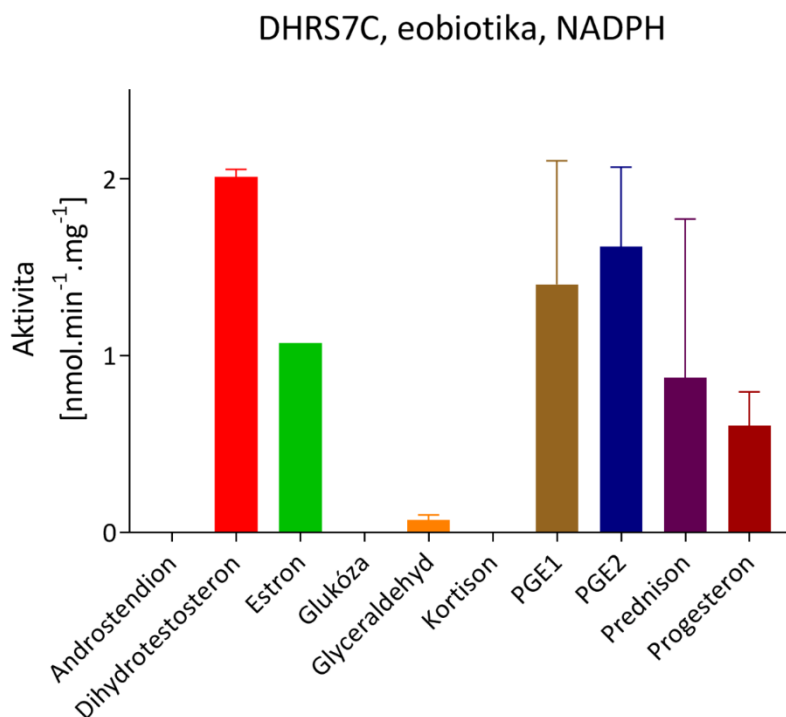
**Obrázek 15 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADPH.**

V přítomnosti NADPH byla detekována aktivita DHRS7B vůči většině testovaných steroidních sloučenin. Jediný z testovaných steroidů, který nebyl redukován, je androstendion. DHRS7B vykazovala v prostředí s NADPH aktivitu také vůči prostaglandinům – PGE1 a PGE2. Z dalších eobiotických sloučenin DHRS7B redukovala glukózu, ale glyceraldehyd jejím substrátem nebyl (Obrázek 15).



**Obrázek 16 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADH.**

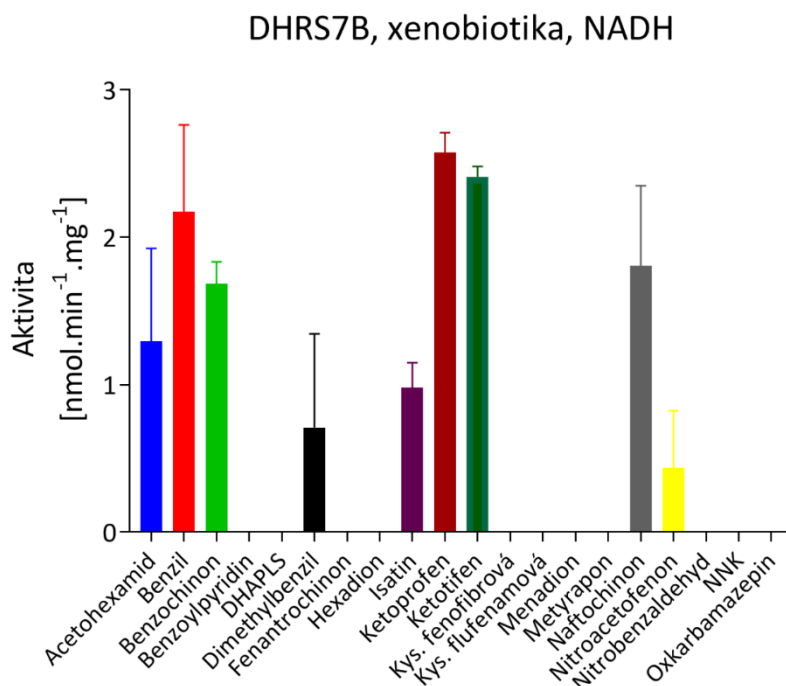
U DHRS7C se aktivita vůči eobiotikům vyvíjela podobně. V prostředí s NADH byla detekována vůči androstendionu, progesteronu, estronu, kortisonu, glukóze, prednisonu (xenobiotikum) a glyceraldehydu (Obrázek 16).



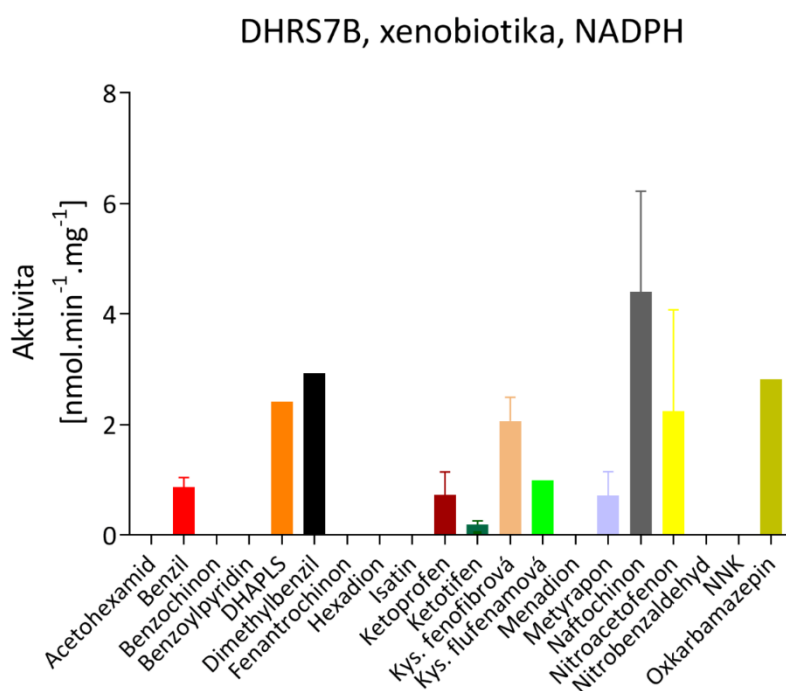
**Obrázek 17 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADPH.**

Stejně jako v případě DHRS7B zmizela v přítomnosti NADPH aktivita DHRS7C vůči androstendionu a přibyla vůči DHT, PGE2 a PGE1. Na rozdíl od DHRS7B nebyla detekována aktivita DHRS7C vůči glukóze a kortisonu. Vůči glyceraldehydu zůstala naopak zachována, i když jen velmi nepatrně (Obrázek 17).

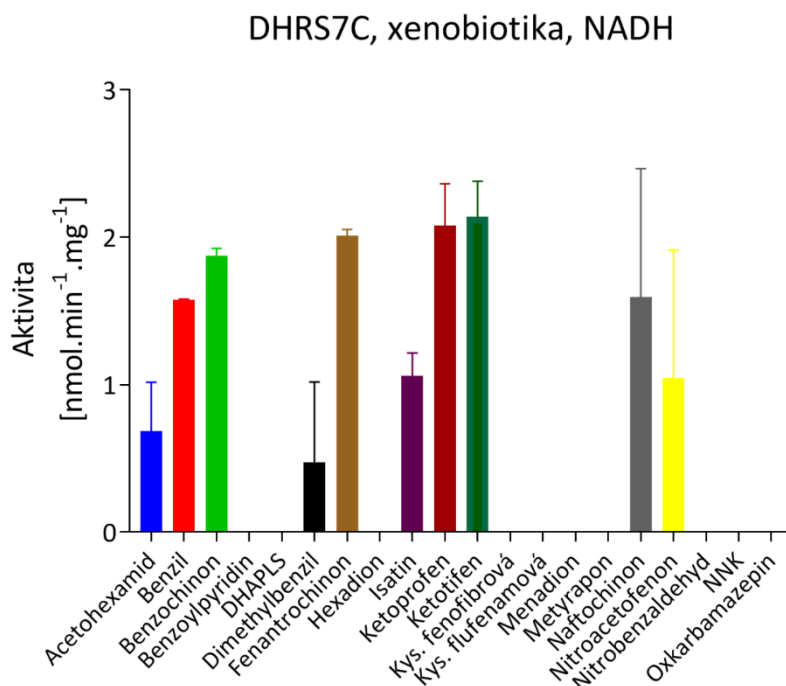
Z xenobiotik metabolizovaných DHRS7B i DHRS7C s pomocí NADH lze jmenovat ketoprofen, ketotifen, benzil a benzochinon (Obrázek 18 a 20). Ani jeden enzym nebyl vůči těmto substrátům aktivní v přítomnosti NADPH (DHRS7B vůči ketoprofenu a ketotifenu ano, ale pouze zanedbatelně (Obrázek 19)). Za účasti NADPH byla vyšší aktivita vůči xenobiotikům zaznamenána u DHRS7C – například 4-nitrobenzaldehyd a 4-nitroacetofenon (Obrázek 21).



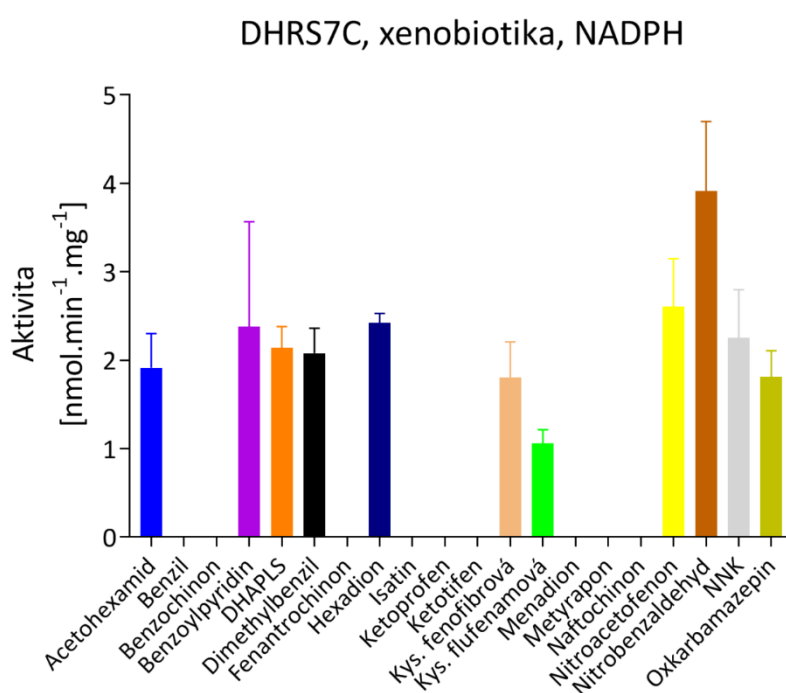
**Obrázek 18 - Screening redukční enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADH.**



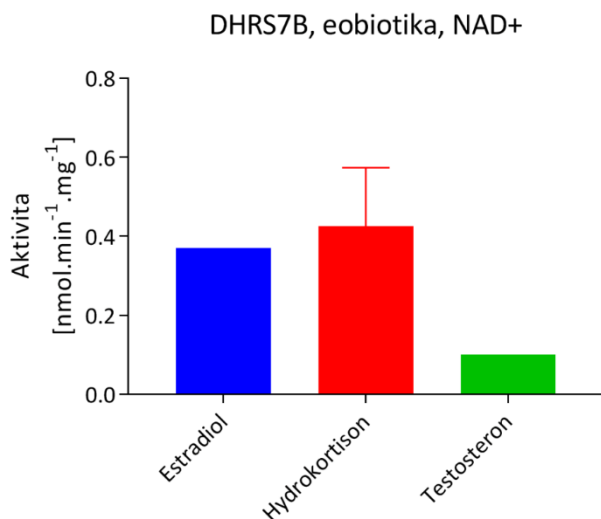
**Obrázek 19 - Screening redukční enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADPH.**



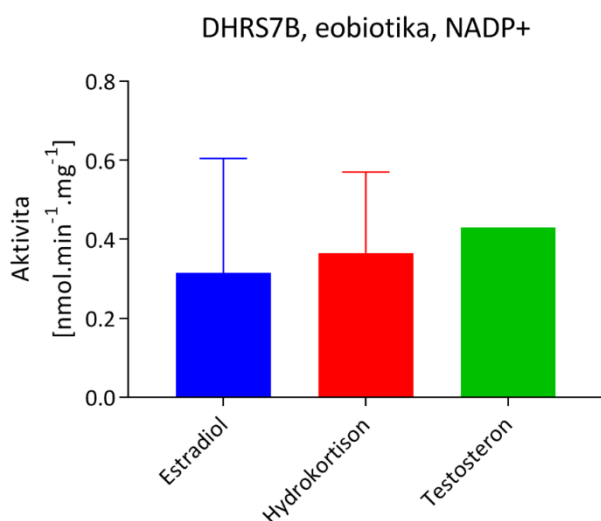
**Obrázek 20 - Screening redukční enzymové aktivity DHR57C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADH.**



**Obrázek 21 - Screening redukční enzymové aktivity DHR57C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADPH.**

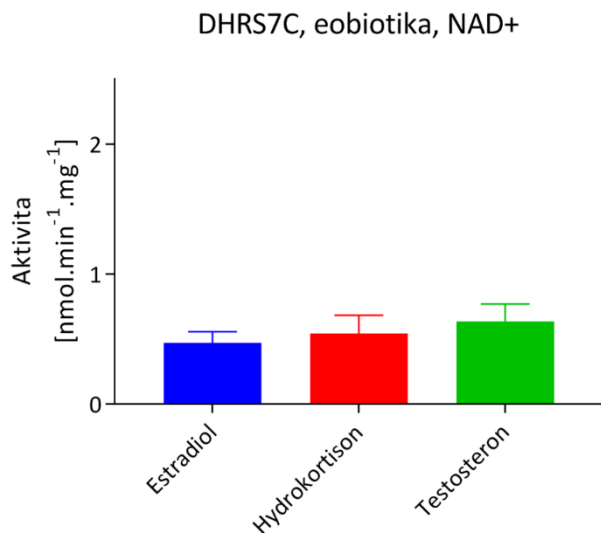


**Obrázek 22 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NAD<sup>+</sup>.**

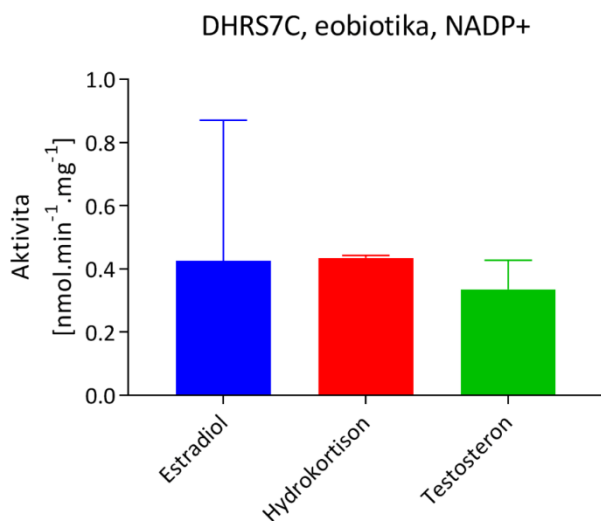


**Obrázek 23 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADP<sup>+</sup>.**

Pro enzym DHR57B byla detekovaná aktivita vůči všem třem testovaným eobiotikům (estradiolu, hydrokortisonu a testosteronu) v přítomnosti kofaktoru NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>. Ve srovnání s redukční aktivitou DHR57B byla tato aktivita významně nižší (Obrázek 22 a 23).

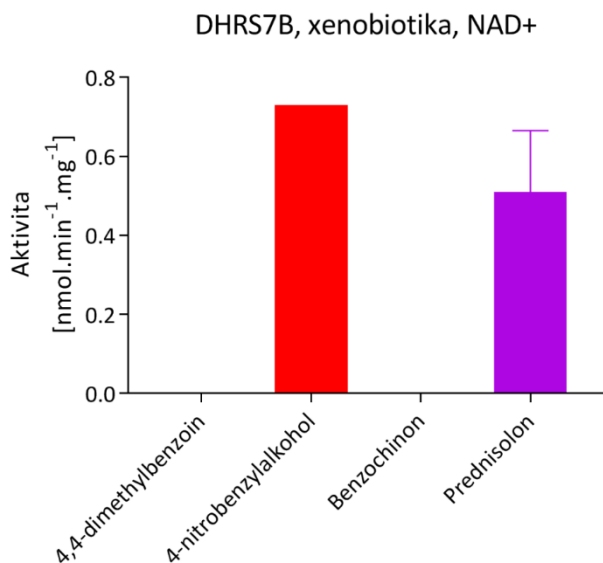


**Obrázek 24 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57C vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NAD<sup>+</sup>.**

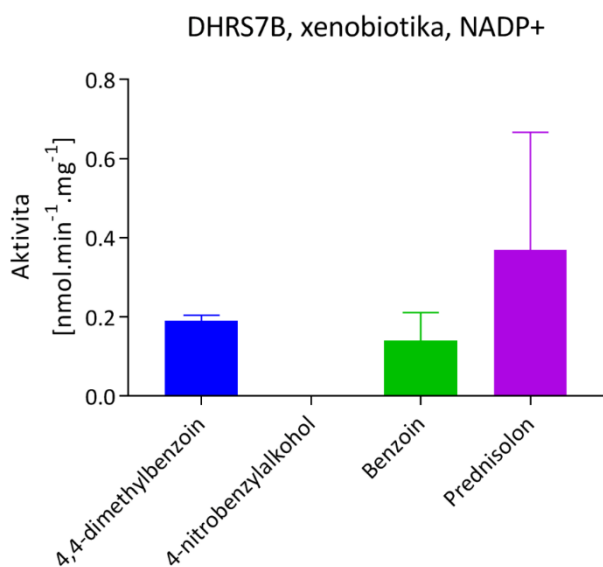


**Obrázek 25 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57C vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADP<sup>+</sup>.**

V případě DHR57C byla situace podobná (Obrázek 24 a 25). Byla detekována přibližně stejná aktivita vůči všem testovaným eobiotickým látkám za účasti NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>, nicméně podstatně nižší než aktivita redukční.



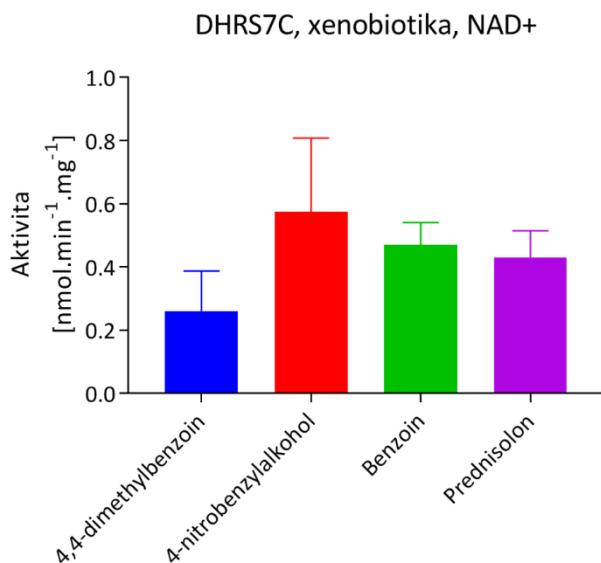
**Obrázek 26 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NAD<sup>+</sup>.**



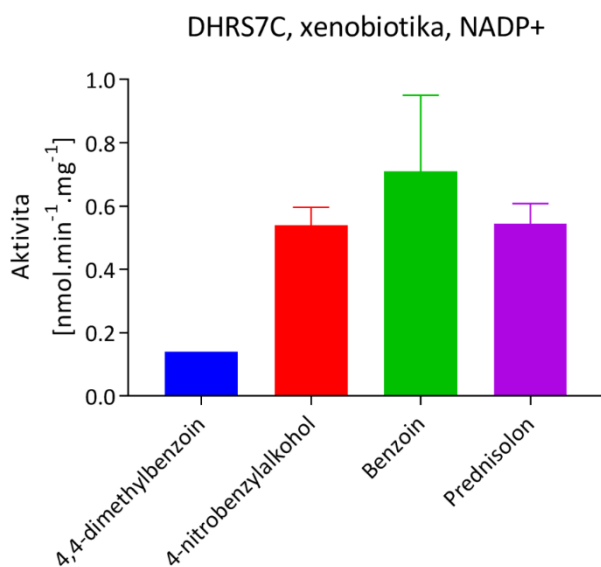
**Obrázek 27 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADP<sup>+</sup>.**

DHR57B vykazovala oxidační aktivitu vůči xenobiotikům 4-nitrobenzylalkoholu a prednisolonu v přítomnosti NAD<sup>+</sup> a za účasti NADP<sup>+</sup> vůči prednisolonu, 4,4-dimethylbenzoinu a benzochinonu.





**Obrázek 28 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NAD<sup>+</sup>.**



**Obrázek 29 - Screening oxidační enzymové aktivity DHR57C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADP<sup>+</sup>.**

Aktivita DHR57C vůči xenobiotikům byla na rozdíl od DHR57B detekována ve všech případech. Naměřené hodnoty byly podobné v přítomnosti NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>.

## 6 DISKUZE

Lidské DHRS7B a DHRS7C jsou enzymy z rodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem. Na základě počítačového modelování a jejich zařazení do klasifikačního systému se předpokládá, že by tyto enzymy mohly hrát roli ve fyziologických pochodech, ale i patologických procesech, nebo se podílet na biotransformaci xenobiotik. Ze všech těchto důvodů by mohly být zajímavými terapeutickými cíli. Ale i přes pokračující výzkum SDR se DHRS7B a DHRS7C stále řadí mezi nedostatečně charakterizované proteiny. Poznání jejich tkáňové distribuce a buněčné lokalizace a určení biologické aktivity by umožnilo pochopit jejich funkce v lidském organismu a následně tyto poznatky využít.

Dle bioinformatických dat se předpokládá, že se jedná o membránově vázané proteiny. Byla popsána lokalizace myší DHRS7B na membráně ER (Keller *et al.*, 2009), ale nebyla určena její orientace ani míra interakce. Myší DHRS7C byla také určena jako protein lokalizovaný v membráně ER (Lu, Tigchelaar, *et al.*, 2012). Treves *et al.* (2012) ji charakterizovali jako integrální enzym, směřující do cytoplazmy. Nicméně doposud se nikdo nezabýval stanovením membránové topologie lidských ortologů DHRS7B a DHRS7C.

Metoda alkalické extrakce a extrakce detergentem umožnila určit, zda enzymy interagují s membránou. Výsledky poukazují na to, že v případě DHRS7B by se mohlo jednat o integrální monotopický protein, který interaguje s membránou pouze částečně. Podobných výsledků bylo za použití stejné metody dosaženo u DRHS1, která však byla popsána jako periferní protein (Šperková, 2016). U DHRS7C se dá dle výsledků usuzovat, že její vazba k membráně je silnější než u DHRS7B, pravděpodobně se jedná o integrální transmembránový protein. Dle Treves *et al.* (2012) je myší DHRS7C integrální protein, což by se shodovalo s výsledky této práce. Na rozdíl od výsledků, kterých bylo stejnou metodou dosaženo u integrálních enzymů DHRS3 (Lundová *et al.*, 2015) a DHRS7 (Stambergova *et al.*, 2014), ale přešla část proteinu DHRS7C do supernatantu už při alkalické extrakci. Je tedy možné, že DHRS7C neprochází membránou celá, může obsahovat velký hydrofobní segment, který bude v membráně jen hluboce zanořen.

Pomocí metody inkubace s proteinasou K lze rozlišit, zda jsou enzymy orientovány do cytosolu nebo lumen ER. U DHRS7B došlo ke kompletní degradaci již ve vodném prostředí, což značí, že není chráněna integritou membrány před účinky proteinasy K, a tudíž směřuje do cytosolu. I v tomto parametru buněčné lokalizace se DHRS7B shoduje s DHRS1 (Šperková, 2016). Navíc je její orientace shodná s DHRS3 (Lundová *et al.*, 2015). Pro úplnou degradaci DHRS7C byla potřebná přítomnost detergentu, který narušil celistvost membrány. Z výsledků lze usuzovat, že DHRS7C je pravděpodobně orientována do cytosolu, ale protože silně interaguje s membránou, nemohla proteínasa K ve vodném prostředí protein zcela rozložit. V každém případě by bylo vhodné ověřit orientaci DHRS7C odlišnou metodou na úrovni buněk.

Orientace na membráně představuje velmi důležitou charakteristiku, protože je úzce spjata s enzymovou aktivitou. Má totiž vliv na dostupnost substrátů i kofaktorů. V buňkách existuje mezi cytosolem a lumen ER rozdíl v koncentracích jednotlivých kofaktorů. Vzhledem k neprostupnosti membrány pro kofaktory je zřejmé, že v lumen ER musí existovat jejich zdroje. Nejsou však známy jejich koncentrace ani poměry. Podíl  $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$  je v cytosolu asi 0,01, zatímco podíl  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  přibližně 1 000. Což znamená, že enzymy směřující do cytosolu upřednostňující  $\text{NAD(H)}$  budou obecně aktivní spíše v oxidačním směru, kdežto enzymy využívající přednostně  $\text{NADP(H)}$  se budou chovat jako reduktasy (Škarydová and Wsól, 2012; Bhatia *et al.*, 2015). Přesné určení aktivity a preference kofaktorů by proto mohly upřesnit nebo potvrdit, kterým směrem jsou DHRS7B a DHRS7C orientovány.

V rámci této práce byl proveden vůbec první spektrofotometrický screening enzymové aktivity mikrosomálních frakcí *Sf9* s overexprimovanou lidskou DHRS7B a DHRS7C vůči sloučeninám s karbonylovou funkční skupinou, v redukčním i oxidačním směru za využití  $\text{NAD(H)}$  a  $\text{NADP(H)}$  jako kofaktorů. Stanovení bylo založeno na měření nárůstu nebo poklesu absorbance  $\text{NAD(P)(H)}$  v reakční směsi při 340 nm. Výběr potenciálních eobiotických i xenobiotických substrátů proběhl na základě získaných informací o aktivitě příbuzných SDR. DHRS1, DHRS3 a DHRS7, overexprimované ve stejné buněčné linii *Sf9*, byly testovány na aktivitu stejnou metodou jako DHRS7B a DHRS7C, rozdíly se vyskytovaly jen ve finálních koncentracích testovaných ligandů v reakční směsi (Stambergova *et al.*, 2014; Lundová *et al.*, 2015; Šperková, 2016).

Výsledky ukazují, že DHRS7B i DHRS7C mají *in vitro* vyšší aktivitu v redukčním směru, což odpovídá *in silico* predikcím.

Při porovnání dat z redukčního směru v přítomnosti NADH lze pozorovat, že detekovaná aktivita DHRS7B a DHRS7C vůči eobiotikům byla přibližně stejná, z ligandů lze jmenovat androstendion, estron, glukózu, glyceraldehyd, prednison (xenobiotikum) a progesteron (Obrázek 14 a 16). Obdobná situace nastala za použití NADPH, ale naměřené hodnoty byly nižší a oproti DHRS7B nebyla DHRS7C aktivní ke glukóze a kortisonu (Obrázek 15 a 17). V přítomnosti NADH se u obou enzymů vyskytovala aktivita vůči androstendionu, ale naopak chyběla vůči DHT a prostaglandinům. S NADPH jako kofaktorem tomu bylo naopak (Obrázek 14-17). Při srovnání screeningu redukční aktivity DHRS7B a DHRS7C vůči xenobiotikům v prostředí s NADH je spektrum metabolizovaných látek opět podobné, zahrnuje ketoprofen, ketotifen, benzil a benzochinon (Obrázek 18 a 20). Větší rozdíly se projeví za použití NADPH, kde byla vyšší aktivita zaznamenána u DHRS7C (Obrázek 19 a 21). Za zmínku stojí 4-nitrobenzaldehyd a 4-nitroacetofenon, protože již dříve byla popsána aktivita příbuzného enzymu 11 $\beta$ -HSD1 vůči těmto sloučeninám (Škarydová and Wsól, 2012). Při screeningu enzymové aktivity nejbližší příbuzného enzymu DHRS7 byla detekována redukční aktivita vůči některým ligandům, vůči kterým byla detekována i v případě DHRS7B a DHRS7C. Z eobiotik lze zmínit například estron, kortison nebo androstendion s hodnotami řádově se shodujícími s DHRS7B a DHRS7C. Hodnoty DHRS7 pro xenobiotika benzil, benzochinon a 4-nitrobenzaldehyd jsou o řád vyšší (Štambergová, 2013).

Screening oxidační aktivity byl proveden v menší míře vzhledem k předpokladu, že DHRS7B a DHRS7C jsou spíše reduktasy. Aktivita sice byla detekována ve většině případů, ale s velmi nízkými hodnotami (Obrázek 22-29).

Je velmi obtížné porovnávat výsledky různých měření enzymové aktivity mezi sebou, protože i kdyby byla provedena stejnou metodou za totožných podmínek a výsledky byly vyjádřeny ve shodných jednotkách, mohou být ovlivněny řadou faktorů pozitivně i negativně. Kromě *in vitro* koncentrace substrátů a kofaktorů vstupuje do hry i možnost vazby ligandu na nescifické proteiny. Záleží na pH prostředí i funkčním stavu samotného enzymu. Měla by se posoudit i míra sekvenční shody mezi myším

a lidským ortologem. Treves *et al.* (2012) například určili, že se myší DHRS7C podílí na NAD<sup>+</sup>-dependentní přeměně all-*trans*-retinolu na all-*trans*-retinal (Štambergová *et al.*, 2016), čili v oxidačním směru. Toto tvrzení o oxidační aktivitě DHRS7C bude nutné ověřit s purifikovaným proteinem za využití jiné analytické metody, protože v případě této práce nebylo možné kvůli zvolené screeningové metodě ověřit stejnou aktivitu. Navíc závěry učiněné z výzkumu *in vitro* nemusí korelovat s tím, jak děj probíhá *in vivo*. Záleží na dostupnosti substrátů a kofaktorů v buňce. Vliv mohou mít i protein-protein interakce mezi enzymy, jako tomu je například v případě DHRS3 a RDH10 (Adams *et al.*, 2014) nebo 11 $\beta$ -HSD1 a H6PDH (Atanasov *et al.*, 2008). DHRS7B a DHRS7C nejbližší příbuzný enzym DHRS7 byl poprvé určen jako integrální membránový protein, směřující do lumen ER, preferující NADPH jako kofaktor. Proto byl vysloven názor, že by její aktivita mohla také souviset s H6PDH (Štambergová *et al.*, 2014). Na základě této domněnky učinili Araya *et al.* (2017) experiment a zjistili, že aktivita DHRS7 nebyla v přítomnosti H6PDH stimulována. Což je vedlo k pochybování o orientaci enzymu na membráně. Provedli vlastní měření a došli k opačnému závěru – DHRS7 směřuje do cytosolu. Obě studie byly provedeny na eukaryotickém systému, nicméně Štambergová *et al.* pracovali s hmyzími buňkami *Sf9*, zatímco Araya *et al.* využili lidskou buněčnou linii. I to je nutno brát v potaz, protože rozdíly ve složení membrány mohou ovlivňovat finální orientaci proteinu, a tudíž i aktivitu.

S cílem více poznat lidské DHRS7B a DHRS7C se tato práce soustředila na stanovení biochemických vlastností. A i když se s membránově vázanými enzymy pracuje obtížněji než s cytosolickými formami, podařilo se přinést nové informace o jejich membránové topologii a potenciálních substrátech. Výsledky se stanou základem pro další výzkum. Ten by se mohl zaměřit na určení tkáňové distribuce, především DHRS7B. Data ze screeningu poslouží k nalezení vhodného modelového ligandu, využitelného pro monitorování purifikace obou enzymů a následnému přesnějšímu stanovení jejich aktivity za využití HPLC analýzy.

## 7 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium základních biochemických vlastností lidských enzymů DHRS7B a DHRS7C z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem.

Na základě vytyčených cílů se podařilo:

1. Určit membránovou topologii lidské DHRS7B a DHRS7C.  
DHRS7B interaguje s membránou ER a je orientována do cytosolu.  
DHRS7C je enzym silně interagující s membránou ER, směřující pravděpodobně do cytosolu.
2. Provést screening katalytické aktivity mikrosomálních frakcí DHRS7B a DHRS7C vůči vybraným ligandům s karbonylovou skupinou z řad eobiotik i xenobiotik – detekovat jejich převážně redukční aktivitu vůči některým steroidním hormonům (například vůči estronu, androstendionu, nebo progesteronu), endogenním látkám (glukóze a glycerinaldehydu) nebo xenobiotikům (ketoprofen, ketotifen, prednison).

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
AKR	aldoketoreduktasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
APS	persulfát amonný
Asn	asparagin
BSA	bovinní sérový albumin
C1-3	klastr 1-3
CNS	centrální nervová soustava
CYP	cytochrom
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEA-S	dehydroepiandrosteron-sulfát
DHRS	dehydrogenasy/reduktasy SDR nadrodiny
DHT	dihydrotestosteron
DMSO	dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemiluminiscence
ER	endoplazmatické retikulum
EtOH	ethanol
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
FLAG	oktapeptidová sekvence
Gly	glycin
GR	glukokortikoidní receptory
H6PDH	hexosa-fosfátdehydrogenasa
HMM	Hidden Markov Model
HRP	horseradish peroxidase
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
IDH1	isocitrátdehydrogenasa 1
IPA	isopropanol
KAR	ketoacyl-CoA reduktasa
KBV	Katedra biochemických věd
Lys	lysin
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
ME	merkptoethanol
MeOH	methanol
MR	mineralokortikoidní receptory
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaný nebo redukovaný
NAD(P)(H)	nikotinamidadenindinukleotidový kofaktor, fosforylovaný nebo nefosforylovaný, oxidovaný nebo redukovaný
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NADP(H)	nikotinamidadeninukleotidfosfát, oxidovaný nebo redukovaný
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NNK	N-methyl-N-(4-oxo-4-pyridin-3-ylbutyl)nitrous amide
PDB	Protein Data Bank
PexRAP	Peroxisomal Reductase Activating PPAR $\gamma$
PGE	prostaglandin
PK	proteínasa K
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
prRDH	photoreceptor retinol dehydrogenase
RAR	Retinoic Acid Receptor
RDH	retinoldehydrogenasa
SCP2	sterol carrier protein 2
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová elektroforéza
Ser	serin
<i>Sf9</i>	hmyzí buněčná linie z ovariálních buněk <i>Spodoptera frugiperda</i>
TBS-T	Tris-buffered saline – Tween
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	tetramethylethylenediamine
Thr	threonin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan (THAM)
Tyr	tyrosin
WB	Western Blot
x	náhrada za jakoukoli aminokyselinu



# SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

## Obrázky

Obrázek 1 - Reakce katalyzované enzymy z SDR nadrodiny. ....	10
Obrázek 2 - Rossmannův záhyb.....	11
Obrázek 3 - Typy SDR enzymů.....	13
Obrázek 4 - Nomenklatura SDR enzymů. ....	13
Obrázek 5 - Rozdělení lidských SDR enzymů na typy a klastry. ....	15
Obrázek 6 - Konverze mezi kortisonem a kortisolem. ....	17
Obrázek 7 - Zapojení 17 $\beta$ -HSD do intrakrinní produkce pohlavních hormonů.....	19
Obrázek 8 - Metabolismus retinoidů.....	21
Obrázek 9 - Provedení elektroforézy.....	33
Obrázek 10 - Schéma blotovacího aparátu. ....	34
Obrázek 11 - Imunodetekce a vizualizace. ....	35
Obrázek 12 - Alkalická extrakce a extrakce detergentem mikrosomální frakce s DHRS7B a DHRS7C.....	38
Obrázek 13 – Inkubace mikrosomálních frakcí DHRS7B a DHRS7C s proteinasou K .....	39
Obrázek 14 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADH. ....	40
Obrázek 15 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADPH. ....	41
Obrázek 16 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADH. ....	42
Obrázek 17 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným eobiotikům v přítomnosti NADPH. ....	43

Obrázek 18 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADH. ....	44
Obrázek 19 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADPH. ....	44
Obrázek 20 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADH. ....	45
Obrázek 21 - Screening redukční enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADPH. ....	45
Obrázek 22 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NAD <sup>+</sup> . ....	46
Obrázek 23 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADP <sup>+</sup> . ....	46
Obrázek 24 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NAD <sup>+</sup> . ....	47
Obrázek 25 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADP <sup>+</sup> . ....	47
Obrázek 26 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NAD <sup>+</sup> . ....	48
Obrázek 27 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7B vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADP <sup>+</sup> . ....	48
Obrázek 28 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NAD <sup>+</sup> . ....	49
Obrázek 29 - Screening oxidační enzymové aktivity DHRS7C vůči vybraným xenobiotikům v přítomnosti NADP <sup>+</sup> . ....	49

## Tabulky

Tabulka 1 - Složení jednotlivých vzorků pro inkubaci s proteinasou K. ....	31
Tabulka 2 – Složení gelu pro SDS-PAGE elektroforézu.....	32
Tabulka 3 – Eobiotika použitá pro screening redukční aktivity.....	36
Tabulka 4 – Xenobiotika použitá pro screening redukční aktivity. ....	37
Tabulka 5 – Eobiotika použitá pro screening oxidační aktivity. ....	37
Tabulka 6 – Xenobiotika použitá pro screening oxidační aktivity. ....	37

## POUŽITÁ LITERATURA

- Adams, M. K. *et al.* (2014) 'The retinaldehyde reductase activity of DHRS3 is reciprocally activated by Retinol Dehydrogenase 10 to control retinoid homeostasis', *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), pp. 14868–14880.
- AKR|SDR Research Group (2014) 'Pracovní návod - SDS-PAGE elektroforéza'.
- Arai, S. *et al.* (2017) 'Functional loss of DHRS7C induces intracellular Ca<sup>2+</sup> overload and myotube enlargement in C2C12 cells via calpain activation', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(1), pp. C29–C39.
- Araya, S. *et al.* (2017) 'DHRS7 (SDR34C1) – A new player in the regulation of androgen receptor function by inactivation of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone?', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, 171(March), pp. 288–295.
- Atanasov, A. G. *et al.* (2008) 'Direct protein–protein interaction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen', 1783, pp. 1536–1543.
- Belyaeva, O. V. *et al.* (2015) 'Evolutionary origins of retinoid active short-chain dehydrogenases/reductases of SDR16C family', *Chemico-Biological Interactions*, 234, pp. 135–143.
- Bhatia, C. *et al.* (2015) 'Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships', *Chemico-Biological Interactions*, 234, pp. 114–125.
- Bray, J. E., Marsden, B. D. and Oppermann, U. (2009) 'The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary', *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), pp. 99–109.
- GE Healthcare Life Sciences (2014) *Western Blotting: Principles and Methods*. Available at: [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/RelatedContent/Files/1334667780708/litdoc28999897\\_20161015021727.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1334667780708/litdoc28999897_20161015021727.pdf) (Accessed: 14 February 2017).
- Haeseleer, F. and Palczewski, K. (2000) '[24] Short-chain dehydrogenases/reductases in retina', *Methods in Enzymology*, 316, pp. 372–383.
- Jörnvall, H., Landreh, M. and Östberg, L. J. (2015) 'Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era', *Chemico-Biological Interactions*, 234, pp. 75–79.
- Kallberg, Y., Oppermann, U. and Persson, B. (2010) 'Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models', *FEBS Journal*, 277(10), pp. 2375–2386.
- Kavanagh, K. L. *et al.* (2008) 'The SDR superfamily: Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(24), pp. 3895–3906.

- Kedishvili, N. Y. (2013) 'Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation.', *Journal of lipid research*, 54(7), pp. 1744–60.
- Keller, B., Meier, M. and Adamski, J. (2009) 'Comparison of predicted and experimental subcellular localization of two putative rat steroid dehydrogenases from the short-chain dehydrogenase/reductase protein superfamily', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301(1–2), pp. 43–46.
- Lodhi, I. J. *et al.* (2012) 'Inhibiting Adipose Tissue Lipogenesis Reprograms Thermogenesis and PPAR $\gamma$  Activation to Decrease Diet-induced Obesity', 16(2), pp. 189–201.
- Lu, B., Tigchelaar, W., *et al.* (2012) 'DHR57c, a novel cardiomyocyte-expressed gene that is down-regulated by adrenergic stimulation and in heart failure', *European Journal of Heart Failure*, 14(1), pp. 5–13.
- Lu, B., Yu, H., *et al.* (2012) 'Identification of hypertrophy and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models', *Physiological Genomics*, 44(8), pp. 443–454.
- Lukacik, P., Kavanagh, K. L. and Oppermann, U. (2006) 'Structure and function of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1–2), pp. 61–71.
- Lundová, T. *et al.* (2015) 'Molecular and biochemical characterisation of human short-chain dehydrogenase/reductase member 3 (DHR53)', *Chemico-Biological Interactions*, 234, pp. 178–187.
- Marchais-Oberwinkler, S. *et al.* (2011) '17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 $\beta$ -HSDs) as therapeutic targets: Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 125(1–2), pp. 66–82.
- Miller, W. L. and Auchus, R. J. (2011) 'The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders', *Endocrine Reviews*, 32(1), pp. 81–151.
- Moeller, G. and Adamski, J. (2009) 'Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301(1–2), pp. 7–19.
- Odermatt, A. and Nashev, L. G. (2010) 'The glucocorticoid-activating enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 119(1–2), pp. 1–13.
- Persson, B. *et al.* (2009) 'The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative', *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), pp. 94–98.
- Persson, B. and Kallberg, Y. (2013) 'Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)', *Chemico-Biological Interactions*, 202(1–3), pp. 111–115.

- Průša, R. (1997) *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Praha: Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2. lékařské fakulty UK.
- Rumlova, M., Paces, V. and Ruml, T. (2003) *Základní metody genového inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
- Seibert, J. K. *et al.* (2015) 'A role for the dehydrogenase DHRS7 (SDR34C1) in prostate cancer', *Cancer Medicine*, 4(11), pp. 1717–1729.
- Shibata, T. *et al.* (2011) 'Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation', *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc., 178(3), pp. 1395–1402.
- Stambergova, H. *et al.* (2014) 'Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7', *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ireland Ltd, 207(1), pp. 52–57.
- Škarydová, L. and Wsól, V. (2012) 'Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily.', *Drug Metabolism Reviews*, 44(2), pp. 173–191.
- Šperková, K. (2016) *Příprava lidského DHRS1 enzymu a jeho základní charakterizace*. Diplomová práce. Katedra biochemie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- Štambergová, H. (2013) *Lidské membránově vázané karbonylreduktasy*. Autoreferát disertační práce. Katedra biochemie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- Štambergová, H. *et al.* (2016) 'Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids?', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, pp. 112–119.
- Treves, S. *et al.* (2012) 'SRP-35, a newly identified protein of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a retinol dehydrogenase', *Biochemical Journal*, 441, pp. 731–741.
- Wu, Q. *et al.* (2001) 'Molecular cloning and characterization of a novel Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 genea from human fetal brain', *Molecular Biology Reports*, 28(4), pp. 193–198.
- Wu, X. *et al.* (2007) 'SDR-type human hydroxysteroid dehydrogenases involved in steroid hormone activation', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–266(SUPPL.), pp. 71–76.