

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

# Význam enzymů z nadrodiin AKR a SDR u člověka

Habilitační práce  
(soubor publikovaných vědeckých prací doplněných komentářem)

RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.  
Univerzita Hradec Králové

Hradec Králové 2018

# Obsah

1. Teoretická část .....	4
1.1 Nadrodina aldo-keto reduktas (AKR) .....	5
1.1.1 Lidské AKR .....	7
1.2 Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) .....	10
1.2.1 Lidské SDR.....	12
1.3 Význam enzymů AKR a SDR u člověka .....	15
1.3.1 Role v geneticky podmíněných onemocněních .....	16
1.3.2 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu steroidů a onemocněních spojených s jejich deregulací .....	17
1.3.3 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu retinoidů a onemocněních spojených s jejich deregulací .....	21
1.3.4 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu prostaglandinů a onemocnění spojených s jejich deregulací .....	22
1.3.5 Role AKR a SDR v biotransformaci xenobiotik .....	23
1.3.6 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu sacharidů a s ním spojených onemocnění.....	25
1.3.7 Role AKR a SDR enzymů v dalších metabolických drahách a onemocnění spojených s jejich deregulací .....	25
2. Komentář k předkládaným pracím .....	27
2.1 Role reduktas karbonylových sloučenin v biotransformaci vybraných xenobiotik .....	27
2.2 Studium modulace aktivity AKR enzymů hrajících roli v rozvoji nádorového onemocnění.....	30
2.3 Popis a charakterizace vybraných zástupců SDR nadrodiny.....	33
3. Souhrn, závěry a perspektivy .....	38
4. Podíl předkladatelky na jednotlivých publikacích.....	40
5. Seznam zkratk .....	44
6. Literatura .....	46
7. Soubor publikovaných prací.....	57

## **Poděkování**

Můj dík patří všem členům pracovní skupiny „AKR|SDR research group“ a jejímu vedoucímu prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D., kteří se podíleli na vzniku publikací uvedených v této práci. Dík patří i ostatním členům Katedry Biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, kde jsem strávila mnoho příjemných let. Dále bych ráda poděkovala i všem externím spolupracovníkům za pomoc a také podnětné diskuse. Nelze zapomenout ani na grantové agentury a jejich finanční podporu.

Největší dík patří ale mým rodičům a manželovi za stálou podporu, bez které by to nešlo.

# 1. Teoretická část

Proteiny mají v organismu mnoho různých funkcí – strukturní, transportní, regulační, obranné, katalytické a další. Zásadní roli v katalýze chemických reakcí v organismech hrají enzymy. Jsou vysoce účinné, urychlují reakce v organismu až  $10^{16}$ krát v porovnání s nekatalyzovanými reakcemi, tedy mnohem účinněji než klasické chemické katalyzátory. Navíc jsou vysoce specifické, katalyzují konkrétní chemickou přeměnu obvykle pouze jedné sloučeniny nebo malé skupiny příbuzných látek. Enzymy jsou velmi důležitou součástí každé buňky, neboť bez jejich přítomnosti by naprostá většina reakcí v organismech neprobíhala či probíhala jen velmi pomalu. Vzhledem k tomu, že v každé buňce v daném okamžiku probíhá tisíce enzymově katalyzovaných chemických reakcí, byly tyto procesy integrovány do metabolických drah, které jsou propojeny a regulovány tak, aby byly zajištěny potřeby buněk a celého organismu.

V počátcích studia enzymů se používali pro jejich identifikaci hlavně triviální názvy, které byly odvozené od jejich funkce, ale s postupným rozvojem enzymologie a nárůstem počtu známých enzymů bylo třeba jejich názvosloví systematizovat. V roce 1961 byl zaveden komisí Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) systém klasifikace enzymů, který je založený na typu katalyzované reakce. Základem je rozdělení enzymů do šesti tříd (Tab. 1). Třídy se dále dělí na podtřídy podle typu donoru, ty dále na podskupiny podle typu akceptoru a v nich jsou označeny konkrétní enzymové aktivity. Výsledkem je čtyřmístný kód tzv. číslo enzymové komise (EC číslo), které se skládá z označení EC a kombinace čtyř čísel třída.podtřída.podskupina.konkrétní aktivita. Například EC 1.1.1.27 je označení pro laktátdehydrogenasu (McDonald & Tipton, 2014).

Tab. 1: Klasifikace enzymů, rozdělení do tříd podle typu katalyzované reakce

Třída	Název	Označení	Typ katalyzované reakce
1.	Oxidoreduktasy	EC 1.x.x.x	$AH_2 + B = A + BH_2$ $AH_2 + B^+ = A + BH + H^+$
2.	Transferasy	EC 2.x.x.x	$AX + B = A + BX$
3.	Hydrolasy	EC 3.x.x.x	$A-B + H_2O = AH + BOH$
4.	Lyasy	EC 4.x.x.x	$A-B + X-Y = X-A-B-Y$
5.	Isomerasy	EC 5.x.x.x	$A-B = B-A$
6.	Ligasy	EC 6.x.x.x	$A+B+NTP = A-B + NDP+P$ $A+B + NTP = A-B + NMP + PP$

Všechny klasifikované enzymy jsou aktuálně uvedeny v databázi ExplorEnz (McDonald et al., 2009), do letošního roku jich bylo zařazeno cca 6 000 a každý rok jich přibývá asi 300. Jde o klasifikované enzymové aktivity, nikoliv o konkrétní proteinové struktury. Z toho vyplývá, že pod jedním EC číslem se může skrývat celá řada enzymů (= jednotlivých produktů translace genů) z konkrétního organismu či různých organismů, které katalyzují stejnou reakci. Na druhou stranu, jeden enzym (= produkt translace genu) může mít přiřazeno více než jedno EC číslo, pokud katalyzuje více než jednu chemickou reakci. Do enzymové klasifikace se zatím nepodařilo nijak implementovat propojení

enzymových aktivit s konkrétními proteinovými strukturami. Z tohoto důvodu je ExploEnz databáze propojena s dalšími důležitými informačními zdroji o enzymech jako je BRAunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA, [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org), (Placzek et al., 2017)) nebo Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, [www.kegg.jp](http://www.kegg.jp), (Kanehisa et al., 2017)) (Cornish-Bowden, 2014).

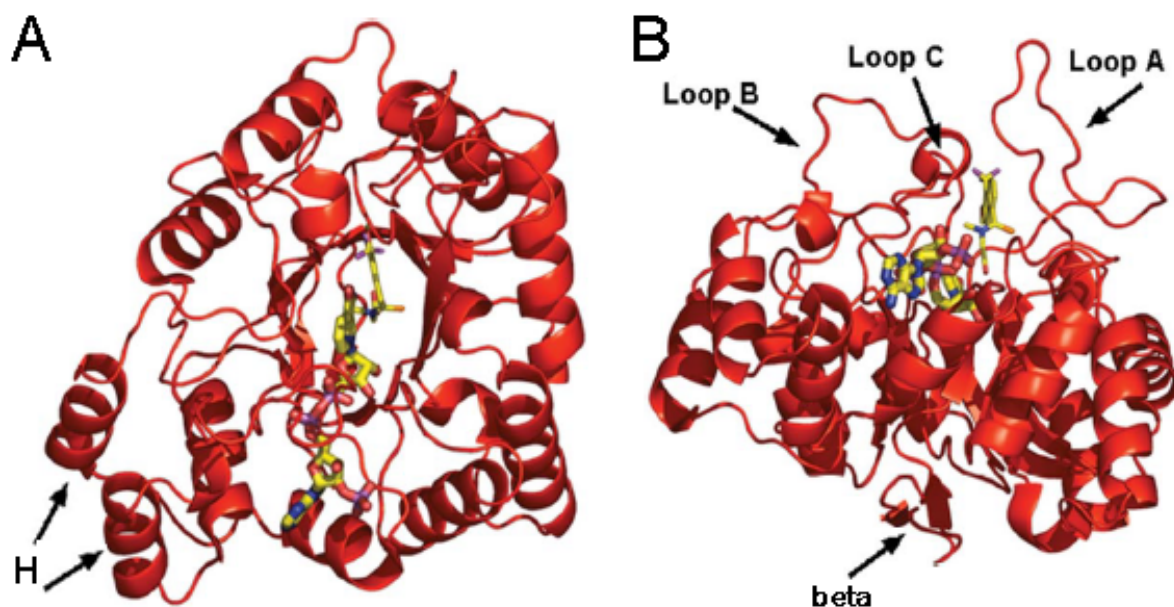
Sekvence lidského genomu byla dokončena v roce 2001 a aktuálně se uvádí, že obsahuje asi 19–21 tisíc genů kódujících proteiny (Chi, 2016; Pertea et al., 2018). Lidský genom spolu s genomem *E.coli* nebo *A.thaliana* patří mezi nejlépe popsané genomy, a i tak se odhaduje, že u 30–50 % genů není známá funkce proteinů, které jsou jimi kódovány. Většina z nich nebyla nikdy experimentálně studovaná nebo byla studována pouze omezeně. Přibližně 30 % těchto proteinů neznámé funkce jsou enzymy (Ellens et al., 2017). Vedle toho existují i u člověka tzv. sirotčí (orphan) enzymy, což jsou klasifikované enzymové aktivity, které nejsou asociovány s konkrétními proteinovými sekvencemi. Těch je mezi klasifikovanými aktivitami asi 22–30 % (Ellens et al., 2017; Sorokina et al., 2014). Je zřejmé, že na poli výzkumu enzymů je mnoho neznámých. Důležitou oblastí výzkumu je přiřazení enzymových aktivit k proteinovým sekvencím a naopak, ale neméně významné je také studium jejich interakcí a regulací, které silně ovlivňují jejich funkci v buňce či organismu. Deregulace enzymových aktivit či určité mutace v enzymech mohou vést k rozvoji závažných onemocnění, a enzymy pak mohou být důležité farmakologické cíle, a je tedy zcela nezbytné enzymy dále intenzivně studovat.

Mezi méně prozkoumané lidské enzymy patří také zástupci z enzymových nadrodin aldo-keto reduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Tyto enzymy byly také předmětem experimentálního výzkumu naší pracovní skupiny, proto v následujících kapitolách budou načrtnuty jejich vlastnosti a popsána aktuálně známá role v lidském organismu.

## 1.1 Nadrodina aldo-keto reduktas (AKR)

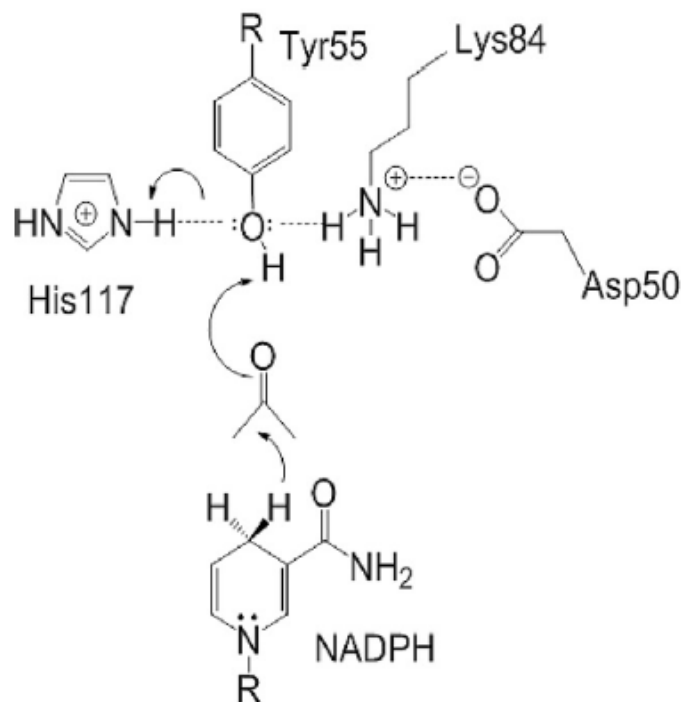
Nadrodina AKR obsahuje více než 190 členů vyskytujících se v různých organismech od nejjednodušších mikroorganismů až po člověka. Aktuální počet a další informace o AKR nadrodině lze nalézt na „AKR superfamily homepage“ ([www.med.upenn.edu/akr](http://www.med.upenn.edu/akr), (Hyndman et al., 2003)). Zástupci AKR nadrodiny se obvykle skládají z 320 aminokyselin (~ 37 kDa). Vyskytují se většinou ve formě monomerů, které jsou rozpustné a lokalizované v cytosolu buněk. Pro nadrodinu AKR byl zaveden na základě aminokyselinové sekvenční shody od roku 1997 nomenklaturní systém (Jez et al., 1997; Jez & Penning, 2001). Tato nadrodina se člení do 16 rodin (shoda ≤ 40 %, označeno číslicí), ty se dále dělí na podrodiny (shoda ≥ 60 %, označeno písmenem), ve kterých se nachází jednotliví členové (označeno číslicí). Například aldehydreduktasa se dle nomenklaturního systému nazývá AKR1A1, jde o enzym z nadrodiny AKR patřící do rodiny 1, podrodiny A. V nomenklatuře bylo zavedeno i značení jednonukletidových polymorfismů a produktů alternativních sestřihů (Barski et al., 2013; Penning, 2015).

AKR proteiny mají stejnou prostorovou strukturu, tzv.  $(\alpha/\beta)_8$ -soudku, ve kterém se pravidelně střídají  $\alpha$ -helixy s paralelními  $\beta$ -listy. Před ním, na N-konci aminokyselinového řetězce, se obvykle nachází dva  $\beta$ -listy uspořádané do vlásenky, a mimo strukturu soudku lze navíc nalézt jeden až dva helixy a tři variabilní smyčky, které jsou zodpovědné za substrátovou specifitu konkrétního AKR (Obr. 1) (Barski et al., 2008).



Obr. 1: Krystalová struktura zástupce AKR nadrodiny, AKR1B10 s navázaným kofaktorem NADP<sup>+</sup> a léčivem tolrestat. A. pohled shora na  $(\alpha/\beta)_8$ -soudku B. pohled z boku  $(\alpha/\beta)_8$ -soudku. H – helixy mimo strukturu soudku, loop A-C – variabilní smyčky, beta – dva  $\beta$ -listy tvořící vlásenku (Gallego et al., 2007)

Většina AKR proteinů má enzymovou aktivitu, jde převážně o NADPH-dependentní reduktasy podílející se na přeměně aldehydů a ketonů na alkoholy. Samotná enzymová reakce probíhá v aktivním místě, kde je přítomna katalytická tetráda skládající se z aminokyselin Tyr, His, Lys a Asp (např. u AKR1C9 číslování Tyr55, His117, Lys84, Asp50 (Nahoum et al., 2001)), která je nejvíce konzervovanou oblastí v sekvenci AKR enzymů. Mechanismus enzymové reakce je sekvenční uspořádaný, kdy první se váže na enzym kofaktor NADPH, a to na C-terminální konec AKR enzymů, prostorově do spodní části kavity  $(\alpha/\beta)_8$ -soudku, kde je stabilizován řadou vodíkových vazeb a solných můstků. Následně se váže substrát do oblasti prostorově nad kofaktor, pro specifitu rozpoznání substrátu jsou důležité aminokyseliny v oblasti variabilních smyček (Komoto et al., 2004; Nahoum et al., 2001). Následně proběhne enzymová reakce, jejíž katalytický mechanismus je naznačen na Obr. 2. Po skončení reakce se uvolní z enzymu produkt a jako poslední oxidovaná forma kofaktoru (Penning, 2015).



Obr. 2: Navrhovaný katalytický mechanismus AKR enzymů. Za hlavní katalytickou aminokyselinu je považován tyrosin, který je donorem protonu do redukční reakce. Jeho přenosu napomáhá histidin, pomocnou roli hrají i aminokyseliny lysin a kyselina asparagová, které snižují  $pK_a$  tyrosinu. Tyrosin vytváří vodíkovou vazbu se substrátem, dochází k polarizaci karbonylové skupiny a tím se usnadňuje přenos hydridu z NADPH na karbonylový uhlík substrátu a průběh redukce karbonylové skupiny.

Číslování aminokyselin dle AKR1C9 (Penning, 2015)

AKR enzymy vykazují širokou substrátovou specifitu, dokáží tudíž katalyzovat přeměnu velkého množství různých substrátů od látek tělu vlastních jako jsou cukry, steroidní sloučeniny s ketonovou skupinou, ketoprostaglandiny, produkty oxidačního stresu s aldehydovou skupinou až po cizorodé látky, jako jsou strukturně velmi různorodé karcinogeny či léčiva. Ve většině případů jde o redukční reakce a výjimečně o oxidaci (Barski et al., 2008; Penning, 2015; Penning & Drury, 2007).

### 1.1.1 Lidské AKR

V lidském genomu je na různých chromozomech kódováno 15 zástupců AKR nadrodiny. Všechny lidské enzymy náleží pouze do třech AKR rodin, a sice do rodin 1, 6 a 7 (Tab. 2). Zejména ve starší literatuře je možné nalézt AKR enzymy pod různými názvy, které jsou odvozené od jejich postupně popsaných funkcí, proto je důležité používat systematické názvosloví.

Tab. 2: Přehled AKR proteinů vyskytujících se v lidském organismu (Mindnich et al., 2011; Mindnich & Penning, 2009; Penning, 2015)

název	alternativní název	chromozomální lokalizace
<b>AKR1A1</b>	aldehydreduktasa	1p33-p32
<b>AKR1B1</b>	aldosareduktasa	7q35
<b>AKR1B10</b>	aldosareduktasa like-1	7q33
<b>AKR1B15</b>	-	7q33
<b>AKR1C1</b>	20 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa, dihydrodioldehydrogenasa 1	10p15-p14
<b>AKR1C2</b>	3 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 3, dihydrodioldehydrogenasa 2, protein vázající žlučové kyseliny	10p15-p14
<b>AKR1C3</b>	17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 5, 3 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 2, prostaglandin-F-syntasa, dihydrodioldehydrogenasa x	10p15-p14
<b>AKR1C4</b>	3 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1, dihydrodioldehydrogenasa 4	10p15-p14
<b>AKR1D1</b>	$\Delta^4$ -3-ketosteroid-5- $\beta$ -reduktasa	7q32-q33
<b>AKR1E2</b>	1,5-anhydro-D-fruktosareduktasa, aldo-ketoreduktasa 1C like protein 2	10p15.1
<b>AKR6A3</b>	$\beta$ -podjednotka 1 napětově řízeného draselného kanálu	3q26.1
<b>AKR6A5</b>	$\beta$ -podjednotka 2 napětově řízeného draselného kanálu	1p36.3
<b>AKR6A9</b>	$\beta$ -podjednotka 3 napětově řízeného draselného kanálu	17p13.1
<b>AKR7A2</b>	alfatoxin-B1-aldehydreduktasa 2	1p36.13
<b>AKR7A3</b>	alfatoxin-B1-aldehydreduktasa 3	1p36.13

Ačkoliv lidské AKR enzymy patří mezi nejlépe charakterizované zástupce AKR nadrodiny, úroveň poznání jednotlivých lidských členů se významně liší. Od poměrně dobře popsaných členů (např. AKR1C3 s cca 1 000 články v databázi PubMed (Penning, 2018)) přes zástupce popsané teprve nedávno (např. AKR1B15 (Salabei et al., 2011)), až po zástupce prakticky neznámé (např. AKR1E2 (Azuma et al., 2004)). Většina z nich hraje roli v redukci různých sloučenin s ketonovou nebo aldehydovou skupinou (Tab. 2). Výjimku tvoří enzym AKR1D1, katalyzující unikátní 5 $\beta$ -stereospecifickou redukci dvojně vazby na pozici 4 u 3-ketosteroidních sloučenin (např.  $\Delta^4$ -cholesten-7 $\alpha$ -ol-3-on) a pak zástupci AKR6A podrodiny, kteří vůbec nemají enzymovou aktivitu, ale jsou součástí draselného kanálu (Penning, 2015).

Jak již bylo uvedeno, AKR enzymy mají širokou substrátovou specifitu, výčet významnějších substrátů pro lépe popsané lidské AKR enzymy je uveden v Tab. 3. Substrátů bylo ve většině případů popsáno mnohem více, a to zejména při základním výzkumu *in vitro*. Ačkoliv je v tabulce uvedený sloupec „hlavní katalyzovaná reakce“, v některých případech není zcela jisté, zda tomu opravdu tak je. Navíc v různých tkáních se role konkrétních enzymů může lišit. S tím, jak se výzkum jednotlivých forem postupně



zintenzivňuje a rozšiřuje, dochází občas i k modifikaci starších zjištění. Například dlouhodobě je za hlavní pato/fyziologický substrát enzymu AKR1B1 považována glukosa (viz část 1.3.6), ale ukazuje se, že jeho role v metabolismu all-*trans*-retinalu a produktů lipidové peroxidace je neméně důležitá (Ramana, 2011). Vedle účasti na přeměně endogenních sloučenin jako jsou steroidy nebo retinoidy, se AKR enzymy podílí také na biotransformaci cizorodých sloučenin, tedy různých léčiv a karcinogenů (Tab. 3) (Barski et al., 2008; Matsunaga et al., 2006).

Tab. 3: Vybrané významné substráty některých lidských AKR enzymů (Barski et al., 2008; Ma & Cao, 2011; Matsunaga et al., 2006; Penning, 2015; Ramana, 2011; Rižner & Penning, 2014)

AKR	hlavní katalyzovaná reakce	endogenní substráty	xenobiotické substráty
1A1	glyceraldehyd → glycerol	sukcynyl semialdehyd	acetoexamid, doxorubicin
1B1	glukosa → sorbitol	all- <i>trans</i> -retinal, produkty LP (např. 4-HNE)	-
1B10	all- <i>trans</i> -retinal → all- <i>trans</i> -retinol	isoprenylové aldehydy, produkty LP (např. 4-HNE)	doxorubicin, daunorubicin, dolasetron
1C1	progesteron → 20α-OHprogesteron	DHT	naloxon, dolasteron, NNK
1C2	DHT → 3α-Adiol	DHP	naloxon, dolasetron, NNK
1C3	Adion → testosteron estron → estradiol PGH <sub>2</sub> → PGF <sub>2α</sub>	5α-dion, PGD <sub>2</sub>	doxorubicin, daunorubicin, 9,10-PQ
1C4	DHP → allopregnenolon		ketoprofen, NNK
1D1	Δ <sup>4</sup> -Cholesten-3-ony → 5β-cholestan-3-ony	-	-
7A2	sukcynyl semialdehyd → γ-hydroxybutyrát		doxorubicin, daunorubicin, 9,10-PQ
7A3	aflatoxindialdehyd → aflatoxin bis-alkohol	sukcynyl semialdehyd	9,10-PQ

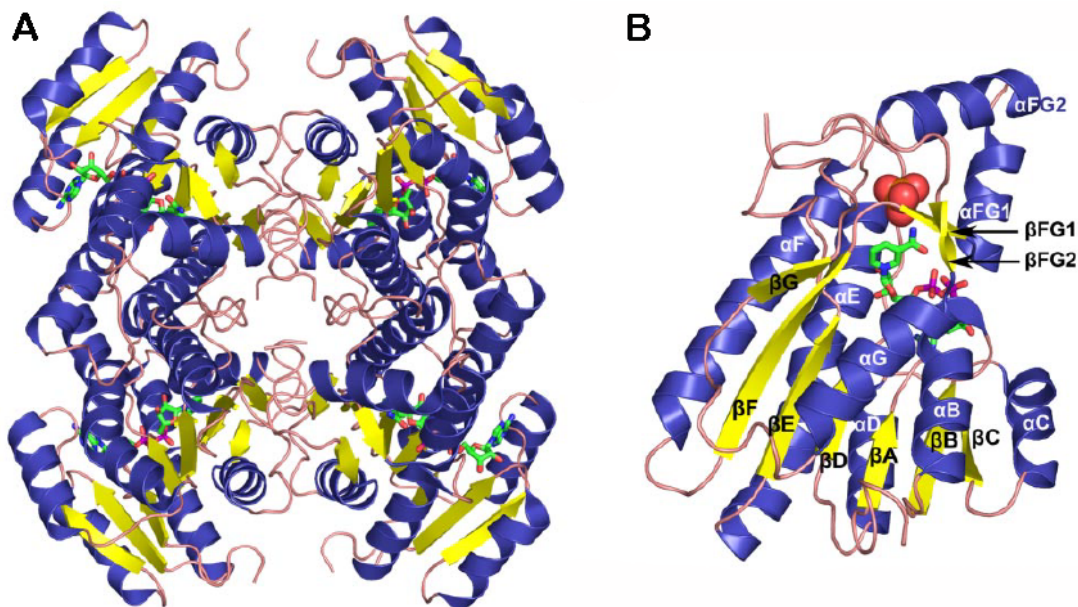
20α-OHprogesteron – 20α-hydroxyprogesteron; 3α-Adiol – 5α-androstan-3α,17β-diol; 4-HNE – 4-hydroxynonenal; 5α-dion – 5α-androstan-3,17-dion; 9,10-PQ – 9,10-fenantrenchinon; Adion – Δ<sup>4</sup>-Androsten-3,17-dion; DHT – 5α-dihydrotestosteron; DHP – 5α-dihydroprogesteron; LP – lipidová peroxidace; NNK – 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; PG – prostaglandin

O tom, jakou skutečnou roli daný enzym v jednotlivých buňkách/tkáních hraje, rozhoduje jeho exprese a funkčnost. Ty jsou významně ovlivněny různými regulačními procesy v buňce. O regulaci exprese AKR genů existuje pouze minimum informací, zatím byla popsána prakticky pouze regulace přes signalizační cestu Nrf2-Keap1. Tato dráha se podílí na odpovědi buněk na elektrofilní nebo oxidační stres (Penning, 2017b). Na druhou stranu produkty reakcí AKR enzymů nebo metabolických drah, do kterých jsou

zapojené (např. kyselina retinová, androgeny, prostaglandiny), jsou ligandy některých jaderných receptorů (např. receptor pro kyselinu retinovou (RAR), androgenní receptor (AR)), které se také podílí na regulačních procesech v buňce, což ještě zvyšuje složitost buněčné odpovědi.

## 1.2 Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR)

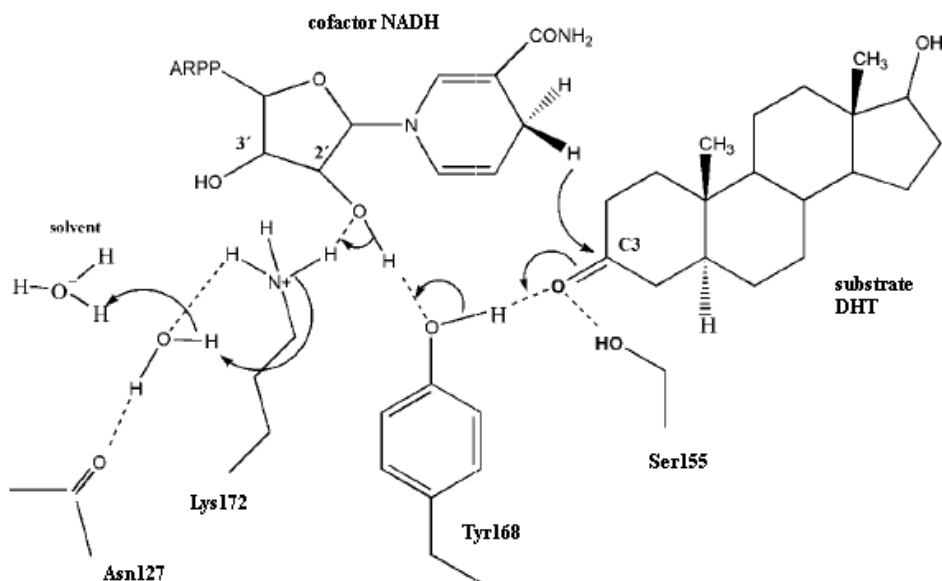
Nadrodina SDR je jedna z největších proteinových nadrodin s více než 700 000 záznamy v databázi Uniprot. Jedná se o velmi heterogenní skupinu proteinů, jejichž zástupci se vyskytují ve všech taxonomických kmenech či odděleních (Jornvall et al., 2015). Skládají se z 250–350 aminokyselin (~ 25–40 kDa), vyskytují se jak ve formě monomerů, tak často i ve formě homodimerů či homotetramerů a jsou lokalizované ve všech buněčných kompartmentech. SDR zástupci spolu sdílí jen cca 20–30 % aminokyselinové sekvence, jde převážně o aminokyseliny důležité pro vazbu kofaktoru a katalytické aminokyseliny. Typická je pro SDR proteiny jejich prostorová struktura obsahující Rossmannův motiv, který se skládá z 6–7 paralelních  $\beta$ -listů obklopených z každé strany třemi  $\alpha$ -helixy. Tato struktura je důležitá pro vazbu kofaktoru NAD(P)(H). SDR proteiny navíc obsahují také variabilní C-terminální část, sloužící zejména pro vazbu substrátu (Obr. 3). V případě zástupců vázaných v membránách je transmembránová doména obvykle lokalizována na N-terminální části (Bray et al., 2009; Kavanagh et al., 2008).



Obr. 3: Krystalová struktura zástupce SDR nadrodiny, DHRS6 s navázaným kofaktorem NAD<sup>+</sup> a síranem. A. tetramerní struktura DHRS6, B. monomerní podjednotka s vyznačeným Rossmannovým motivem ( $\beta$ -listy  $\beta$ A-G a  $\alpha$ -šroubovice  $\alpha$ A-F, zbytek variabilní část) (Guo et al., 2006)

Vzhledem k velkému množství členů a vysoké variabilitě zástupců bylo třeba SDR zástupce klasifikovat. V roce 2009 (Persson & Kallberg, 2013; Persson et al., 2009) byla zavedena nomenklatura na základě aminokyselinové sekvence a SDR byly rozděleny do rodin (značeno číslem) a typů (značeno písmenem), kde jsou pak definované jednotlivé enzymy (číslo). Existují dva hlavní typy – klasické (C) a prodloužené (E) SDR, další jsou spíše minoritní (např. atypické (A), divergentní (D)). Příkladem užití SDR názvosloví je název SDR21C1 pro karbonylreduktasu 1. Nicméně se nové názvosloví zatím zcela nevěžilo a stále se pro jednotlivé enzymy používají i názvy odvozené od názvů genů nebo jejich funkcí.

Většina SDR zástupců má enzymovou aktivitu nebo je alespoň předpokládána. Jde převážně o NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, podílející se často na oxidaci alkoholů či redukcí ketonů a aldehydů. Tyto enzymy patří hlavně mezi klasické SDR. Nicméně je možné v rámci SDR nadrodiny díky velké variabilitě nalézt i funkčně zcela odlišné enzymy jako jsou isomerasy, epimerasy či dehydratasy a proteiny bez enzymové aktivity, které náležejí převážně do méně četných typů SDR (Bhatia et al., 2015). Pro průběh samotné enzymové reakce jsou důležité vysoce konzervované katalyticky aktivní aminokyseliny – Asn, Ser, Tyr, Lys (např. pro lidskou 17 $\beta$ -HSD10 Asn127, Ser155, Tyr168, Lys172). U některých SDR enzymů nejsou přítomné všechny uvedené aminokyseliny, ale vždy je přítomný tyrosin, hlavní katalytická aminokyselina. Dalším důležitým motivem, který je u jednotlivých zástupců SDR také vysoce konzervovaný (byť byla popsána určitá variabilita), je místo bohaté na glycin (ThrGlyxxxGlyxGly, kde x je jakákoliv aminokyselina) lokalizované N-terminálně (např. pro lidskou 17 $\beta$ -HSD10 Thr16, Gly17, Gly21, Gly23). Mechanismus enzymové reakce je sekvenční uspořádaný, první se váže na enzym kofaktor, který také po reakci jako poslední odstupuje (Bray et al., 2009; Filling et al., 2002). Navržený katalytický mechanismus pro SDR enzymy je vysvětlen na Obr. 4.

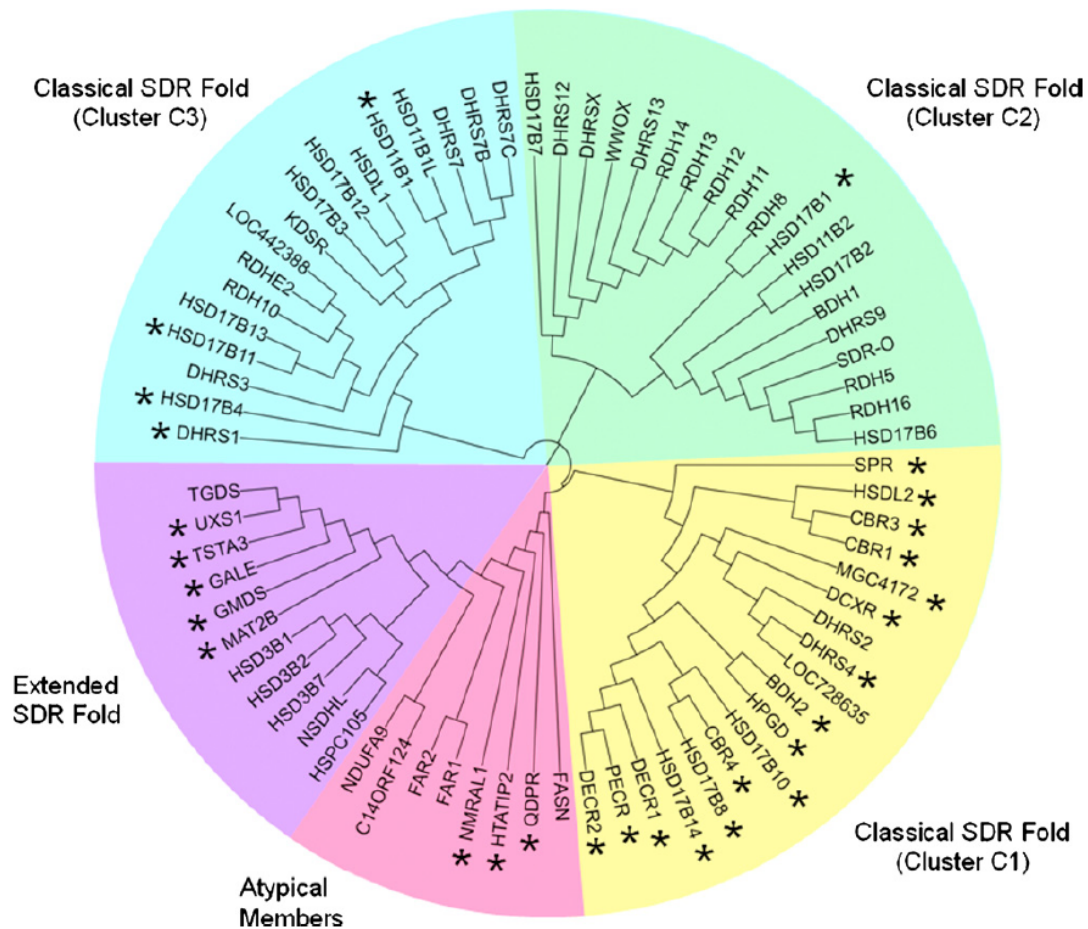


Obr. 4: Navrhovaný katalytický mechanismus SDR enzymů. Hlavní katalytická aminokyselina je tyrosin. Mechanismus pro redukcí substrátu začíná odevzdáním protonu z jeho hydroxyskupiny na substrát, následuje přenos hydridového aniontu z kofaktoru na karbonylový uhlík. Lysin slouží k vazbě kofaktoru v blízkosti substrátu a také snižuje  $pK_a$  tyrosinu, čímž usnadňuje reakci. Serin napomáhá vazbě substrátu v pozici vhodné pro průběh reakce a asparagin je důležitý pro stabilizaci pozice lysinu a usnadňuje také transfer protonu. Číslováno podle lidské 17 $\beta$ -HSD10. Upraveno z (Filling et al., 2002)

Podobně jako AKR enzymy, také SDR enzymy vykazují obecně velmi širokou substrátovou specifitu. Je to jednak dáno tím, že SDR nadrodina obsahuje různé enzymové třídy, ale i v rámci klasického typu SDR enzymů, které katalyzují hlavně redoxní reakce, je paleta substrátů široká. Málomterý SDR enzym katalyzuje přeměnu pouze jednoho substrátu, obvykle přeměňuje několik, často i strukturně velmi odlišných látek. Mezi sloučeniny, které jsou metabolizovány SDR enzymy, patří různé steroidní sloučeniny, retinoidy, prostaglandiny, chinoidní sloučeniny, vybrané sacharidy, produkty peroxidace lipidů,  $\alpha$ -dikarbonylové sloučeniny, sloučeniny s vázaným koenzymem A, strukturně rozmanitá léčiva a další (Hoffmann & Maser, 2007; Oppermann, 2007).

### 1.2.1 Lidské SDR

U člověka se nachází 80 genů kódujících SDR proteiny, z nichž většina patří ke klasickému SDR typu, menší část mezi prodloužené a atypické SDR, jak je zřejmé z Obr. 5. Klasické SDR enzymy se dále dělí do sekvenčních klastrů. Klastr 1 obsahuje cytosolické enzymy se širokou škálou substrátů, zatímco zástupci z klastru 2 a 3 jsou asociovány s membránami a podílí se převážně na přeměně steroidních a retinoidních substrátů. Mezi zástupci prodlouženého typu jsou enzymy jak vázané na membránu, tak cytosolické (Bhatia et al., 2015; Bray et al., 2009). Vzhledem k počtu zástupců není možné se v rámci teoretického úvodu zabývat popisem jednotlivých enzymů, ale vyzdvihnout pouze některé zajímavé členy.



Obr. 5: Lidské SDR rozdělené dle typů (klasické, atypické, prodloužené) a sekvenčních klastrů. Zástupci jsou označeni podle názvů genů dle komise pro nomenklaturu projektu lidského genomu (HGNC). Hvězdička označuje SDR zástupce, u kterých je známá struktura (Bhatia et al., 2015; Bray et al., 2009)

Mezi SDR enzymy patří řada důležitých zástupců, jako je skupina hydroxysteroiddehydrogenas (HSD), které mohou mít různou specifitu vůči hydroxy/ketoskupině na pozici 17, 11, 3 na steroidním jádře (Tab. 4) (Moeller & Adamski, 2009; Shimodaira et al., 2010; Walker & Stewart, 2003). Tyto reakce ovlivňují v řadě případů afinitu steroidních sloučenin k příslušným receptorům, tudíž aktivita HSD významně ovlivňuje fyziologické či patofyziologické děje v organismu (viz sekce 1.3.2).

Tab. 4: Přehled lidských hydroxysteroiddehydrogenas z SDR nadrodiny (Marchais-Oberwinkler et al., 2011; Moeller & Adamski, 2009; Odermatt & Nashev, 2010; Shimodaira et al., 2010)

reakce kofaktor	enzym	lokalizace	hlavní katalyzovaná reakce	další substráty
<b>17<math>\beta</math>-hydroxysteroiddehydrogenasy</b>				
redukce (NADPH)	<b>17<math>\beta</math>-HSD1 (SDR28C1)</b>	cytosol	estron $\rightarrow$ estradiol	Adion
	<b>17<math>\beta</math>-HSD3 (SDR12C2)</b>	ER	Adion $\rightarrow$ testosteron	5 $\alpha$ -dion, estron
	<b>17<math>\beta</math>-HSD7 (SDR37C1)</b>	ER	zymosteron $\rightarrow$ zymosterol	estron
	<b>17<math>\beta</math>-HSD12 (SDR12C2)</b>	ER	estron $\rightarrow$ estradiol	mastné kyseliny (?)
oxidace (NAD <sup>+</sup> )	<b>17<math>\beta</math>-HSD2 (SDR9C2)</b>	cytosol	estradiol $\rightarrow$ estron	testosteron DHT
	<b>17<math>\beta</math>-HSD4 (SDR8C1)</b>	PX	hydroxyacyl-CoA $\rightarrow$ oxoacyl-CoA	estradiol
	<b>17<math>\beta</math>-HSD6 (SDR9C6)</b>	ER	all- <i>trans</i> -retinol $\rightarrow$ all- <i>trans</i> -retinal	estradiol, testosteron
	<b>17<math>\beta</math>-HSD8 (SDR30C1)</b>	mito	estradiol $\rightarrow$ estron	testosteron, DHT, mastné kyseliny (?)
	<b>17<math>\beta</math>-HSD10 (SDR5C1)</b>	mito	hydroxyacyl-CoA $\rightarrow$ oxoacyl-CoA	estradiol, 3 $\alpha$ -Adiol
	<b>17<math>\beta</math>-HSD11 (SDR16C2)</b>	ER/LD	3 $\alpha$ -Adiol $\rightarrow$ androsteron	estradiol, nandrolon
	<b>17<math>\beta</math>-HSD14 (SDR47C1)</b>	cytosol	estradiol $\rightarrow$ estron	testosteron
<b>11<math>\beta</math>-hydroxysteroiddehydrogenasy</b>				
redukce (NADPH)	<b>11<math>\beta</math>-HSD1 (SDR26C1)</b>	ER	kortison $\rightarrow$ kortisol	7-ketocholesterol, metyrapon, NNK
oxidace (NAD <sup>+</sup> )	<b>11<math>\beta</math>-HSD2 (SDR9C3)</b>	ER	kortisol $\rightarrow$ kortison	-
<b>3<math>\beta</math>-hydroxysteroiddehydrogenasy</b>				
oxidace/ isomerace (NAD <sup>+</sup> )	<b>3<math>\beta</math>-HSD1 (SDR11E1)</b>	ER/mito	DHT $\rightarrow$ 3 $\beta$ -Adiol	DHEA, pregnenolon
	<b>3<math>\beta</math>-HSD2 (SDR11E2)</b>	ER/mito	DHT $\rightarrow$ 3 $\beta$ -Adiol	DHEA, pregnenolon
	<b>3<math>\beta</math>-HSD7 (SDR11E3)</b>	ER	7 $\alpha$ -OH-cholesterol $\rightarrow$ 7 $\alpha$ -OH-4-cholesten-3-on	-

3 $\alpha$ -Adiol – 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; 3 $\beta$ -Adiol – 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol;

5 $\alpha$ -dion – 5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion; 7 $\alpha$ -OH-cholesterol – 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol;

Adion –  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion; DHT – 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron; ER – endoplasmatické retikulum;

mito – mitochondrie; LD – lipidové kapénky; DHT – dihydrotestosterone; PX – peroxisomy

Další významnou skupinou jsou retinoldehydrogenasy (RDHs) a příbuzné enzymy, účastníci se přeměn retinoidních sloučenin v oku i v jiných tkáních (Liden & Eriksson, 2006; Parker & Crouch, 2010). V SDR nadrodině se jich nachází celkem 12, patří sem jak dehydrogenasy, tak reduktasy s různou specifitou. Významem vybraných zástupců v lidském organismu se zabývají kapitoly 1.3.1 a 1.3.3. Obecně lze říct, že některé SDR enzymy patří mezi velmi dobře popsané se známým vztahem k pato/fyziologii lidského

organismu (např. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogeanasa 1 (11 $\beta$ -HSD1, SDR26C1) (Odermatt & Klusonova, 2015), viz část 1.3.2 nebo karbonylreduktasa 1 (CBR1, SDR21C1) (Malatkova et al., 2010), viz část 1.3.5). Platí, že lépe prozkoumané jsou cytosolické enzymy z klastru C1, jak je zřejmé i z množství známých struktur (Obr. 5). Naopak funkce jiných zástupců SDR nadrodiny je dosud prakticky neznámá. Některé vlastnosti jsou pouze predikovány a experimentální úroveň jejich studia je velmi nízká, případně žádná (např. DHRS12 (SDR40C1), HSDL2 (SDR13C1)) (Bhatia et al., 2015; Bray et al., 2009). Málo či méně popsání zástupci často patří do sekvenčního klastru 2 a 3. Je pro ně typické, že jde o membránově vázané enzymy, studium takových enzymů je obecně náročnější ve srovnání s cytosolickými proteiny (Bhatia et al., 2015; Seddon et al., 2004).

Pro lidské SDR enzymy existují, podobně jako v případě AKR, pouze omezené znalosti z oblasti jejich regulace i přesto, že tyto procesy mohou významně ovlivňovat jejich funkci v buňkách. Dosud existuje pouze rozsáhlejší *in silico* studie (Ebert et al., 2016) zabývající se vazebnými místy pro vybrané transkripční faktory (např. jaderné receptory) u jednotlivých zástupců a několik úvodních experimentálních studií zabývající se vybranými enzymy (např. CBR1 (SDR21C1), jejichž výsledky jsou poměrně heterogenní (Guo et al., 2014; Miura et al., 2013). Navíc je, stejně jako u AKR enzymů, třeba brát do úvahy i to, že některé produkty SDR enzymů (např. steroidní hormony) ovlivňují přes interakci s jadernými receptory mnoho dějů v buňce.

### 1.3 Význam enzymů AKR a SDR u člověka

Jak už bylo zmíněno v části 1.1.1 či 1.2.1, lidské enzymy z AKR a SDR nadrodin katalyzují přeměny různých sloučenin, často hrající klíčovou roli v důležitých biochemických drahách. Tyto reakce jsou významné z fyziologického hlediska, protože vedou ke vzniku ligandů některých receptorů, což ovlivňuje různé procesy a signalizační dráhy. Například u steroidních hormonů vede redukce karbonylových skupin obecně k vytvoření aktivních forem (např. estron je redukován na estradiol, kortison je redukován na kortisol), zatímco oxidace steroidních alkoholů vede obvykle k přeměně na formy, které neinteragují s příslušnými receptory nebo interagují jen velmi slabě (Anagnostis et al., 2013; Penning & Byrns, 2009). Aktivita AKR a SDR je důležitá také z farmakologického nebo toxikologického úhlu pohledu, protože se podílí na metabolismu léčiv, karcinogenů a dalších xenobiotik a produktů oxidačního stresu (Barski et al., 2008; Matsunaga et al., 2006).

Vedle toho bylo popsáno, že alespoň určité AKR a SDR enzymy patří mezi tzv. multifunkční (moonlighting) proteiny (Copley, 2003), které mají mimo enzymatické aktivity ještě další, zcela odlišnou funkci. Příkladem může být enzym DXCR (SDR20C1) z nadrodiny SDR, který se mimo redukce L-xylulose na L-xylitol v cyklu kyseliny uronové účastní svou neenzymovou funkcí v maturaci spermií (Ebert et al., 2015). Enzym 17 $\beta$ -HSD10 (SDR5C1) katalyzuje přeměnu řady odlišných substrátů jako je estradiol či 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA, meziprodukt degradace isoleucinu. Vedle toho je součástí komplexu mitochondriální RNasy P, který je důležitý pro maturaci tRNA (Falk et al., 2016).

Ať už příspěvkem jakékoliv funkce, enzymatické nebo neenzymatické, mnoho enzymů z nadrodin AKR a SDR se podílí na širokém spektru významných procesů v buňkách, které při deregulaci mohou připívat k rozvoji závažných onemocnění. Z tohoto důvodu jsou někteří zástupci AKR a SDR nadrodin považováni z medicínského hlediska za významné. Obvykle hrají roli v rozvoji multifaktoriálních onemocnění (např. různé typy nádorových onemocnění), kde svým působením přispívají do celkového stavu onemocnění. Proto jsou i v následujících kapitolách obsaženy pouze základní teze o funkci vybraných AKR a SDR enzymů a jejich možné role v rozvoji některých onemocnění. Navíc v řadě případů je třeba míru jejich zapojení ještě lépe prostudovat. Vedle toho existují i méně popsané enzymy zejména z nadrodiny SDR, které na popis svého medicínského významu čekají.

### 1.3.1 Role v geneticky podmíněných onemocněních

Někteří zástupci AKR a SDR nadrodin mají zcela nezastupitelnou funkci v buněčných procesech, tudíž jejich vrozené mutace, které vedou k ovlivnění jejich funkce, mohou vést ke vzniku různě závažných monogenních genetických onemocnění. Tato onemocnění lze spolu s poškozenými geny dohledat v databázi OMIM (Online Mendelian inheritance in man, [www.omim.org](http://www.omim.org), (Amberger et al., 2015)). Všechna dosud popsaná geneticky podmíněná onemocnění, která jsou spojená s AKR nebo SDR enzymy jsou uvedena v Tab. 5.

Tab. 5: Přehled geneticky podmíněných onemocnění spojených s AKR nebo SDR enzymy (Bhatia et al., 2015).

gen (dle HGNC)	název dle nomenklatury	onemocnění	typ dědičnosti
<b>AKR1C2</b>	AKR1C2	Gonadální dysgeneze, 46XY, typ 8	AtR
<b>AKR1C4</b>	AKR1C4	Gonadální dysgeneze, 46XY, typ 8	AtR
<b>AKR1D1</b>	AKR1D1	5 $\beta$ -reduktasová deficiencie, defekt syntézy žlučových kyselin	AtR
<b>DCXR</b>	SDR20C1	Pentosurie	AtR
<b>DECRI</b>	SDR18C1	Reduktasová deficiencie	AtR
<b>GALE</b>	SDR1E1	Galaktosemie	AtR
<b>HPGD</b>	SDR36C1	Osteoartropatie, hypertrofní osteoartropatie	AtR
<b>HSD3B2</b>	SDR11E2	Adrenální hyperplasie (3 $\beta$ -HSD2 deficiencie)	AtR
<b>HSD3B7</b>	SDR11E3	Neonatální cholestáza	AtR
<b>HSD11B1</b>	SDR26C1	Kortison reduktasová deficiencie (CDC)	AtD
<b>HSD11B2</b>	SDR9C1	Zdánlivý přebytek mineralokortikoidů (AME)	AtR
<b>HSD17B3</b>	SDR12C2	Mužský pseudohermafroditismus s gynekomastií	AtR
<b>HSD17B4</b>	SDR8C1	Perraultův syndrom	AtR
<b>HSD17B10</b>	SDR5C1	MHBD deficiencie	XLD
<b>KDSR</b>	SDR35C1	Erytrokeratodermie	AtR
<b>NSDHL</b>	SDR31E1	CHILD syndrom, CK syndrom	XLD
<b>RDH5</b>	SDR9C5	Fundus albipunctatus	AtR, AtD
<b>RDH12</b>	SDR7C2	Leberova kongenitální amaurosa 13	AtR
<b>SPR</b>	SDR38C1	Dopa responsivní dystonie	?
<b>WVOX</b>	SDR41C1	Epileptická encefalopatie, spinocerebrální ataxie	AtR

AtD – autosomálně dominantní, AtR – autosomálně recesivní, XLD – dominantní vázána na chromozom X

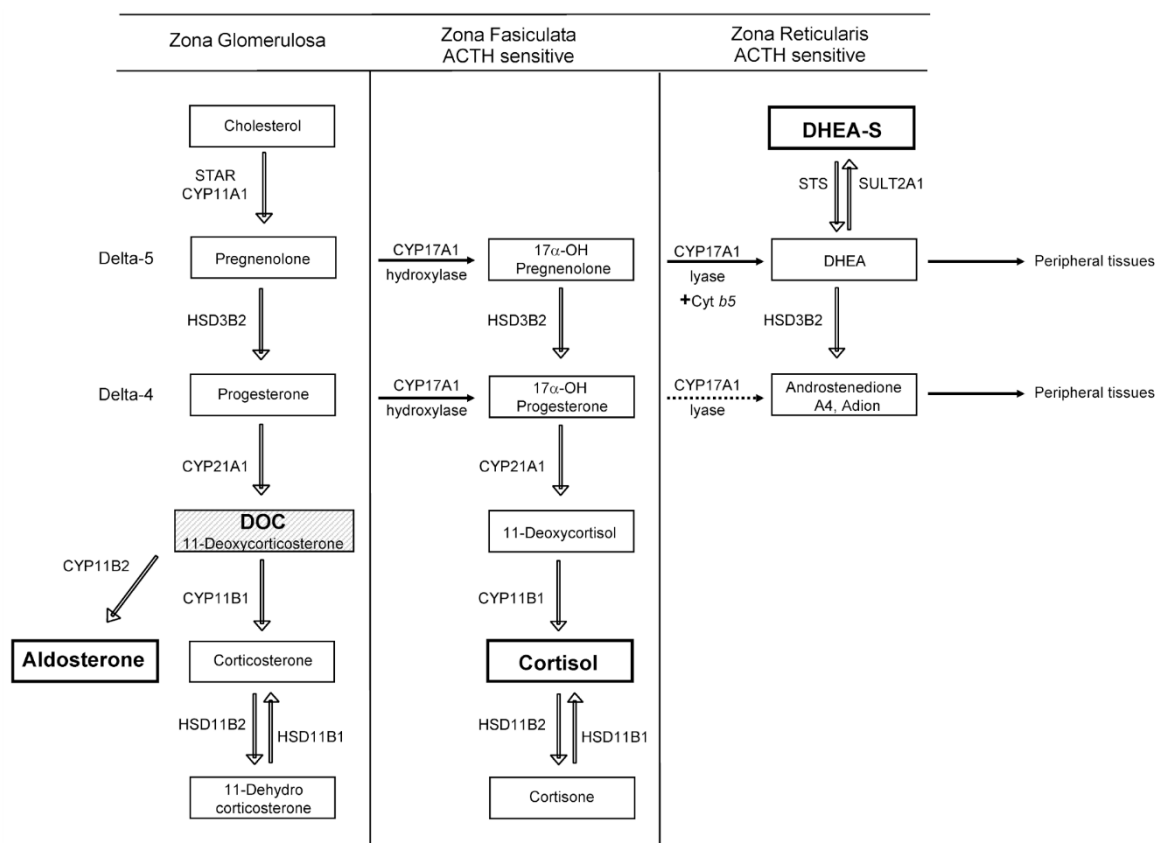


Jde o vzácná, často závažná onemocnění, která jsou spojena s defekty v syntéze steroidů, a z toho pramenící problémy s vývojem pohlavních orgánů/znaků (gonadální dysgeneze, Perraultův syndrom, mužský pseudohermafroditismus...), metabolismem žlučových kyselin (5 $\beta$ -reduktasová deficience, neonatální cholestasa) či kortikoidů (CDC, AME). Dále jsou s SDR enzymy spojena onemocnění oka (fundus albipunctatus a Leberova kongenitální amaurosa), která vedou k noční nebo úplné slepotě, a také mentální poruchy jako je CK syndrom nebo MHBD deficience. Paleta chorob je poměrně široká, u některých se vyskytuje genetická heterogenita (např. fundus albipunctatus, Perraultův syndrom), přesto v určitých případech přiřazení poruchy k mutaci v konkrétním genu pomohlo surčením role enzymu v organismu. Například bylo zjištěno, že AKR1C2 a AKR1C4 jsou významně exprimovány ve tkáních plodu a hrají důležitou roli ve vývoji mužských pohlavních orgánů přes alternativní, tzv. backdoor syntézu DHT (Rižner & Penning, 2014).

Vedle těchto zřejmých spojení mezi AKR a SDR enzymy a vrozenými onemocněními, existují i zajímavé informace o knock-out myších pro vybrané méně popsané enzymy z nadrodiny SDR. Například homozygotní knock-out myši pro gen *dhrs3* nejsou životaschopné a umírají v pozdních stádiích březosti s vývojovými vadami srdce, svalů a patra. Ty jsou zřejmě způsobené díky změnám v metabolismu kyseliny all-*trans*-retinové (Billings et al., 2013), což vzhledem k vysoké sekvenční shodě s lidskou formou (95 %) může ukazovat i na podobnou, významnou roli u člověka. Dalším podobným příkladem je enzym DHRS7B, u homozygotní knock-out myši pro gen *dhrs7b* se také projevuje embryonální letalita, u několika přeživších jedinců byly popsány významné hmotnostní úbytky a zvýšené hnědnutí podkožní tukové tkáně (Lodhi et al., 2017)

### **1.3.2 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu steroidů a onemocněních spojených s jejich deregulací**

Jak už bylo uvedeno (sekce 1.1.1 a 1.2.1), řada enzymů z AKR a SDR nadrodin se účastní metabolismu steroidních sloučenin, a to jak v endokrinních, tak periferních tkáních. Vzhledem k tomu, že tyto reakce často ovlivňují afinitu steroidních sloučenin k příslušným receptorům, jde o klíčové reakce. Hlavním místem syntézy prekurzorů steroidních hormonů (zejména dehydroepiandrosteron (DHEA) a Adion) a vybraných hormonů (zejména kortikoidy) jsou nadledviny a společným prekurzorem je cholesterol (Obr. 6).

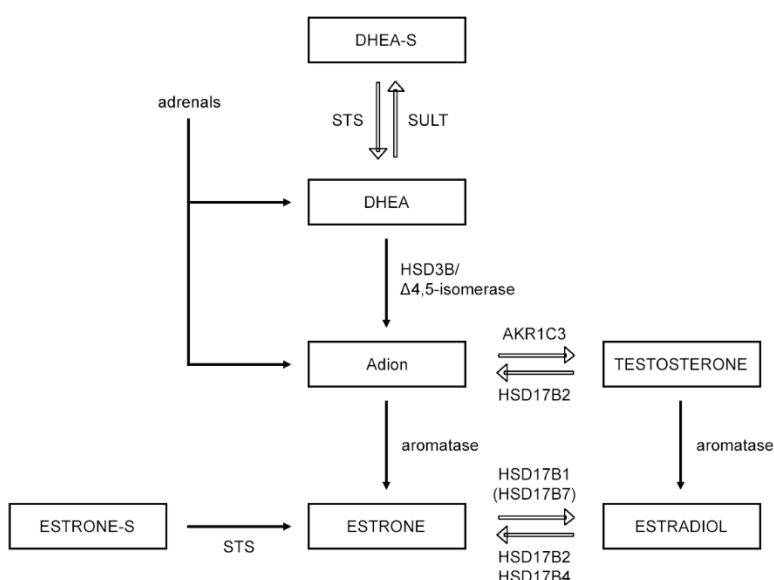


Obr. 6: Syntéza prekurzorů steroidních hormonů a vybraných hormonů v nadledvinách. Metabolismu se účastní vybrané enzymy ze skupiny cytochromů P450 (CYP) a hydroxysteroiddehydrogenas (HSD). Upraveno dle (Mostaghel, 2014)

Prekurzory DHEA a Adion jsou sekretovány do krve, a dále jsou přeměňovány v endokrinních žlázách (vaječníky, Leydigovy buňky) a periferních tkáních na finální pohlavní hormony. Jen malé množství testosteronu se tvoří v nadledvinách. Přímou v nadledvinách jsou syntetizovány kortikoidy: mineralokortikoid aldosteron a také glukokortikoidy kortisol a jeho inaktivní prekurzor kortison (Mostaghel, 2014). Hlavní roli v regulaci interakce kortisolu s glukokortikoidním receptorem (GR) v cílových tkáních hrají enzymy 11 $\beta$ -HSD1 a 11 $\beta$ -HSD2 (viz Tab. 4). 11 $\beta$ -HSD2 inaktivuje kortisol na kortison ve tkáních jako jsou ledviny či tlusté střevo, a tím brání nadměrné aktivaci mineralokortikoidního receptoru kortizolem. Enzym 11 $\beta$ -HSD1 se účastní produkce kortisolu z kortisonu v tkáních jako jsou játra či tuková tkáň, kde pak dochází k jeho interakci s GR. Vysoká hladina kortisolu v uvedených tkáních je spojována s rozvojem inzulínové rezistence (Geer et al., 2014). Ta se spolupodílí na rozvoji metabolického syndromu, který vede k vysokému riziku kardiovaskulárních onemocnění. Celá řada studií na pacientech poukázala na fakt, že zvýšená exprese a aktivita 11 $\beta$ -HSD1 je zapojena do patogeneze inzulínové rezistence, obezity, a tedy i metabolického syndromu. Proto je inhibice 11 $\beta$ -HSD1 považována za nový terapeutický přístup k léčbě těchto obtíží (Anagnostis et al., 2013; Morton, 2010). Dosud bylo syntetizováno velké množství různých inhibitorů 11 $\beta$ -HSD1, z nichž některé byly klinicky testovány ve fázi II pro léčbu diabetes mellitus typu 2. Ačkoliv byly bezpečné a netoxické, jejich účinek

byl heterogenní. Proto snaha o nalezení silného a specifického inhibitoru 11 $\beta$ -HSD1, vhodného kléčbě stavů spojených s vysokou hladinou kortisolu, stále pokračuje (Anderson & Walker, 2013).

Další steroidní hormony, na jejichž syntéze se účastní AKR a SDR enzymy, jsou estrogény. Tyto enzymy katalyzují přeměnu inaktivní formy estronu a aktivní formy estradiolu nejen ve vaječnících, ale podílí se i na jejich tzv. intrakrinní produkci, což je syntéza hormonů z prekurzorů přímo v periferních tkáních (Labrie et al., 2000). Tato lokální syntéza má důležitou roli zejména u žen po menopauze. Vedle fyziologické role estrogenů v organismu je dnes již dobře zdokumentována také jejich role v rozvoji a progresi hormon-dependentních nádorů prsu (Africander & Storbeck, 2018; Nagasaki et al., 2009). Proto enzymy, podílející se na produkci estradiolu v prsní tkáni (Obr. 7), mohou hrát důležitou roli v rozvoji uvedených nádorů, pokud dojde ke zvýšení jejich exprese či aktivity.

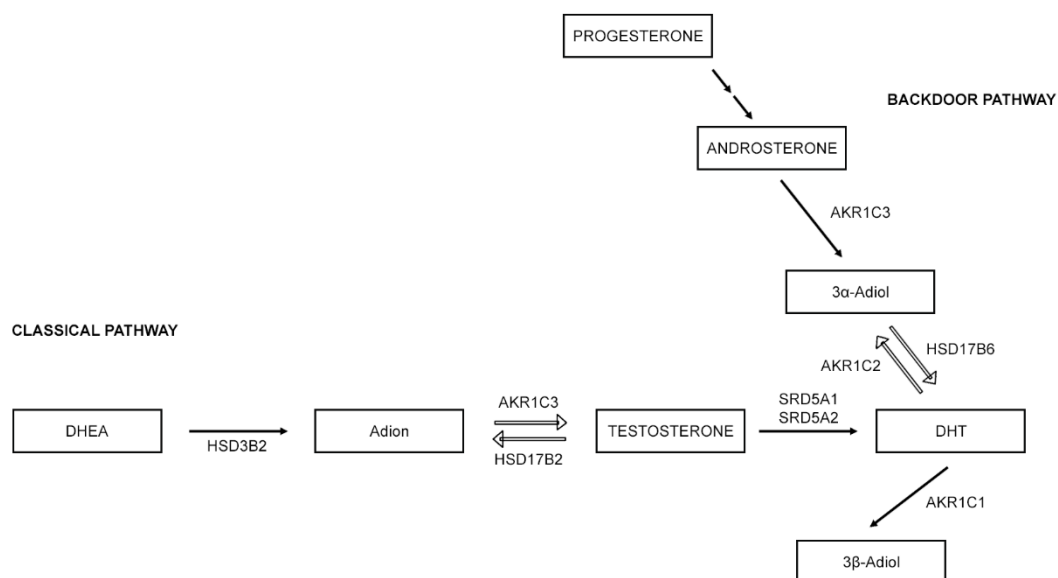


Obr. 7: Intrakrinní produkce estradiolu v prsní tkáni z prekurzorů DHEA a Adion.  
Upraveno z (McNamara & Sasano, 2015). STS – steroidsulfatasa, SULT – sulfotransferasa

Za hlavní enzym přeměňující estron na estradiol je považován 17 $\beta$ -HSD1. V poslední době se však spekuluje i o účasti dalších enzymů jako je 17 $\beta$ -HSD7 (Nagasaki et al., 2009; Wang et al., 2015). Ke zvýšené hladině estradiolu v nádorové prsní tkáni mohou přispívat i enzymy jako jsou AKR1C3, aromatasa a steroidsulfatasa (STS). Vedle aromatasy, která se dnes již využívá k farmakologické intervenci (např. cíl pro léčivo exemestan), jsou i tyto další enzymy uvažovány jako možné cíle pro léčbu nádoru prsu. Jejich inhibice by mohla vést ke snížení lokální hladiny estradiolu podobně jako v případě aromatasy. Úroveň znalostí v této oblasti není však zatím dostatečně vysoká, je zkoumán například vliv dalších steroidních sloučenin a různých regulačních procesů v nádoru prsu (Africander & Storbeck, 2018; Wang et al., 2015). V klinické studii fáze II

byl testován pro léčbu tohoto onemocnění inhibitor STS STX64 bez přesvědčivějších výsledků, uvažuje se ale jeho použití v kombinaci s dalšími léčivy. Vzhledem k účasti na metabolismu DHT, který zřejmě také hraje v nádoru prsu důležitou roli, se uvažuje o inhibitech 17 $\beta$ -HSD7 (Sang et al., 2018). Další z onemocnění, kde hrají roli ženské pohlavní hormony, je například endometrióza. U té byla studována role enzymů ze skupiny AKR, a bylo poukázáno na to, že zvýšená exprese AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C3 by mohla přispívat k rozvoji onemocnění zřejmě kvůli účasti na degradaci progesteronu, mající jinak protektivní vliv (Hevir et al., 2011).

Další intenzivně zkoumanou oblastí je zapojení uvedených enzymů do metabolismu mužských pohlavních hormonů. Hlavním androgenem, který je produkován v Leydigových buňkách varlat z prekursorů pocházejících z nadledvin, je testosteron. Ten je pak v cílových tkáních přeměňován 5 $\alpha$ -reduktasou na aktivnější DHT, který je ligandem androgenního receptoru (AR). Na produkci testosteronu ve varlatech klasickou cestou z Adionu se podílí enzym 17 $\beta$ -HSD3. To je ilustrováno i s jeho spojitostí s vrozeným pseudohermafoditismem (viz sekce 1.3.1). Předpokládá se, že v období vývoje plodu je důležitá i alternativní, tzv. backdoor cesta, kdy je DHT tvořen bez testosteronu, z 3 $\alpha$ -Adiolu, který vzniká z progesteronu. V této cestě se uplatňují enzymy AKR1C2 a C4 (viz také sekce 1.3.1). Uvedené metabolické dráhy jsou důležité i pro tzv. intrakrinní produkci androgenů v periferních tkáních, například v prostatě. Při poruše homeostázy může dojít k rozvoji nádoru prostaty. Ten je většinou hormon-dependentní a intrakrinní produkce androgenů má významný podíl zejména na rozvoji tzv. kastračně rezistentního nádoru prostaty (CRPC). Několik studií prokázalo, že u tohoto typu nádorů má z enzymů podílejících se na metabolismu androgenů nejvíce zvýšenou expresi AKR1C3. Vzhledem k tomu, že se uplatňuje, jak v klasické, tak alternativní, tzv. backdoor syntéze androgenů (Obr. 8), je považován za nadějný cíl pro léčbu CRPC.



Obr. 8: Intrakrinní syntéza androgenů v prostatě klasickou a alternativní tzv. backdoor cestou.  
Upraveno z (Rižner & Penning, 2014)

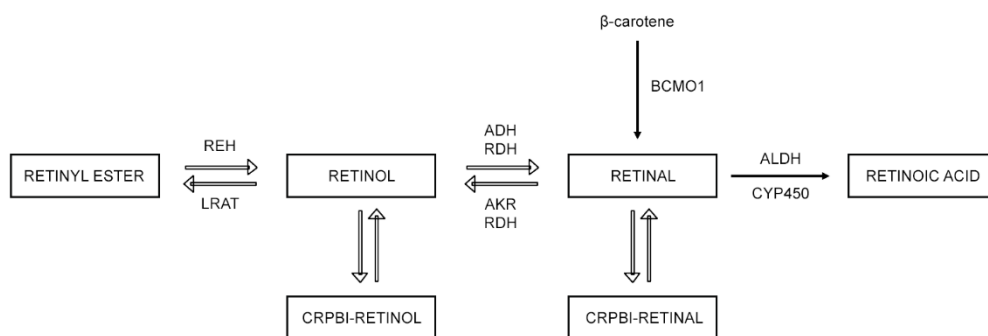
Aktuálně je testován inhibitor AKR1C3, nesteroidní antiflogistikum indometacin, v klinické studii Ib/II v kombinaci s enzalutamidem, antagonistou androgenního receptoru (Pan et al., 2018). U inhibitorů AKR1C3 je obecně problém se selektivitou, protože enzymy AKR1C1 a AKR1C2 s ním sdílí více než 86 % aminokyselinové sekvence, a ty není vhodné inhibovat vzhledem k jejich účasti na deaktivaci DHT na 3 $\alpha$ - či 3 $\beta$ -Adiol.

Vzhledem k tomu, že pohlavní steroidní hormony vznikají ve tkáních za účasti několika enzymů a jejich deregulace je jedním z mechanismů vzniku hormon-dependentních nádorů, mohou tyto enzymy sloužit jako cíle pro léčbu. Ideálním přístupem je zřejmě kombinace inhibitorů, které zasáhnou více participujících enzymů (Sang et al., 2018). Vzhledem k poměrně intenzivnímu výzkumu v této oblasti se mohou objevit i nové cíle pro léčbu uvedených nádorů, protože i v současné době jsou popisovány nové lidské enzymy, které se podílí na metabolismu steroidů, alespoň *in vitro*, jako je DHRS7, DHRS1 (viz část 2.3), DHRS11 (Endo et al., 2016), AKR1B15 (Weber et al., 2015) a jen další výzkum ukáže jejich roli *in vivo*.

### **1.3.3 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu retinoidů a onemocněních spojených s jejich deregulací**

Tradiční role retinoidů je spojována s procesem vidění. Chromatoforem zrakového pigmentu rodopsinu, který je lokalizován ve vnějším segmentu fotorceptoru, je 11-*cis*-retinal. Po dopadu světla dochází k jeho izomerizaci na all-*trans*-retinal a přenosu signálu do mozku. Ve fotorceptoru a částečně v epitelových buňkách pak následuje několik reakcí, při nichž dochází k zpětné regeneraci all-*trans*-retinalu na 11-*cis*-retinal. Potřebné redoxní reakce jsou katalyzované enzymy ze skupiny RDH z nadrodiny SDR (Tsin et al., 2018). Ačkoliv výzkum RDH v oku je zřejmě nejintenzivnější, na identitě účastníků se enzymů nepanuje zcela shoda. Je zřejmé, že se určitě účastní enzymy RDH5 a RDH12, protože jejich mutace jsou spojené s vrozenými chorobami oka (viz sekce 3.1.1). Dalšími popsány enzymy účastníky se přeměn retinoidů v oku jsou například RDH8 (SDR28C2) nebo RDH11 (SDR7C1) (Parker & Crouch, 2010; Tsin et al., 2018).

RDH se v organismu účastní i pochodů mimo oko. Za biologicky aktivní formu vitamínu A je považovaná kyselina retinová (all-*trans* a 9-*cis*), která je významná v procesech diferenciaci, morfogeneze, reprodukce atd. Její hladina v organismu je velmi pečlivě udržována, protože změny v koncentraci mohou vést k rozvoji patofyziologických procesů a případně k onemocnění, jako jsou některá nádorová onemocnění, obezita či diabetes mellitus (Das et al., 2014; Fields et al., 2007). Prekurzory kyseliny retinové v potravě jsou retinylestery a  $\beta$ -karoteny. Zásoby jsou uloženy v játrech ve formě retinylesterů, které jsou v případě potřeby hydrolyzovány na retinol. Ten je dopraven do tkání, kde je potřeba, a pomocí dvou reakcí je z něj syntetizována kyselina retinová (Obr. 9).



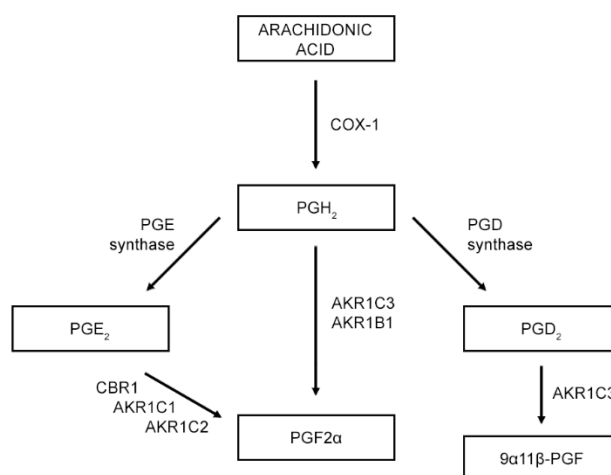
Obr. 9: Syntéza kyseliny retinové ve tkáních. Přeměna retinolu a retinalu je vratný děj, zatímco syntéza kyseliny retinové z retinalu je reakce nevratná. BCMO1 – β-karotenmonooxygenasa 1, LRAT – lecitin-retinolacyltransferasa, REH – retinylesterhydrolasa. Upraveno z (Porte et al., 2013)

Tradičně byly jako enzymy podílející se na oxidaci retinolu uváděny cytosolické alkoholdehydrogenasy (ADH) ADH1 nebo ADH4. Nicméně se dnes zdá, že jejich role je významná pouze za podmínek nadbytku vitamínu A. Důležitější jsou zřejmě enzymy ze skupiny RDH z SDR nadrodiny lokalizované v endoplasmatickém retikulu. Jde o skupinu 12 enzymů s různou tkáňovou expresí a substrátovou specifitou (9-*cis*/11-*cis*/*trans*). Některé z nich katalyzují také redukční reakce a redukují retinal zpět na retinol (např. RDH11) (Liden & Eriksson, 2006). Této reakce se mohou účastnit i enzymy z AKR nadrodiny, s vysokou účinností ji katalyzuje *in vitro* třeba AKR1B10 (Ruiz et al., 2012). Retinal může být také oxidován na finální produkt – kyselinu retinovou, která je ligandem RAR nebo RXR receptoru. Ačkoliv *in vitro* byla popsána aktivita celé řady enzymů k různým formám retinolu či retinalu, v buňce je situace komplikovanější, protože tyto vysoce lipofilní sloučeniny jsou vázány na vazebné proteiny pro retinoidy (CRBPI), což významně ovlivňuje aktivitu enzymů. Dosud není zcela jasné, které konkrétní enzymy jsou v buňkách zodpovědné za biosyntézu kyseliny retinové. To závisí na expresi jednotlivých enzymů v konkrétních buňkách/tkáních i na čase (vývoj/dospělost). RDH10 a DHRS3 jsou aktuálně považovány za hlavní retinoldehydrogenasy pro reverzibilní reakci mezi retinalem a retinolem během embryogeneze, což bylo prokázáno u myši. To, které enzymy jsou důležité fyziologicky během dospělosti nebo při rozvoji patologických stavů, není zcela známo a je dále intenzivně zkoumáno (Kedishvili, 2013; Kedishvili 2016).

### 1.3.4 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu prostaglandinů a onemocnění spojených s jejich deregulací

Prostaglandiny (PG) jsou biologicky aktivní sloučeniny, které mají v organismu mnoho funkcí. Podílí se na řadě fyziologických procesů v mnoha orgánech jako jsou reprodukční či endokrinní a systém kardiovaskulární, dýchací a nervový. Prekurzorem prostaglandinů, a také příbuzných leukotrienů a tromboxanů, je kyselina arachidonová. Enzymy z nadrodiny AKR a SDR, konkrétně AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1B1 a CBR1 (SDR21C1) katalyzují přeměnu různých PG na PFG<sub>2α</sub> eventuálně 9α,11β-PFG<sub>2α</sub>, které mají afinitu k receptoru pro prostaglandin F (FP) (Obr. 10). PFG<sub>2α</sub> a PGE<sub>2</sub> jsou hlavními

prostaglandiny v endometriu či před ovulací ve vaječnicích a fyziologicky se významně podílí na regulaci dějů důležitých pro reprodukci a porod. Hlavní enzymy podílející se na tvorbě PFG<sub>2α</sub> v endometriu jsou AKR1C3 a AKR1B1, zatímco ve vaječnicích AKR1C1 a AKR1C2 (Bresson et al., 2011; Dozier et al., 2008). U CBR1 bylo také popsáno, že je schopna katalyzovat oxidaci PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> a PFG<sub>2α</sub> na 15-hydroxyprodukty, které jsou považovány za inaktivní. Další enzymem podílejícím se na inaktivaci PGE<sub>2</sub> je 15-PGDH (SDR36C1) (Niesen et al., 2010).



Obr. 10: Syntéza prostaglandinu z kyseliny arachidonové. COX-1 - cyklooxygenasa 1.  
Upraveno z (Barski et al., 2008)

Vzhledem k tomu, že PFG<sub>2α</sub> a FP se vyskytují i v mnoha jiných tkáních a podílí se na regulaci kontrakce hladkých svalů bronchů, cév a žil, na regulaci renální filtrace a dalších dějů, mohou se AKR a SDR enzymy, které je metabolizují, podílet také na rozvoji i dalších patofyziologických stavů, jako jsou např. kardiovaskulární onemocnění (Zhang et al., 2010). Nicméně obvykle jde o složité mechanismy vzniku, u nichž nebyl většinou podíl uvedených enzymů dosud stanoven.

### 1.3.5 Role AKR a SDR v biotransformaci xenobiotik

Tradičně se biotransformace léčiv a dalších xenobiotik rozděluje na dvě fáze, jejichž cílem je převést xenobiotikum do takové formy, kterou lze snadno vyloučit z organismu. V první fázi dochází k tzv. funkcionalizaci, která vede ke zvýšení polarity léčiva. V druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci s látkami, jako je kyselina glukuronová, sírová či další sloučeniny, které dále zvyšují polaritu sloučeniny (Nassar et al., 2009). Za hlavní enzymy účastníci se I. fáze biotransformace léčiv jsou považovány cytochromy P450 (CYP), které katalyzují zejména oxidační reakce. Řada léčiv obsahuje funkční skupiny, které je třeba během I. fáze biotransformace redukovat – např. aldehydové, ketononové či chinonové skupiny. Ty jsou také často zodpovědné za biologickou aktivitu léčiva, tudíž její redukce může mít různé důsledky. Obvykle dochází k deaktivaci xenobiotika (např. u doxorubicinu či daunorubicinu (Edwardson et al., 2015)), ale může dojít i k zachování

nebo jen k částečnému snížení biologické aktivity (např. naltrexon (Breyer-Pfaff & Nill, 2004), metyrapon (Hoffmann & Maser, 2007)) nebo naopak ke zvýšení biologické aktivity (např. dolasetron (Breyer-Pfaff & Nill, 2004)). V některých případech je redukce karbonylových skupin hlavní metabolickou drahou xenobiotika (např. acetoexamid (Imamura et al., 2001), ketotifen (Breyer-Pfaff & Nill, 2000), flubendazol (Raisová Stuchlíková et al., 2018)) nebo jednou z několika různých metabolických cest, kterým xenobiotikum podléhá (např. boceprevir (Ghosal et al., 2011), tolperison (Quasthoff et al., 2008), které jsou navíc také oxidovány).

Mezi klasické biotransformační enzymy podílející se na redukci karbonylových sloučenin, je považována hlavně cytosolická CBR1 (Malatkova et al., 2010) a mikrosomální 11 $\beta$ -HSD1 (Odermatt & Nashev, 2010). Ale u řady xenobiotik byla prokázána i účast dalších enzymů z AKR a SDR nadrodin např. CBR3 (SDR21C1), DHRS4 (SDR25C2), AKR1B10, AKR1C4, AKR7A2 atd. (Matsunaga et al., 2006; Oppermann, 2007). Biotransformace léčiv může významně ovlivňovat účinnost léčby, jak bylo naznačeno výše, a může být také významná z hlediska toxikologického. Příkladem je redukce protinádorového léčiva doxorubicinu (DOX) na metabolit doxorubicinol (DOXOL), při které dochází k jeho deaktivaci. Této reakce se účastní enzymy CBR1 v játrech a AKR1C3, AKR1B10, AKR7A2 v dalších tkáních (Kassner et al., 2008). Tento mechanismus může přispívat k rozvoji rezistence nádorů k léčbě DOX a navíc DOXOL má zřejmé kardiotoxické účinky, které se obvykle projeví až po mnoha letech od léčby DOX. Inhibitory výše uvedených enzymů se uvažují jako léčiva do kombinace, která by mohla zvyšovat terapeutickou efektivitu DOX a snižovat akumulaci DOXOL v srdci (Edwardson et al., 2015).

Na druhou stranu redukce ketonové skupiny může mít i protektivní efekt. Karcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonu (NNK) z tabákového kouře je třeba v organismu aktivovat pomocí  $\alpha$ -hydroxylace katalyzované CYP450 a pak může přispívat ke vzniku nádorů plic nebo pankreatu. Ale NNK je v organismu také redukováno pomocí enzymů z nadrodin AKR a SDR, což vede ke vzniku metabolitu NNAL, který dále podléhá glukuronidaci a je vyloučen z organismu. Vznik NNAL jsou schopné katalyzovat všechny výše uvedené biotransformační enzymy a nově byla popsána také 17 $\beta$ -HSD12, jako hlavní enzym podílející se na této reakci v plicích (Ashmore et al., 2018; Stepanov et al., 2008; Ter-Minassian et al., 2011)). Dalším příkladem může být detoxikace aflatoxinu B<sub>1</sub>, na které se podílí enzym AKR7A3, a tak pomáhá chránit buňky před jeho cytotoxickým účinkem (Bodreddigari et al., 2008).

Jak je zřejmé i z informací o biotransformaci NNK, v poslední době se mimo „klasických“ biotransformačních reductas karbonylových sloučenin objevují i další enzymy, kterých dosud účast v metabolismu xenobiotik nebyla připisována, jako je uvedená 17 $\beta$ -HSD12 (Ashmore et al., 2018) nebo DHRS11 (Endo et al., 2016). Další enzymy, u kterých byl zatím podíl na metabolismu xenobiotik popsán *in vitro* jsou uvedené i v sekci 2.3.



### **1.3.6 Role AKR a SDR enzymů v metabolismu sacharidů a s ním spojených onemocnění**

Několik AKR a SDR enzymů se účastní také metabolismu sacharidů, a ty patří mezi nejdéle popsané zástupce. Protein s reduktasovou aktivitou vůči glukose byl identifikován už v roce 1956, dnes se ví, že se jedná o enzym AKR1B1. Tento enzym redukuje glukosu na sorbitol v polyolové metabolické dráze, a to zejména za podmínek vysoké hladiny glukosy při onemocnění diabetes mellitus (Barski et al., 2008). AKR1B1 je spojována s rozvojem diabetických komplikací jako je mikrovaskulární poškození sítnice, nervů a ledvin. Tyto potíže byly původně připisovány vysoké hladině vzniklého sorbitolu. Ten neprochází buněčnou membránou, je osmoticky aktivní a vede k osmotickému stresu buňky. Dnes se uvažuje i o jiných mechanismech, nicméně i v nich se zdá být role AKR1B1 důležitá (Ramana, 2011), protože klinicky používaná léčiva pro léčbu diabetických komplikací, jako je tolrestat, zopolrestat nebo ranirestat, jsou inhibitory AKR1B1. Vzhledem k tomu, že se uvažuje i o roli AKR1B1 v jiných patologických stavech, například v rozvoji vybraných nádorových onemocnění, jsou uvedená léčiva testována i v těchto případech (Wu et al., 2017).

Další SDR enzym, který se podílí na metabolismu sacharidů, je DXCR (SDR20C1), podílející se na redukcí L-xylulose na L-xylitol, což je reakce metabolické dráhy kyseliny uronové, která využívá asi 5 % glukosy. Díky této reakci se předpokládá, že DXCR je spojen s reabsorbí vody v ledvinách, čímž chrání organismus před osmotickým stresem. Mutace v DXCR vede k pentosurii (viz část 1.3.1). Onemocnění (např. mužská neplodnost), s kterými je DXCR také spojen, pramení spíše z jeho neenzymových funkcí v organismu. Vedle xylulose DXCR katalyzuje i redukcí reaktivních a toxických karbonylových sloučenin jako je například metylglyoxal, a také katalyzuje jednoelektronovou redukcí chinonů, která vede ke vzniku redoxních cyklů (Ebert et al., 2015; Yang et al., 2017). Enzym GALE (SDR1E1) katalyzuje epimerasovou reakci UDP-galaktosy na UDP-glukosu, což je důležitá reakce v metabolismu galaktosy a její porucha vede k rozvoji galaktosemie (viz část 1.3.1) (McCorvie et al., 2016)

### **1.3.7 Role AKR a SDR enzymů v dalších metabolických drahách a onemocnění spojených s jejich deregulací**

Jak bylo uvedeno v částech 1.1.1 a 1.2.1, paleta substrátů, které jsou metabolizovány AKR a SDR enzymy, je hodně široká. Mimo výše uvedených (část 1.3.2–1.3.6) jsou významnými substráty také produkty lipidové peroxidace jako jsou 4-oxonon-2-enal (4-ONE), 4-hydroxynonenal (4-HNE), malondialdehyd či jejich adukty s glutathionem, které vznikají z nenasycených mastných kyselin při oxidačním stresu. Tyto vysoce reaktivní sloučeniny mohou modifikovat biologické makromolekuly jako je DNA nebo proteiny, a měnit tak jejich funkci. Vysoká hladina takových látek je spojována s řadou onemocnění, například s Alzheimerovou chorobou. Na jejich detoxikaci se podílí alespoň *in vitro* enzymy CBR1, AKR1B1 nebo AKR1B10, čímž by mohly potenciálně chránit organismus před jejich negativním působením (Malatkova et al., 2010; Ramana, 2011; Zhong et al., 2009). Další produkt, které jsou tvořené AKR nebo SDR enzymy, jsou

$\gamma$ -hydroxymáselná kyselina, která vzniká ze sukcinylsemialdehydu působením AKR7A2 a AKR1A1 a allopregnenolon, který vzniká redukcí 5 $\alpha$ -DHP působením AKR1C2. Oba tyto produkty mají afinitu ke GABA receptorům v mozku, tudíž uvedené enzymy mohou také ovlivňovat pochody v centrální nervové soustavě (Lyon et al., 2007; Trauger et al., 2002).

## 2. Komentář k předkládaným pracím

Soubor vědeckých prací předložených v této habilitační práci se zabývá enzymy z nadrodin AKR a SDR s důrazem především na reduktasy karbonylových sloučenin. Cílem řešeného projektu bylo získat nové informace o uvedených enzymech, a přispět tak k lepšímu porozumění jejich role v lidském zdraví i nemoci. Získané poznatky je možné rozčlenit do třech oblastí:

- Role reduktas karbonylových sloučenin v biotransformaci vybraných xenobiotik.
- Studium modulace aktivity AKR enzymů hrajících roli v rozvoji nádorového onemocnění
- Popis a charakterizace vybraných zástupců SDR nadrodiny.

Všechny tyto práce vznikly na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové během postgraduálního studia předkladatelky a jejího následného působení na fakultě jako asistent/odborný asistent.

### 2.1 Role reduktas karbonylových sloučenin v biotransformaci vybraných xenobiotik

P1: **Skarydova, L.**, Skarka, A., Solich, P., Wsol, V. (2010) Enzyme stereospecificity as a powerful tool in searching for new enzymes. *Curr Drug Metab*, 11(6), 547–559.

P2: Skarka, A., **Skarydova, L.**, Stambergova, H., Wsól, V. (2011) Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*, 191, 66–74.

P3: **Skarydova, L.**, Nobilis, M., Wsol, V. (2013) The role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone. *Xenobiotica*, 43(4), 346–54.

P4: **Skarydova, L.**, Zverinova, M., Stambergova, H., Wsol, V. (2013) A simple identification of novel carbonyl reducing enzymes in the metabolism of the tobacco specific carcinogen NNK. *Drug Metab Lett*, 6(3), 174–81.

P5: **Skarydova, L.**, Tomanova, R., Havlikova, L., Stambergova, H., Solich, P., Wsol, V. (2014) Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metab Pharmacokinet*, 29(2), 177–84.

Studium metabolismu různých léčiv je na Katedře Biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové klasickou oblastí výzkumu po mnoho let. Jak je uvedeno v kapitole 1.3.5, reduktasy karbonylových sloučenin jsou enzymy I. fáze biotransformace, které se podílí na metabolismu řady xenobiotik. U některých xenobiotik s karbonylovými skupinami je metabolismus poměrně dobře popsán, u jiných je znám částečně či prakticky vůbec, jak popsali kolegové z pracovní skupiny

v souhrnném článku (Malátková & Wsól, 2014). Příkladem léčiv s relativně dobře popsaným redukčním metabolismem jsou klinicky užívaná antracyklinová cytostatika doxorubicin a daunorubicin. Popsán byl především jejich metabolismus v cytosolu, kde se na deaktivaci doxorubicinu na doxorubicinol podílí několik enzymů – např. AKR1A1, AKR1C4, CBR1 a další (Kassner et al., 2008). Podobné enzymy se podílí i na redukci daunorubicinu (Bains et al., 2010). Přestože je tradičně za hlavní místo I. fáze biotransformace považováno endoplasmatické retikulum, zjistili jsme, že informace o podílu endoplasmatického retikula na metabolismu těchto antracyklinových léčiv chybí. A vzhledem k tomu, že naši pracovní skupinu zajímaly převážně mikrosomální reductasy karbonylových sloučenin (viz část 2.3), provedli jsme studii metabolismu doxorubicinu, daunorubicinu a příbuzného idarubicinu s lidskou jaterní mitochondriální frakcí (P2). Bylo prokázáno, že všechna tři léčiva jsou mikrosomální frakcí *in vitro* metabolizována. Vznikaly jednak příslušné redukované alkoholy (doxorubicinol, daunorubicinol, idarubicinol) a vedle toho také vznikaly aglykony jednotlivých studovaných látek (zejména ve vyšších koncentracích) a u nich byla dále redukovaná karbonylová skupina na alkoholovou. Je tedy zřejmé, že vedle enzymů redukujících karbonylové sloučeniny se na metabolismu antracyklinů v mikrosomech podílí také hydrolasy. Získané kinetické parametry byly porovnány s publikovanými daty pro jaterní cytosol a ukázalo se, že redukce, alespoň v případě doxorubicinu, je *in vitro* v mikrosomech podobně významná jako v cytosolické frakci. Konkrétní enzymy, podílející se na metabolismu studovaných látek, nebyly v rámci této studie popsány. Bylo pouze prokázáno, že se na metabolismu podílí nejméně jedna dosud neidentifikovaná mikrosomální reductasa studovaná na našem pracovišti (viz část 2.3). V letošním roce byla publikována účast prvního mikrosomálního enzymu na biotransformaci doxorubicinu, a sice 11 $\beta$ -HSD1 (Yang et al., 2018). Podobná studie, jako v případě antracyklinových cytostatik, byla provedena také s karcinogenem tabáku NNK (P4).

Existuje množství léčiv, u nichž jsou po podání nalezeny v krvi či moči metabolity vznikající redukcí karbonylových skupin či jejich konjugáty. Obvykle není známo, které enzymy se na tomto směru biotransformace podílí (Malátková & Wsól, 2014). Takovými léčivy jsme se zabývali v rámci dalších studií. Jedním z nich byl nabumeton (P3), nesteroidní antiflogistikum, které se používá k léčbě artritidy. Bylo známo, že hlavním metabolitem je biologicky aktivní metabolit 6-methoxy-2-naftyloctová kyselina (6-MNA) vznikající oxidací enzymem CYP1A2 a také to, že je nabumeton deaktivován pomocí redukce karbonylové skupiny. Nicméně o této biotransformační cestě nebylo nic známo, a to i přesto, že může negativně ovlivňovat terapii. Provedli jsme *in vitro* biotransformační studii nabumetonu s lidskou jaterní mikrosomální a cytosolickou frakcí, přičemž se ukázalo, že efektivněji redukuje nabumeton mikrosomální frakce a má k nabumetonu také vyšší afinitu ve srovnání s frakcí cytosolickou. Vzhledem k tomu, že jsme v době studie neměli k dispozici žádné rekombinantní mikrosomální redukční enzymy, mohli jsme jen spekulovat o případně roli enzymu 11 $\beta$ -HSD1, která byla v té době jedinou popsanou mikrosomální reductasou karbonylových sloučenin podílející se na biotransformaci xenobiotik (viz sekce 2.3). Podrobněji jsme studovali pouze účast různých lidských cytosolických enzymů, které jsme měli k dispozici v rekombinantní

formě. Ukázalo se, že nabumeton byl redukován téměř všemi testovanými enzymy, byť s rozdílnými kinetickými parametry. Nejvyšší afinitu vykazoval enzym AKR1C3, který ale nemá v játrech příliš vysokou expresi (Kassner et al., 2008), s podobnou afinitou a vyšší aktivitou redukuje nabumeton také enzym AKR1C4. Z testovaných enzymů překvapivě nejméně efektivně redukovala nabumeton CBR1.

Vedle různých kinetických parametrů v redukci nabumetonu byla také prokázána také různá stereospecifita, což jsou různé poměry vznikajících enantiomerů metabolitu. Tento fenomén je dán obecnou prochirální vlastností karbonylových skupin, které jsou metabolizovány na alkoholy. Při reakci vzniká nové centrum chiralit a metabolit se tak vyskytuje ve formě dvou enantiomerů. Poměr, ve kterém vznikají jednotlivé enantiomery, se nazývá enzymová stereospecifita a je charakteristikou daného enzymu. Testované enzymy CBR1, AKR1C3, AKR1B1, AKR1B10 redukuje nabumeton převážně na (+)-enantiomer (99–97 %), ale například enzym AKR1C4 tvoří 72 % (-)-enantiomeru redukováného nabumetonu. Fenomén enzymové stereospecifity v redukci prochirálních léčiv, který lze využít při hledání nových enzymů účastnících se biotransformace daných látek, což bylo popsáno v souhrnném článku (P1). Na existenci rozdílů ve stereospecifitě mezi lidskou jaterní mikrosomální frakcí a enzymem 11 $\beta$ -HSD1 při redukci modelového léčiva oracinu (Wsol et al., 2004) byla také postavena myšlenka hledání neidentifikovaných mikrosomálních reductas karbonylových sloučenin v lidských játrech, která je popsána v části 2.3.

Dalším léčivem s jen částečně popsanou biotransformací je antidepresivum bupropion, které se také používá při odvykání kouření. U bupropionu existují tři hlavní metabolity první fáze biotransformace, a sice oxidovaný metabolit hydroxybupropion a dva metabolity vznikající redukcí ketonové skupiny – threohydrobupropion a erythrobybupropion. Všechny tři metabolity si zachovávají částečnou biologickou aktivitu. U hydroxybupropionu je dobře známo, že vzniká účinkem enzymu CYP2B6, ale o enzymech katalyzujících redukci bupropionu se nevědělo nic. Byla tedy provedena *in vitro* studie (P5) s lidskými jaterními subcelulárními frakcemi, kde bylo překvapivě zjištěno, že hlavním vznikajícím metabolitem *in vitro* v mikrosomální a mitochondriální frakci je threohydrobupropion, zatímco hydroxybupropion tvoří jen asi 10 % ze všech vznikajících metabolitů. Podobné výsledky byly získány v publikované studii využívající lidské placentární subcelulární frakce (Wang et al., 2010). Vedle účasti subcelulárních frakcí na metabolismu bupropionu nás také zajímalo, jaké enzymy se redukce bupropionu účastní. Testované cytosolické enzymy (AKR1A1, AKR1B1, AKR1C4, AKR1B10, CBR3) neměly žádnou redukční aktivitu vůči bupropionu nebo ji měly nízkou (AKR1C1–3, CBR1). Mnohem lepší kinetické parametry i celkovou účinnost vykazoval *in vitro* mikrosomální enzym 11 $\beta$ -HSD1. Tento výsledek také korespondoval s účinností subcelulárních frakcí, kdy cytosol měl asi 10x nižší aktivitu ve srovnání s mikrosomální a mitochondriální frakcí. Vysoká efektivita biotransformace bupropionu jaterní mitochondriální frakcí, která není považována za významnou biotransformační organelu, byla překvapivá. Bohužel žádná mitochondriální reductasa karbonylových skupin nebyla v rámci studie dostupná. Mohlo by jít například o CBR4 (SDR45C1), u které byla popsána aktivita vůči toxickým chinoidním sloučeninám (Endo et al., 2008).

Veškeré výše popsané studie byly provedeny *in vitro* za použití jaterních subcelulárních frakcí nebo rekombinantních forem enzymů připravených naší pracovní skupinou. Takové studie poskytují základní informace, které je třeba následně ověřit na vyšších *in vitro* modelech, což mohou být hepatocyty, vhodné buněčné linie (např. HepaRG), transgenní buněčné linie exprimující sledované enzymy či tkáňové řezy atd. a také *in vivo* na zvířecích modelech. Jednoduchá aproximace *in vitro* výsledků na situaci *in vivo* v lidském organismu není možná, je třeba vzít do úvahy mnoho faktorů jako je absorpce a transport léčiva, mezidruhové a interindividuální rozdíly, exkrece a řadu dalších. Nicméně informace získané na základní úrovni výzkumu jsou důležité a mohou pomoci odhalit např. lékové interakce (Pelkonen et al., 2005; Wilk-Zasadna et al., 2015).

## 2.2 Studium modulace aktivity AKR enzymů hrajících roli v rozvoji nádorového onemocnění

P6: **Skarydova, L.**, Zivna, L., Xiong, G., Maser, E., Wsol, V. (2008) AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chem Biol Interact*, 178, 138–144.

P7: **Skarydova, L.**, Hofman, J., Chlebek, J., Havrankova, J., Kosanova, K., Skarka, A., Hostalkova, A., Plucha, T., Cahlikova, L., Wsol, V. (2014) Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 24, 143, 250–258.

P8: **Zemanova, L.**, Hofman, J., Novotna, E., Musilek, K., Lundova, T., Havrankova, J., Hostalkova, A., Chlebek, J., Cahlikova, L., Wsol, V. (2015) Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *J Nat Prod*, 25, 78(11), 2666–74.

P9: Hulcova, D., Breiterova, K., **Zemanova, L.**, Siatka, T., Safratova, M., Vaneckova, N., Hostalkova, A., Wsol, V., Cahlikova, L. (2017) AKR1C3 Inhibitory Potency of Naturally occurring Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types. *Nat Prod Commun*, 12, 2, 245–246.

Jak je uvedeno v částech 1.3.2 a 1.3.4, enzym AKR1C3 se účastní syntézy aktivních androgenů a prostaglandinů a je považován za zajímavý cíl pro léčbu zejména nádoru prostaty. Silný, selektivní a netoxický inhibitor by mohl významně přispět k úspěšnosti léčby CRPC (Adeniji et al., 2013; Penning, 2018; Verma et al., 2016), proto je věnováno značné úsilí do hledání takových látek, kterého se účastnila i naše pracovní skupina.

Asi 25–50 % klinicky používaných léčiv má svůj původ v přírodních produktech, často sekundárních metabolitech rostlin či mikroorganismů (např. paklitaxel nebo vinblastin). Ty mají v mateřských organismech rozličné funkce, které často napomáhají jejich přežití. Na rozdíl od různých chemických, čistě syntetických produktů, je struktura přírodních produktů ze své podstaty bioaktivní a často tyto sloučeniny slouží jako tzv. vodítka (lead compound) pro vývoj léčiv (Beutler, 2009; Cragg & Newman, 2013; Kingston, 2011). Z toho důvodu byly v našich studiích týkajících se hledání inhibitorů enzymu AKR1C3 zahrnuty zástupci dvou velkých skupin přírodních produktů, a sice flavonoidy a jim

příbuzné látky (P6) a alkaloidy (P7, P8). Účinek flavonoidů a příbuzných látek na aktivitu enzymu AKR1C3 byl sledován na jeho rekombinantní formě (P6). Do screeningového měření bylo zařazeno 20 látek z různých podskupin flavonoidů jako jsou flavony, flavanony, flavanoly a příbuzné látky jako jsou katechiny, antokyany či deriváty kyseliny skořicové. Prokázalo se, že deriváty kyseliny skořicové (kyselina kávová či chlorogenová), antokyan kyanin či glykosidické flavanoly (rutin, kvercitrin) a flavony (vitexin, isovitexin) neinhibují aktivitu AKR1C3 vůbec či ji inhibují pouze slabě. Naopak nejsilněji ze studovaných látek inhibovaly aktivitu AKR1C3 flavanony, a sice 2'-hydroxyflavanon a naringenin a také flavon 7-hydroxyflavon, pro které byly stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  (0,3–4,9  $\mu M$ ). Další flavony jako jsou apigenin a luteolin vykazovaly nižší inhibiční účinnost a glykosidy odvozené od apigeninu (vitexin a isovitexin) dokonce nevykazovaly žádnou účinnost. Vzhledem k tomu, že sloučeniny flavonoidního typu inhibují i další reduktasy karbonylových sloučenin jako je AKR1C1, CBR1, 11 $\beta$ -HSD1 (Brozic et al., 2006; Carlquist et al., 2008; Schweizer et al., 2003), bylo by vhodné získané výsledky použít pro cílený návrh inhibitorů odvozených od inhibičně aktivních strukturních typů tak, aby inhibice AKR1C3 byla selektivní.

V dalších studiích zabývajících se možností inhibice AKR1C3 byly použity strukturně zcela odlišné přírodní produkty, alkaloidy, které byly izolovány z rostlin týmem doc. Lucie Cahlíkové z Katedry farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (P7, P8). Jejich účinek na aktivitu enzymu AKR1C3 nebo příbuzných enzymů nebyl až do této studie nikdy sledován. Pro úvodní screeningové stanovení možného inhibičního účinku látek na rekombinantní AKR1C3 byly vybrány různé typy isochinolinových alkaloidů (P7) a alkaloidů izolovaných z čeledi Amaryllidaceae (P8). Z isochinolinových alkaloidů neinhibovaly či velmi málo inhibovaly aktivitu AKR1C3 všechny testované alkaloidy protopinového, aporfinového a pavinanového typu. Některé látky protoberberinového typu aktivitu AKR1C3 významně inhibovaly, nejlépe stylopin, který nemá, na rozdíl od ostatních testovaných zástupců (např. kanadin, tetrahydropalmitin, korydalin), ve struktuře substituenty. Z testovaných různých typů Amaryllidaceae alkaloidů pouze jediný zástupce významněji inhiboval aktivitu AKR1C3, a sice základní látka tazzetinového typu, tazzetin. Pro tyto látky byly stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  (7,7–29  $\mu M$ ) a pro stylopin i  $K_i$ , typ inhibice a toxicita na vybraných buněčných liniích. Protože tyto inhibitory představovaly zcela nový strukturní typ inhibitorů AKR1C3, byl stanoven také inhibiční účinek stylopinu a kanadinu na příbuzné enzymy ze skupiny AKR1C a CBR1. Ukázalo se, že tyto enzymy jsou stylopinem a kanadinem inhibovány významně slaběji či vůbec.

Vzhledem k tomu, že míra účinku inhibitoru na cílový enzym na úrovni buněk/organismu je silně ovlivněna také jeho dostupností, bylo provedeno stanovení inhibičního účinku stylopinu na enzym AKR1C3 na úrovni vybraných nádorových buněčných linií (MCF-7, HCT116), kde byla AKR1C3 zvýšeně exprimována. Bylo prokázáno, že stylopin je schopen vstoupit do buněk a úspěšně AKR1C3 inhibovat. Vzhledem k příznivým výsledkům týkajících se inhibice AKR1C3 a relativně nízké cytotoxicitě ( $EC_{50} > 50 \mu M$ ) mohou být látky odvozené od stylopinu či jiné alkaloidní sloučeniny zajímavou novou oblastí pro hledání inhibitorů či „lead compounds“.

Výzkumné úsilí na tomto poli je poměrně intenzivní, byla popsána řada různých strukturně odlišných typů inhibitorů AKR1C3 od nesteroidních antiflogistik (např. indometacin), látek indolového typu, látek piperazinového typu, po substituované estreny a další typy (Penning, 2017a), ale dosud pouze indometacin v kombinaci s enzalutamidem vstoupil do klinického testování (Pan et al., 2018).

Podobná studie byla provedena i s další reduktasou karbonylových sloučenin, která hraje významnou roli v rozvoji nádorů, a sice AKR1B10 (P9). Tento enzym se účastní redukce řady látek jako je *all-trans*-retinal (viz část 1.3.3), produkty oxidačního stresu (viz část 1.3.7), isoprenylové aldehydy atd. Jeho exprese v normálních tkáních je obecně velmi nízká a významně se zvyšuje při rozvoji nádorů jater, plic, prsu a dalších. Uvažuje se o něm jako o nádorovém markeru a terapeutickém cíli pro jejich léčbu. Příznivý efekt jeho inhibice byl prokázán na myších modelech (Chung et al., 2012; Gallego et al., 2007; Ha et al., 2014; Ma et al., 2012; Zhang et al., 2014). Protože doposud existuje málo popsaných inhibitorů AKR1B10, provedli jsme studii inhibičního účinku výše uvedených přírodních produktů na aktivitu enzymu AKR1B10. Nejprve bylo provedeno screeningové měření s rekombinantní formou enzymu, které ukázalo, že všechny testované alkaloidní sloučeniny vykazují jen nízkou až žádnou inhibiční účinnost. Zajímavější výsledky byly získány u určitých zástupců skupiny flavonoidů a příbuzných látek. Nejlepší inhibiční účinnost vykazovaly flavony – apigenin, 7-hydroxyflavon a luteolin. Silnější inhibiční účinnost měly také isoflavony dadzein a biochanin A. Téměř všechny další testované látky z různých podtypů (flavanoly, deriváty kyseliny skořicové, katechiny) aktivitu AKR1B10 také inhibovaly, i když slaběji. Pro nejsilnější inhibitory byla stanovena  $IC_{50}$  (6,6–36  $\mu$ M), selektivita k příbuznému enzymu AKR1B1, bylo provedeno molekulární modelování inhibitorů do aktivního místa AKR1B10 a byla určena také efektivita inhibice na úrovni nádorových buněčných linií se zvýšenou expresí AKR1B10. Pro apigenin bylo jasně prokázáno, že vstupuje do buněk a je schopen inhibovat aktivitu AKR1B10. Pro luteolin a 7-hydroxyflavon nebyly výsledky tak jednoznačné, což souvisí i s jejich nižší inhibiční účinností i u čistého rekombinantního enzymu. Tato studie prokázala, že flavony jsou schopny inhibovat AKR1B10 i na buněčné úrovni. Ačkoliv nejsou zrovna nejefektivnějšími inhibitory mohou sloužit jako templatová struktura pro cílený návrh inhibitorů tohoto enzymu.

Hlavním problémem při hledání nových nízkomolekulárních léčiv je selektivita, protože tyto látky obvykle interagují s celou paletou proteinů v buňkách, přičemž interakce mohou být někdy zodpovědné za vedlejší účinky léčiva. Aktuálně je snaha tento problém využít a hledat léčiva, která by byla orientovaná vůči více cílům v léčbě daného onemocnění (tzv. multi-target concept). To je výhodné u celé řady komplexních chorob jako jsou nádorová onemocnění či neurodegenerativní onemocnění (Ramsay et al., 2018). Toho by se dalo využít i při cíleném návrhu inhibitorů AKR1C3, které by mohly zároveň cílit na aromatasu nebo AR.



## 2.3 Popis a charakterizace vybraných zástupců SDR nadrodiny

P10: **Skarydova, L.**, Skarka, A., Novotna, R., Zivna, L., Martin, H.J., Wsol, V., Maser, E. (2009) Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology*, 264, (1–2), 52–60.

P11: **Skarydova, L.**, Andrys, R., Holubova, L., Stambergova, H., Knavova, J., Wsol, V., Bilkova, Z. (2013) Efficient isolation of carbonyl-reducing enzymes using affinity approach with anticancer drug oracin as specific ligand. *J Sep Sci*, 36(7), 1176–84.

P12: Andrys, R., **Zemanova, L.**, Lenco, J., Bilkova, Z., Wsol, V. (2015) Carbonyl reducing enzymes as targets of a drug-immobilized affinity carrier. *Chem Biol Interact*, 234, 169–77.

P13: **Skarydova, L.**, Wsol, V. (2012) Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics – well-known and promising members of the SDR superfamily, *Drug Metab Rev*, 44(2), 173–91.

P14: Stambergova, H., **Skarydova, L.**, Dunford, J.E., Wsol, V. (2014) Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem Biol Interact*, 207, 52–57.

P15: Skarka, A., **Skarydova, L.**, Stambergova, H., Wsol, V. (2014) Purification and reconstitution of human membrane-bound DHRS7 (SDR34C1) from *Sf9* cells. *Protein Expr Purif*, 95, 44–49.

P16: Lundova, T., **Zemanova, L.**, Malcekova, B., Skarka, A., Stambergova, H., Havrankova, J., Safr, M., Wsol, V. (2015) Molecular and Biochemical characterization of human dehydrogenase/reductase member 3 (DHRS3). *Chem Biol Interact*, 234, 178–187.

P17: Stambergova, H., **Zemanova, L.**, Lundova, T., Malcekova, B., Skarka, A., Safr, M., Wsol, V. (2016) Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids?. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 155, 112–119

P18: Lundova, T., Stambergova, H., **Zemanova, L.**, Svobodova, M., Havrankova, J., Safr, M., Wsol, V. (2016) Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8 (DHRS8): description and evaluation of its biochemical properties. *Mol Cell Biochem*, 411(1–2), 35–42.

P19: **Zemanova L.**, Kirubakaran, P., Pato, I.H., Stambergova, H., Vondrasek, J. (2017) The identification of new substrates of human DHRS7 by molecular modeling and *in vitro* testing. *Int J Biol Macromol*, 105(1), 171–182.

P20: **Zemanova, L.**, Navratilova, H., Andras, R., Sperkova, K., Andrejs, J., Kozakova, K., Meier, M., Moller, G., Novotna, E., Safr, M., Adamski, J., Wsol, V. 2018. Initial characterization of human DHRS1 (SDR19C1), a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Steroid Biochem Mol Biol*, in press, doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.07.013.

Poslední oblastí, na které se soustředilo největší úsilí, byla charakterizace reduktas karbonylových sloučenin, které jsou lokalizovány v membráně endoplasmatického retikula. Vzhledem k cytosolické expresi enzymů z AKR nadrodiny, byla v této oblasti pozornost věnována pouze SDR zástupcům. Celou studii lze rozdělit na dvě podoblasti, které spolu úzce souvisí – izolaci neznámých mikrosomálních reduktas karbonylových sloučenin z lidských jater a přípravu a charakterizaci vybraných mikrosomálních SDR enzymů.

Vzhledem k tomu, že hlavní isoformy CYP, které se podílí na biotransformaci léčiv, jsou lokalizovány v membráně endoplasmatického retikula, je tato subcelulární organela považována tradičně za hlavní místo I. fáze biotransformace. Nicméně z reduktas karbonylových sloučenin lokalizovaných v mikrosomální frakci byla účast na biotransformaci popsána pouze u jednoho enzymu, a sice 11 $\beta$ -HSD1 (viz část 1.3.5). Na základě starší *in vitro* biotransformační studie modelového protinádorového léčiva oracinu provedené na Katedře biochemických věd skupinou prof. Wsóla se uvažovalo, že na metabolismu této látky se musí podílet i další mikrosomální enzym/y, jehož/jejichž aktivita v metabolismu léčiv dosud popsána nebyla (Wsol et al., 2003; Wsol et al., 2004). Tato myšlenka byla založena na rozdílech ve stereospecifitě (viz část 2.1) redukce prochirálního oracinu lidskou jaterní mikrosomální frakcí a enzymem 11 $\beta$ -HSD1. Cílem studie bylo získat nativní formu neznámého mikrosomálního enzymu pomocí několikastupňového purifikačního postupu, identifikovat ho a prokázat jeho účast na redukci ketonové skupiny oracinu, případně dalších léčiv (P10). Nejprve byla z lidské jaterní tkáně připravena mikrosomální frakce, která byla následně solubilizovaná, aby se membránově vázané proteiny uvolnily do roztoku a mohla být provedena purifikace. Solubilizační krok je obecně naprosto esenciální pro práci s membránově vázanými proteiny. Je třeba nalézt takové podmínky a detergent, které jsou schopny, co nejlépe uvolnit proteiny z membrány a zároveň je zachovat v nativním stavu. Bylo testováno několik neiontových detergentů, které jsou pro solubilizaci proteinů vhodné. Uvedená kritéria nejlépe splňoval detergent C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. Následně bylo možné provést purifikaci, a to vhodnou kombinací iontově výměnné a hydrofobně-interakční chromatografií. Během práce byla testována řada komerčně dostupných stacionárních fází pro dva uvedené purifikační kroky. I přes značné úsilí se nepodařilo získat dostatečné množství čistého enzymu, tak aby byla provedena jeho identifikace. Nicméně byla získána částečně purifikovaná frakce, která splňovala předpoklady na stereospecifitu redukce oracinu (P10).

Pro úspěšné dokončení studie bylo třeba zavést další krok, který by specificky zachytil proteiny/enzymy s afinitou k oracinu a zároveň by umožnil snadné odstranění balastních proteinů. Ve spolupráci s týmem prof. Zuzany Bílkové z katedry Biologických a Biochemických věd Univerzity Pardubice byla připravena originální afinitní matrice

s navázaným oracinem založená na magnetických částicích (P11). Při vývoji byly testovány různé magnetické částice s různými funkčními skupinami, které umožňovaly vazbu ať už přímo nebo přes spojovací raménka, tak aby byl oracin ve vhodné orientaci s dobře dostupnou karbonylovou skupinou. Afinitní matrice založená na SiMAG-COOH částicích, na které byl navázán N-alkylovaný oracin přes spojovací raménko bis-(3-aminopropyl)amine (BAPA), byla shledána jako nejvhodnější pomocí testů s modelovými enzymy AKR1C3 a CBR1, které se na metabolismu oracinu podílí (P11). Připravená afinitní matrice s oracinem pak byla testována pro použití jako univerzální afinitní matrice pro izolaci reduktas karbonylových sloučenin z biologického materiálu, což by bylo možné díky jejich nízké substrátové specifitě, a toto použití bylo také úspěšně prokázáno (P12). Afinitní krok byl pak zařazen do částečně pozměněného purifikačního protokolu pro neidentifikovanou mikrosomální reduktasu karbonylových sloučenin společně s dalším afinitním krokem využívající komerčně dostupnou matici pro izolaci NADPH-dependentních proteinů. I přes značný pokrok v purifikačním protokolu se bohužel z časových důvodů nepodařilo studii dokončit a cílový enzym izolovat a identifikovat.

Projekt purifikace neidentifikovaných mikrosomálních reduktas karbonylových skupin podílejících se na redukci oracinu byl poměrně časově náročný. V průběhu jeho řešení jsme se snažili zjistit informace o možném zapojení membránových členů SDR nadrodiny do biotransformace léčiv a vytipovat tak enzym, který by mohl být naším cílovým enzymem. Bohužel o účasti popsáných mikrosomálních SDR enzymů na metabolismu xenobiotik se toho moc neví. Informace o potenciálních biotransformačních enzymech z SDR nadrodiny jsme popsali v souhrnném článku (P13). Při jeho přípravě jsme zjistili, že o celé řadě SDR enzymů existují kusé či téměř žádné informace a pro tyto členy je charakteristické, že se často nachází v membránách subcelulárních organel, nebo se to alespoň dle aminokyselinové sekvence předpokládá. Takové SDR proteiny byly ve spolupráci s prof. Udo Opermanem ze Structural Genomic Consortium připraveny v rekombinantní formě a byla stanovena jejich aktivita vůči oracinu. Většina enzymů neměla buď žádnou nebo měla nízkou enzymovou aktivitu v redukci oracinu (nepublikované výsledky, disertační práce PharmDr. Hany Štambergové, Ph.D.). V biotransformaci karcinogenu NNK byl podobně jako v případě oracinu zjištěn neidentifikovaný enzym či enzymy (Breyer-Pfaff et al., 2004), byly připravené membránové SDR enzymy otestovány také s tímto substrátem. Významnou aktivitu měl vůči NNK pouze enzym DHRS7. O tomto enzymu bylo v literatuře jen minimum informací, a protože je fylogeneticky velmi blízký enzymu 11 $\beta$ -HSD1, rozhodli jsme se provést jeho základní charakterizaci. Bylo potvrzeno, že jde o integrální protein nacházející se v membráně endoplasmatického retikula. Z *in vitro* experimentů vyplývá, že jde o NADPH-dependentní enzym, který se podílí na redukci endogenních substrátů, jako jsou steroidní sloučeniny (např. estron, kortison) a xenobiotik (např. NNK, 1,2-naftochinon, benzil) (P14). Rekombinantní forma DHRS7 byla solubilizována z mikrosomální membrány, purifikována a rekonstituována do liposomů (P15). Důležitou znalostí pro odhad možné funkce enzymu v organismu je znalost jeho exprese ve tkáních. Exprese DHRS7 byla stanovena v lidských tkáních jak na úrovni mRNA, tak proteinu. DHRS7 má poměrně širokou expresi, lze jí nalézt v nadledvinách, prostatě, játrech, tenkém střevě

a dalších tkáních. Tento expresní profil dobře koreluje s popsány substráty a jeho případnou možnou roli v metabolismu steroidů nebo xenobiotik (P17).

Pro základní popis možných substrátů byla použita pouze malá sada látek, které byly dříve popsány jako substráty pro AKR nebo SDR enzymy. Jaký je ale fyziologický substrát a buněčná funkce DHRS7 není možné z úvodní charakterizace určit. Pro hledání takových substrátů jsme chtěli použít i vhodnou systematictější metodu – nabízelo se například metabolické profilování geneticky upravených buněčných linií, které je ale technicky velmi náročné, nebo velkokapacitní testování široké databáze endogenních látek, pro který je třeba mít alespoň jeden vysokoafinitní substrát, který nebyl dostupný. Nakonec byl zvolen *in silico* screening, ten byl provedený ve spolupráci s týmem Dr. Jiřího Vondráška z Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd, doplněný experimentálním ověřením získaných výsledků (P19). Vzhledem k nedostupnosti krystalové struktury DHRS7 byl připraven počítačový 3D model, který byl použit pro *in silico* screening sloučenin z „Human Metabolome Database“. Tato databáze byla zvolena, protože jsme se zajímali zejména o přirozeně se vyskytující sloučeniny. Výsledky tohoto screeningu byly manuálně zhodnoceny s ohledem na orientaci sloučenin v aktivním místě a vybraní zástupci byly testováni *in vitro* jako substráty DHRS7. Jako nový substrát byl popsán aktivní androgen DHT, který je DHRS7 redukován na neaktivní 3-Adiol. Krátce předtím byla popsána možná role DHRS7 jako možného supresorového proteinu v nádoru prostaty (Seibert et al., 2015), což by mohlo souviset právě s uvedenou rolí v deaktivaci DHT. Tato funkce DHRS7 byla navíc ve stejné době popsána i pomocí zcela jiného přístupu skupinou prof. Odermatta (Araya et al., 2017). Většina zjištěných informací o DHRS7 byla popsána zcela nově. Otvírá se tak prostor pro další hlubší výzkum, který může určit její fyziologickou případně patofyziologickou roli u člověka.

Ve skupině připravených membránových zástupců SDR nadrodiny se vyskytovali i další zástupci DHRS enzymů. U člověka jich bylo identifikováno celkem 17 (viz Obr. 5, někteří zástupci uvedeni pod jinými názvy). Společným rysem většiny těchto proteinů je jejich lokalizace v buněčných membránách, z čehož částečně vyplývá i omezené množství informací o jejich (pato)fyziologické funkci. Vzhledem k tomu, že známé SDR enzymy mají často význačné funkce v organismu, dá se dle příbuznosti jednotlivých DHRS v některých případech usuzovat na podobné role. Proto jsme po DHRS7 pokračovali se základní charakterizací i u další lidských DHRS zástupců – konkrétně DHRS3 (P16), DHRS8 (P17) a DHRS1 (P20). Uvedené enzymy byly připraveny podobně jako v případě DHRS7 v rekombinantní formě a byla prokázána jejich exprese v lidských tkáních jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Následoval základní screening enzymové aktivity vůči knihovně sloučenin s karbonylovou skupinou a stanovena preference pro kofaktor. U enzymu DHRS3 bylo již dříve popsáno, že má u myší nebo u žab důležitou roli v embryogenezi pravděpodobně díky účasti na metabolismu *all-trans*-retinalu (Billings et al., 2013; Kam et al., 2013). Znalosti o enzymu samotném, hlavně lidské formě, nebyly moc rozsáhlé a naše studie tak poprvé popsala základní charakteristiky týkající se kofaktoru (NADPH), dalších substrátů (např. androstendion, NNK, 4-nitroacetofenon) a exprese ve tkáních (např. varlata, játra, tenké střevo). Enzym byl také získán v purifikované formě, která však nebyla aktivní, což se dá vysvětlit potřebou kooperace DHRS3 s enzymem

RDH10. Tento fenomén byl popsán ve stejné době pracovní skupinou prof. Kedishvili (Adams et al., 2014). Enzym DHRS8, nazývaný také 17 $\beta$ -HSD11, patřil mezi lépe popsané enzymy ze skupiny DHRS. Mimo potvrzení, již publikovaných faktů, se nám podařilo prokázat *in vitro* účast na NAD<sup>+</sup>-depedentní dehydrogenaci vybraných xenobiotických steroidů, jako je nandrolon nebo metyltestosteron. Ke zcela nepopsaným členům SDR nadrodiny patřil enzym DHRS1, u něhož byla provedena základní charakterizace ve spolupráci s týmem prof. Jerzyho Adamskiho z Helmholtzova centra v Mnichově. Bylo prokázáno, že se jedná o monotopický membránový protein, který interaguje s endoplasmatickým retikulem. Rekombinantní forma byla z mikrosomální frakce solubilizována a byl připraven aktivní enzym. Bylo prokázáno, že se *in vitro* podílí na NADPH-dependentní redukci prostaglandinu E1, isatinu, některých steroidních hormonu a xenobiotik. S tím dobře korelovala i prokázaná exprese v játrech a nadledvinách. U dalších enzymů z DHRS skupiny (DHRS7B, DHRS7C, DHRSX) byly získány jen částečné informace, které dosud nebyly publikovány. Nicméně publikace z posledního roku poukazují na významnou roli DHRS7B v regulaci remodelace tukové tkáně (Lodhi et al., 2017) a DHRS7C v regulaci metabolismu svalové tkáně (Ruiz et al., 2018), proto by bylo vhodné základní charakterizaci dokončit.

Výsledky takové základní charakterizace mohou napomoci, spolu s výsledky dalších studií (např. velkých genetických či proteomických), v orientaci dalšího výzkumu málo popsaných enzymů. Ten může vést k nalezení dalších medicínsky zajímavých zástupců i v rámci SDR nadrodiny.

### 3. Souhrn, závěry a perspektivy

Na základě dostupných informací je zřejmé, že enzymy ze skupiny reduktas karbonylových sloučenin, které lze najít v proteinových nadrodinách AKR a SDR, mají u člověka celou řadu klíčových funkcí. Jsou součástí řady důležitých metabolických drah, produkují významné hormony či signalizační molekuly a podílí se na také na biotransformaci cizorodých látek. Je tedy škoda, že se této oblasti nevěnuje tak velká pozornost, jako by si bezpochyby zasloužila. V této habilitační práci jsou shrnuty základní teze o dosud známé roli uvedených enzymů v lidském organismu. Předložené vědecké práce pak tyto znalosti rozšiřují, a to ve třech oblastech, a sice jejich roli v biotransformaci vybraných xenobiotik, modulaci aktivity enzymů s významnou úlohou v rozvoji nádorových onemocnění a základní charakterizaci málo popsaných mikrosomálních zástupců SDR nadrodiny.

Ačkoliv jsou lidské cytosolické reduktasy karbonylových sloučenin poměrně dobře popsány a v některých případech přiřazené k dějům v buňkách, nám se podařilo rozšířit znalosti o jejich možné účasti na biotransformaci, zejména u vybraných klinicky používaných léčiv. Přispěli jsme také k úsilí, které je celosvětově vynakládáno na hledání možných inhibitorů enzymů, které by mohly sloužit v budoucnu jako nové molekulární cíle pro léčbu vybraných typů nádorového onemocnění. V našich studiích šlo konkrétně o enzymy AKR1C3 a AKR1B10. V případě AKR1C3 se nám podařilo popsat zcela nové typy inhibitorů, a sice isochinolinové alkaloidy protoberberinového typu a Amarylidaceae alkaloidy tazzetinového typu. Tyto látky (stylopin a tazzetin) by mohly sloužit jako templáty pro další výzkum inhibitorů AKR1C3. Bylo by vhodné otestovat jejich potenciál i v tzv. multi-target přístupu pro léčbu nádoru prostaty, kde hraje AKR1C3 významnou roli, a kde jsou znalosti dalších cílů pro léčbu poměrně široké.

Hlavní oblastí našeho zájmu byly membránové reduktasy karbonylových sloučenin vázané na endoplasmatické retikulum, z nichž některé patří v rámci nadrodiny SDR k nejméně popsaným enzymům. Byly zvoleny dva přístupy: jednak byly enzymy purifikovány v nativní formě z lidských jater a také byly vybrané enzymy připraveny v rekombinantní formě a charakterizovány. Projekt purifikace nativních mikrosomálních enzymů byl velmi náročný. Kvůli zvýšení selektivity purifikačních kroků byl připraven speciální, originální afinitní nosič, který by mohl mít univerzálnější použití pro izolaci řady AKR a SDR enzymů z tkání. I přes řadu dílčích úspěchů by bylo potřeba projektu ještě určitý čas věnovat. V oblasti charakterizace rekombinantních mikrosomálních SDR enzymů, kde byly naší cílovou skupinou zejména DHRS enzymy z SDR nadrodiny, se nám podařilo mnoho vlastností a aktivit DHRS7, DHRS3, DHRS8 a DHRS1 popsat úplně poprvé. Tato základní charakterizace enzymů společně s dalšími aktuálně publikovanými výsledky poukazuje na jejich možné zapojení v důležitých pochodech v buňkách, které mohou být spojené i s patofyziologickými stavy. V případě DHRS7 bylo například prokázáno zapojení do deaktivace DHT, která může souviset s popsanou tumor supresorovou rolí neznámého mechanismu v nádoru prostaty. Základní charakterizace, která byla provedena naší pracovní skupinou, může sloužit jako odrazový můstek pro další studie, které pomohou odhalit skutečnou fyziologickou, eventuálně

patofyziologickou, roli uvedených enzymů v buňkách. Další výzkum by měl jít jednak směrem k ověření získaných výsledků na vyšších modelech jako jsou vhodné buněčné linie, případně pokusná zvířata. Naopak druhý přístup by měl jít opačným směrem, tedy směrem znalosti struktury enzymů, vztahu mezi strukturou a funkcí a také odhalením možných interakčních partnerů, kteří často ovlivňují funkci proteinů. To umožní hlubší porozumění funkce uvedených enzymů na molekulární úrovni. Jen kombinací obou přístupů je možné pochopit funkci studovaných enzymů a případně tyto znalosti medicínsky využít.

## 4. Podíl předkladatelky na jednotlivých publikacích

Práce zahrnuté v habilitační práci:

**P1: Skarydova, L.,** Skarka, A., Solich, P., Wsol, V. (2010) Enzyme stereospecificity as a powerful tool in searching for new enzymes. *Curr Drug Metab*, 11(6), 547–559.

*Literární rešerše, podíl na sepsání publikace (souhrnný článek)*

**P2: Skarka, A., Skarydova, L.,** Štambergova, H., Wsol, V. (2011) Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*, 191, 66–74.

*Podíl na experimentální práci a vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P3: Skarydova, L.,** Nobilis, M., Wsol, V. (2013) The role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone. *Xenobiotica*, 43(4), 346–354.

*První autorka, provedení významné části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P4: Skarydova, L.,** Zverinova, M., Stambergova, H., Wsol, V. (2013) A simple identification of novel carbonyl reducing enzymes in the metabolism of the tobacco specific carcinogen NNK. *Drug Metab Lett*, 6(3), 174–181.

*První autorka, provedení významné části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P5: Skarydova, L.,** Tomanova, R., Havlikova, L., Stambergova, H., Solich, P., Wsol, V. (2014) Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metab Pharmacokinet*, 29(2), 177–84.

*První autorka, provedení významné části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P6: Skarydova, L.,** Zivna, L., Xiong, G., Maser, E., Wsol, V. (2008) AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chem Biol Interact*, 178, 138–144.

*První autorka, provedení významné části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P7: Skarydova, L.,** Hofman, J., Chlebek, J., Havrankova, J., Kosanova, K., Skarka, A., Hostalkova, A., Plucha, T., Cahlikova, L., Wsol, V. (2014) Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 24(143), 250–258.

*První autorka, návrh studie, provedení části experimentální práce a vyhodnocení dat, sepsání publikace*



**P8: Zemanova, L.,** Hofman, J., Novotna, E., Musilek, K., Lundova, T., Havrankova, J., Hostalkova, A., Chlebek, J., Cahlikova, L., Wsol, V. (2015) Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *J Nat Prod*, 25, 78(11), 2666–2674.

*První a korespondující autorka, návrh studie, provedení části experimentální práce a vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P9: Hulcova, D., Breiterova, K., Zemanova, L.,** Siatka, T., Safratova, M., Vaneckova, N., Hostalkova, A., Wsol, V., Cahlikova, L. (2017) AKR1C3 Inhibitory Potency of Naturally-occurring Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types, *Nat Prod Commun*, 12, 2, 245–246.

*Podíl na experimentální práci a vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P10: Skarydova, L.,** Skarka, A., Novotna, R., Zivna, L., Martin, H.J., Wsol, V., Maser, E. (2009) Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology*, 264(1–2), 52–60.

*První autorka, provedení významné části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P11: Skarydova, L.,** Andrys, R., Holubova, L., Stambergova, H., Knavova, J., Wsol, V., Bilkova, Z. (2013) Efficient isolation of carbonyl-reducing enzymes using affinity approach with anticancer drug oracin as specific ligand. *J Sep Sci*, 36(7), 1176–1184.

*První autorka, provedení části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání publikace*

**P12: Andrys, R., Zemanova, L.,** Lenco, J., Bilkova, Z., Wsol, V. (2015) Carbonyl reducing enzymes as targets of a drug-immobilized affinity carrier. *Chem Biol Interact*, 234, 169–77.

*Školitelka specialistka prvního autora, podíl na vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P13: Skarydova, L.,** Wsol, V. (2012.) Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics – well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metab Rev*, 44(2), 173–91.

*Literární rešerše, podíl na sepsání publikace (souhrnný článek)*

**P14: Stambergova, H., Skarydova, L.,** Dunford, J.E., Wsol, V. (2014) Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem Biol Interact*, 207, 52–57.

*Školitelka specialistka první autorky, návrh studie, podíl na vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P15:** Skarka, A., **Skarydova, L.**, Stambergova, H., Wsól, V. (2014) Purification and reconstitution of human membrane-bound DHRS7 (SDR34C1) from *Sf9* cells. *Protein Expr Purif*, 95, 44–49.

*Podíl na vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P16:** Lundova, T., **Zemanova, L.**, Malcekova, B., Skarka, A., Stambergova, H., Havrankova, J., Safr, M., Wsol, V. (2015) Molecular and Biochemical characterization of human dehydrogenase/reductase member 3 (DHRS3). *Chem Biol Interact*, 234, 178–187.

*Školitelka specialista první autorky, návrh studie, podíl na vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P17:** Stambergova, H., **Zemanova, L.**, Lundova, T., Malcekova, B., Skarka, A., Safr, M., Wsol, V. (2016) Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids?. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 155, 112–119.

*Školitelka specialista první autorky, korespondující autorka, návrh studie, podíl na vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P18:** Lundova, T., Stambergova, H., **Zemanova, L.**, Svobodova, M., Havrankova, J., Safr, M., Wsol, V. (2016) Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8 (DHRS8): description and evaluation of its biochemical properties. *Mol Cell Biochem*, 411 (1–2), 35–42.

*Školitelka specialista první autorky, návrh studie, podíl na vyhodnocení dat, revize manuskriptu*

**P19:** **Zemanova, L.**, Kirubakaran, P., Pato, I.H., Stambergova H., Vondrasek, J. (2017) The identification of new substrates of human DHRS7 by molecular modeling and *in vitro* testing. *Int J Biol Macromol*, 105(1), 171–182.

*První autorka, návrh studie, provedení části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání manuskriptu*

**P20:** **Zemanova, L.**, Navratilova, H., Andrys, R., Sperkova, K., Andrejs, J., Kozakova, K., Meier, M., Moller, G., Novotna, E., Safr, M., Adamski, J., Wsol, V. (2018) Initial characterization of human DHRS1 (SDR19C1), a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Steroid Biochem Mol Biol*, in press, doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.07.013.

*První a korespondující autorka, návrh studie, provedení části experimentální práce, vyhodnocení dat, sepsání manuskriptu*

Práce mimo habilitační práci (doplňk):

**PD1:** Zakova, P., Kandar, R., **Skarydova, L.**, Skalicky, J., Myjavec, A., Vojtisek, P. 2007. Ubiquinol-10/lipids ratios in consecutive patients with different angiographic findings, *Clinical Chim Acta*, 380(12), 133–138.

*Podíl na experimentální práci a vyhodnocení dat*

**PD2:** Gabianelli, R., Palan, M., Flis, D.J., Fedeli, D., Nasuti, C., **Skarydova, L.**, Ziolkowski, W., 2013. Imbalance in redox system of rat liver following permethrin treatment in adolescence and neonatal age, *Xenobiotika*, 43(12), 1103–1110.

*Vedoucí diplomové práce spoluautora, revize manuskriptu*

## 5. Seznam zkratek

11 $\beta$ -HSD1 – 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

20 $\alpha$ -OHprogesteron – 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteron

3 $\alpha$ -Adiol – 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol

3 $\beta$ -diol – 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol

4-HNE – 4-hydroxynonenal

4-ONE – 4-oxonon-2-enal

5 $\alpha$ -dion – 5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion

6-MNA – 6-methoxy-2-naftylactová kyselina

7 $\alpha$ -OH – cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxycholesterol

9,10-PQ – 9,10-fenantrenchinon

ADH – alkoholdehydrogenasy

Adion –  $\Delta^4$ -Androstene-3,17-dione

AME – zdánlivý přebytek mineralokortikoidů

AKR – nadrodina aldo-keto reduktas

AtD – autosomálně dominantní typ dědičnosti

AR – androgenní receptor

AtR – autosomálně recesivní typ dědičnosti

BAPA – bis-(3-aminopropyl)amin

BRENDA – BRaunschweig ENzyme DATabase

CBR1 – karbonylreduktasa 1

CDC – kortison reduktasová deficiencie

CRBPI – vazebný protein pro retinol/retinal

CRPC – kastročně reziztentní nádoru prostaty

CYP – cytochrom P450

DHP – 5 $\alpha$ -dihydroprogesteron

DHT – 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron

DOX – doxorubicin

DOXOL – doxorubicinol

ER – endoplasmatické retikulum

FP – receptor pro prostaglandin

GR – glukokortikoidní receptor  
HGNC – komise pro nomenklaturu projektu lidského genomu  
HSDs – hydroxysteroiddehydrogenasy  
IUBMB – Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie  
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
LD – lipidové kapénky  
LP – lipidová peroxidace  
NNK – 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone  
PG – prostaglandin  
PX – peroxizomy  
SDR – nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem  
STS – steroidsulfatasa  
RAR – receptor pro kyselinu retinovou  
RDHs – retinoldehydrogenasy  
XLD – dominantní typ dědičnosti vázaný na chromozom X

## 6. Literatura

- Adams, M. K., Belyaeva, O. V., Wu, L. & Kedishvili, N. Y. (2014) The retinaldehyde reductase activity of DHRS3 is reciprocally activated by retinol dehydrogenase 10 to control retinoid homeostasis. *J Biol Chem*, 289(21), 14868-80.
- Adeniji, A. O., Chen, M. & Penning, T. M. (2013) AKR1C3 as a target in castrate resistant prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 137, 136-142.
- Africander, D. & Storbeck, K. H. (2018) Steroid metabolism in breast cancer: Where are we and what are we missing? *Mol Cell Endocrinol*, 466, 86-97.
- Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F. & Hamosh, A. (2015) OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D789-98.
- Anagnostis, P., Katsiki, N., Adamidou, F., Athyros, V. G., Karagiannis, A., Kita, M. & Mikhailidis, D. P. (2013) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders? *Metabolism*, 62(1), 21-33.
- Anderson, A. & Walker, B. R. (2013) 11beta-HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Drugs*, 73(13), 1385-93.
- Araya, S., Kratschmar, D. V., Tsachaki, M., Stücheli, S., Beck, K. R. & Odermatt, A. (2017) DHRS7 (SDR34C1) - A new player in the regulation of androgen receptor function by inactivation of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 171, 288-295.
- Ashmore, J. H., Luo, S., Watson, C. J. W. & Lazarus, P. (2018) Carbonyl Reduction of NNK by Recombinant Human Lung Enzymes. Identification of HSD17 $\beta$ 12 as the Reductase important in (R)-NNAL formation in Human Lung. *Carcinogenesis*, in press, doi: 10.1093/carcin/bgy065.
- Azuma, Y., Nishinaka, T., Ushijima, S., Soh, J., Katsuyama, M., Lu, H. P., Kawata, M., Yabe-Nishimura, C. & Miki, T. (2004) Characterization of htAKR, a novel gene product in the aldo-keto reductase family specifically expressed in human testis. *Mol Hum Reprod*, 10(7), 527-533.
- Bains, O. S., Grigliatti, T. A., Reid, R. E. & Riggs, K. W. (2010) Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *J Pharmacol Exp Ther*, 335(3), 533-45.
- Barski, O. A., Mindnich, R. & Penning, T. M. (2013) Alternative splicing in the aldo-keto reductase superfamily: implications for protein nomenclature. *Chem Biol Interact*, 202(1-3), 153-158.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M. & Bhatnagar, A. (2008) The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev*, 40(4), 553-624.

Beutler, J. A. (2009) Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*, 46, 9.11.1-9.11.21.

Bhatia, C., Oerum, S., Bray, J., Kavanagh, K. L., Shafqat, N., Yue, W. & Oppermann, U. (2015) Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure-activity relationships. *Chem Biol Interact*, 234, 114-25.

Billings, S. E., Pierzchalski, K., Butler Tjaden, N. E., Pang, X. Y., Trainor, P. A., Kane, M. A. & Moise, A. R. (2013) The retinaldehyde reductase DHRS3 is essential for preventing the formation of excess retinoic acid during embryonic development. *FASEB J*, 27(12), 4877-89.

Bodreddigari, S., Jones, L. K., Egner, P. A., Groopman, J. D., Sutter, C. H., Roebuck, B. D., Guengerich, F. P., Kensler, T. W. & Sutter, T. R. (2008) Protection against aflatoxin B1-induced cytotoxicity by expression of the cloned aflatoxin B1-aldehyde reductases rat AKR7A1 and human AKR7A3. *Chem Res Toxicol*, 21(5), 1134-1142.

Bray, J. E., Marsden, B. D. & Oppermann, U. (2009) The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary. *Chem Biol Interact*, 178(1-3), 99-109.

Bresson, E., Boucher-Kovalik, S., Chapdelaine, P., Madore, E., Harvey, N., Laberge, P. Y., Leboeuf, M. & Fortier, M. A. (2011) The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(1), 210-9.

Breyer-Pfaff, U., Martin, H. J., Ernst, M. & Maser, E. (2004) Enantioselectivity of carbonyl reduction of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone by tissue fractions from human and rat and by enzymes isolated from human liver. *Drug Metab Dispos.*, 32(9), 915-922.

Breyer-Pfaff, U. & Nill, K. (2000) High-affinity stereoselective reduction of the enantiomers of ketotifen and of ketonic nortriptyline metabolites by aldo-keto reductases from human liver. *Biochem Pharmacol*, 59(3), 249-260.

Breyer-Pfaff, U. & Nill, K. (2004) Carbonyl reduction of naltrexone and dolasetron by oxidoreductases isolated from human liver cytosol. *J Pharm Pharmacol*, 56(12), 1601-1606.

Brozic, P., Smuc, T., Gobec, S. & Rizner, T. L. (2006) Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. *Mol Cell Endocrinol*, 259(1-2), 30-42.

Carlquist, M., Frejd, T. & Gorwa-Grauslund, M. F. (2008) Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chem Biol Interact*, 174(2), 98-108.

Chi, K. R. (2016) The dark side of the human genome. *Nature*, 538(7624), 275-277.

Chung, Y. T., Matkowskyj, K. A., Li, H., Bai, H., Zhang, W., Tsao, M. S., Liao, J. & Yang, G. Y. (2012) Overexpression and oncogenic function of aldo-keto reductase family 1B10 (AKR1B10) in pancreatic carcinoma. *Mod Pathol*, 25(5), 758-766.

Copley, S. D. (2003) Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr Opin Chem Biol*, 7(2), 265-72.

Cornish-Bowden, A. (2014) Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspect Sci*, 1, 74-87.

Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1830(6), 3670-3695.

Das, B. C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T. C., Torregroza, I., Wallace, D. P., Kambhampati, S., Van Veldhuizen, P., Verma, A., Ray, S. K. & Evans, T. (2014) Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg Med Chem*, 22(2), 673-83.

Dozier, B. L., Watanabe, K. & Duffy, D. M. (2008) Two pathways for prostaglandin F<sub>2</sub> alpha synthesis by the primate periovulatory follicle. *Reproduction*, 136(1), 53-63.

Ebert, B., Kisiela, M. & Maser, E. (2015) Human DCXR - another 'moonlighting protein' involved in sugar metabolism, carbonyl detoxification, cell adhesion and male fertility? *Biol Rev Camb Philos Soc*, 90(1), 254-78.

Ebert, B., Kisiela, M. & Maser, E. (2016) Transcriptional regulation of human and murine short-chain dehydrogenase/reductases (SDRs) - an in silico approach. *Drug Metab Rev*, 48(2), 183-217.

Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P. & Parissenti, A. M. (2015) Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Curr Drug Metab*, 16(6), 412-26.

Ellens, K. W., Christian, N., Singh, C., Satagopam, V. P., May, P. & Linster, C. L. (2017) Confronting the catalytic dark matter encoded by sequenced genomes. *Nucleic Acids Res*, 45(20), 11495-11514.

Endo, S., Matsunaga, T., Kitade, Y., Ohno, S., Tajima, K., El-Kabbani, O. & Hara, A. (2008) Human carbonyl reductase 4 is a mitochondrial NADPH-dependent quinone reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(4), 1326-1330.

Endo, S., Miyagi, N., Matsunaga, T., Hara, A. & Ikari, A. (2016) Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11 is a novel type of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 472(1), 231-6.

Falk, M. J., Gai, X., Shigematsu, M., Vilardo, E., Takase, R., McCormick, E., Christian, T., Place, E., Pierce, E. A., Consugar, M., Gamper, H. B., Rossmann, W. & Hou, Y. M. (2016) A novel HSD17B10 mutation impairing the activities of the mitochondrial RNase P complex causes X-linked intractable epilepsy and neurodevelopmental regression. *RNA Biol*, 13(5), 477-85.

Fields, A. L., Soprano, D. R. & Soprano, K. J. (2007) Retinoids in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, 102(4), 886-898.



Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jornvall, H. & Oppermann, U. (2002) Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, 277(28), 25677-25684.

Gallego, O., Ruiz, F. X., Ardevol, A., Dominguez, M., Alvarez, R., de Lera, A. R., Rovira, C., Farres, J., Fita, I. & Pares, X. (2007) Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(52), 20764-20769.

Geer, E. B., Islam, J. & Buettner, C. (2014) Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 43(1), 75-102.

Ghosal, A., Yuan, Y., Tong, W., Su, A. D., Gu, C., Chowdhury, S. K., Kishnani, N. S. & Alton, K. B. (2011) Characterization of human liver enzymes involved in the biotransformation of boceprevir, a hepatitis C virus protease inhibitor. *Drug Metab Dispos*, 39(3), 510-521.

Guo, C., Wang, W., Liu, C., Myatt, L. & Sun, K. (2014) Induction of PGF2 $\alpha$  synthesis by cortisol through GR dependent induction of CBR1 in human amnion fibroblasts. *Endocrinology*, 155(8), 3017-24.

Guo, K., Lukacik, P., Papagrigoriou, E., Meier, M., Lee, W. H., Adamski, J. & Oppermann, U. (2006) Characterization of human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme: a novel, cytosolic type 2 R-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 281(15), 10291-10297.

Ha, S. Y., Song, D. H., Lee, J. J., Lee, H. W., Cho, S. Y. & Park, C. K. (2014) High Expression of Aldo-Keto Reductase 1B10 Is an Independent Predictor of Favorable Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gut Liver*, 8(6), 648-654.

Hevir, N., Vouk, K., Sinkovec, J., Ribič-Pucelj, M. & Rižner, T. L. (2011) Aldo-keto reductases AKR1C1, AKR1C2 and AKR1C3 may enhance progesterone metabolism in ovarian endometriosis. *Chem Biol Interact*, 191(1-3), 217-26.

Hoffmann, F. & Maser, E. (2007) Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev*, 39(1), 87-144.

Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V. & Penning, T. M. (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact*, 143-144, 621-631.

Imamura, Y., Sanai, K., Seri, K. & Akita, H. (2001) Hypoglycemic effect of S(-)-hydroxyhexamide, a major metabolite of acetohexamide, and its enantiomer R(+)-hydroxyhexamide. *Life Sci*, 69(16), 1947-55.

Jez, J. M., Flynn, T. G. & Penning, T. M. (1997) A nomenclature system for the aldo-keto reductase superfamily. *Adv Exp Med Biol*, 414, 579-600.

Jez, J. M. & Penning, T. M. (2001) The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact*, 130-132(1-3), 499-525.

Jornvall, H., Landreh, M. & Ostberg, L. J. (2015) Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chem Biol Interact*, 234, 75-9.

Kam, R. K., Shi, W., Chan, S. O., Chen, Y., Xu, G., Lau, C. B., Fung, K. P., Chan, W. Y. & Zhao, H. (2013) Dhrr3 protein attenuates retinoic acid signaling and is required for early embryonic patterning. *J Biol Chem*, 288(44), 31477-87.

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D353-D361.

Kassner, N., Huse, K., Martin, H. J., Godtel-Armbrust, U., Metzger, A., Meineke, I., Brockmoller, J., Klein, K., Zanger, U. M., Maser, E. & Wojnowski, L. (2008) Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos*, 36(10), 2113-2120.

Kavanagh, K., Jornvall, H., Persson, B. & Oppermann, U. (2008) The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci*, 65(24), 3895-3906.

Kedishvili, N. Y. (2013) Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation. *J Lipid Res*, 54(7), 1744-60.

Kedishvili, N. Y. (2016) Retinoic Acid Synthesis and Degradation. *Subcell Biochem*, 81, 127-161.

Kingston, D. G. (2011) Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod*, 74(3), 496-511.

Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K. & Takusagawa, F. (2004) Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry*, 43(8), 2188-2198.

Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Simard, J. & Labrie, C. (2000) Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol Metab*, 11(10), 421-427.

Liden, M. & Eriksson, U. (2006) Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J Biol Chem*, 281(19), 13001-13004.

Lodhi, I. J., Dean, J. M., He, A., Park, H., Tan, M., Feng, C., Song, H., Hsu, F. F. & Semenkovich, C. F. (2017) PexRAP Inhibits PRDM16-Mediated Thermogenic Gene Expression. *Cell Rep*, 20(12), 2766-2774.

Lyon, R. C., Johnston, S. M., Watson, D. G., McGarvie, G. & Ellis, E. M. (2007) Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *J Biol Chem*, 282(36), 25986-92.

Ma, J. & Cao, D. (2011) Human aldo-keto reductases: structure, substrate specificity and roles in tumorigenesis. *Biomol Concepts*, 2, 115-126.

- Ma, J., Luo, D. X., Huang, C. F., Shen, Y., Bu, Y. W., Markwell, S., Gao, J., Liu, J. H., Zu, X. Y., Cao, Z., Gao, Z., Lu, F. M., Liao, D. F. & Cao, D. L. (2012) AKR1B10 overexpression in breast cancer: Association with tumor size, lymph node metastasis and patient survival and its potential as a novel serum marker. *Int J Cancer*, 131(6), E862-E871.
- Malatkova, P., Maser, E. & Wsol, V. (2010) Human carbonyl reductases. *Curr Drug Metab*, 11(8), 639-658.
- Malátková, P. & Wsól, V. (2014) Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metab Rev*, 46(1), 96-123.
- Marchais-Oberwinkler, S., Henn, C., Moller, G., Klein, T., Negri, M., Oster, A., Spadaro, A., Werth, R., Wetzel, M., Xu, K., Frotscher, M., Hartmann, R. W. & Adamski, J. (2011) 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases (17beta-HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 125(1-2), 66-82.
- Matsunaga, T., Shintani, S. & Hara, A. (2006) Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21(1), 1-18.
- McCorvie, T. J., Kopec, J., Pey, A. L., Fitzpatrick, F., Patel, D., Chalk, R., Shrestha, L. & Yue, W. W. (2016) Molecular basis of classic galactosemia from the structure of human galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *Hum Mol Genet*, 25(11), 2234-2244.
- McDonald, A. G., Boyce, S. & Tipton, K. F. (2009) ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D593-7.
- McDonald, A. G. & Tipton, K. F. (2014) Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *FEBS J*, 281(2), 583-92.
- McNamara, K. M. & Sasano, H. (2015) The intracrinology of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 145, 172-8.
- Mindnich, R., Drury, J. E. & Penning, T. M. (2011) The effect of disease associated point mutations on 5 $\beta$ -reductase (AKR1D1) enzyme function. *Chem Biol Interact*, 191(1-3), 250-4.
- Mindnich, R. D. & Penning, T. M. (2009) Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum Genomics*, 3(4), 362-70.
- Miura, T., Taketomi, A., Nishinaka, T. & Terada, T. (2013) Regulation of human carbonyl reductase 1 (CBR1, SDR21C1) gene by transcription factor Nrf2. *Chem Biol Interact*, 202(1-3), 126-35.
- Moeller, G. & Adamski, J. (2009) Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 301(1-2), 7-19.
- Morton, N. M. (2010) Obesity and corticosteroids: 11beta-hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol*, 316(2), 154-164.

- Mostaghel, E. A. (2014) Beyond T and DHT - novel steroid derivatives capable of wild type androgen receptor activation. *Int J Biol Sci*, 10(6), 602-13.
- Nagasaki, S., Miki, Y., Akahira, J., Suzuki, T. & Sasano, H. (2009) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human breast cancer. *Ann NY Acad Sci*, 1155, 25-32.
- Nahoum, V., Gangloff, A., Legrand, P., Zhu, D. W., Cantin, L., Zhorov, B. S., Luu-The, V., Labrie, F., Breton, R. & Lin, S. X. (2001) Structure of the human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in complex with testosterone and NADP at 1.25-A resolution. *J Biol Chem*, 276(45), 42091-8.
- Nassar, A. F., Hollenberg, P. F. & Scatina, J. (2009) *Drug Metabolism Handbook*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Wiley.
- Niesen, F. H., Schultz, L., Jadhav, A., Bhatia, C., Guo, K., Maloney, D. J., Pilka, E. S., Wang, M., Oppermann, U., Heightman, T. D. & Simeonov, A. (2010) High-affinity inhibitors of human NAD-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: mechanisms of inhibition and structure-activity relationships. *PLoS One*, 5(11), e13719.
- Odermatt, A. & Klusonova, P. (2015) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: Regeneration of active glucocorticoids is only part of the story. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 151, 85-92.
- Odermatt, A. & Nashev, L. G. (2010) The glucocorticoid-activating enzyme 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 119(1-2), 1-13.
- Oppermann, U. (2007) Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 293-322.
- Pan, C.-x., Lara, P., Evans, C. P., Parikh, M., White, R. d. V. & Dall'era, M. (2018) A phase Ib/II trial of indomethacin and enzalutamide to treat castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Clin Oncol*, 36, TPS394-TPS394.
- Parker, R. O. & Crouch, R. K. (2010) Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp Eye Res*, 91(6), 788-792.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Uusitalo, J., Rautio, A. & Raunio, H. (2005) Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of in vitro investigations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96(3), 167-75.
- Penning, T. M. (2015) The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact*, 234, 236-46.
- Penning, T. M. (2017a) Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 27(12), 1329-1340.

Penning, T. M. (2017b) Aldo-Keto Reductase Regulation by the Nrf2 System: Implications for Stress Response, Chemotherapy Drug Resistance, and Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 30(1), 162-176.

Penning, T. M. (2018) AKR1C3 (type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders. *Mol Cell Endocrinol*, in press, doi: 10.1016/j.mce.2018.07.002.

Penning, T. M. & Byrns, M. C. (2009) Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann NY Acad Sci*, 1155, 33-42.

Penning, T. M. & Drury, J. E. (2007) Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys*, 464(2), 241-250.

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

Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J. E., Bruford, E., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., Duarte, R. G., Jornvall, H., Kavanagh, K. L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T. M., Thornton, J. M., Adamski, J. & Oppermann, U. (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact*, 178(1-3), 94-98.

Pertea, M., Shumate, A., Pertea, G., Varabyou, A., Chang, Y.-C., Madugundu, A. K., Pandey, A. & Salzberg, S. x. L. (2018) Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/332825>.

Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, M., Tillack, J. & Schomburg, D. (2017) BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D380-D388.

Porte, S., Xavier, R. F., Gimenez, J., Molist, I., Alvarez, S., Dominguez, M., Alvarez, R., de Lera, A. R., Pares, X. & Farres, J. (2013) Aldo-keto reductases in retinoid metabolism: search for substrate specificity and inhibitor selectivity. *Chem Biol Interact*, 202(1-3), 186-194.

Quasthoff, S., Möckel, C., Zieglgänsberger, W. & Schreiber, W. (2008) Tolperisone: a typical representative of a class of centrally acting muscle relaxants with less sedative side effects. *CNS Neurosci Ther*, 14(2), 107-119.

Raisová Stuchlíková, L., Králová, V., Lněničková, K., Zárbynický, T., Matoušková, P., Hanušová, V., Ambrož, M., Šubrt, Z. & Skálová, L. (2018) The metabolism of flubendazole in human liver and cancer cell lines. *Drug Test Anal*, in press, doi: 10.1002/dta.2369.

Ramana, K. V. (2011) ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme. *Biomol Concepts*, 2(1-2), 103-114.

Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E. & Bolognesi, M. L. (2018) A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med*, 7(1), 3.

- Rižner, T. L. & Penning, T. M. (2014) Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*, 79, 49-63.
- Ruiz, A., Dror, E., Handschin, C., Furrer, R., Perez-Schindler, J., Bachmann, C., Treves, S. & Zorzato, F. (2018) Over-expression of a retinol dehydrogenase (SRP35/DHRS7C) in skeletal muscle activates mTORC2, enhances glucose metabolism and muscle performance. *Sci Rep*, 8(1), 636.
- Ruiz, F. X., Porte, S., Pares, X. & Farres, J. (2012) Biological role of aldo-keto reductases in retinoic Acid biosynthesis and signaling. *Front Pharmacol*, 3, 58.
- Salabei, J. K., Li, X. P., Petrash, J. M., Bhatnagar, A. & Barski, O. A. (2011) Functional expression of novel human and murine AKR1B genes. *Chem Biol Interact*, 191(1-3), 177-184.
- Sang, X., Han, H., Poirier, D. & Lin, S. X. (2018) Steroid sulfatase inhibition success and limitation in breast cancer clinical assays: an underlying mechanism. *J Steroid Biochem Mol Biol*, in press, doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.05.009.
- Schweizer, R. A., Atanasov, A. G., Frey, B. M. & Odermatt, A. (2003) A rapid screening assay for inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases (11beta-HSD): flavanone selectively inhibits 11beta-HSD1 reductase activity. *Mol Cell Endocrinol*, 212(1-2), 41-49.
- Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2), 105-117.
- Seibert, J. K., Quagliata, L., Quintavalle, C., Hammond, T. G., Terracciano, L. & Odermatt, A. (2015) A role for the dehydrogenase DHRS7 (SDR34C1) in prostate cancer. *Cancer Med*, 4(11), 1717-29.
- Shimodaira, M., Nakayama, T., Sato, N., Aoi, N., Sato, M., Izumi, Y., Soma, M. & Matsumoto, K. (2010) Association of HSD3B1 and HSD3B2 gene polymorphisms with essential hypertension, aldosterone level, and left ventricular structure. *Eur J Endocrinol*, 163(4), 671-80.
- Sorokina, M., Stam, M., Médigue, C., Lespinet, O. & Vallenet, D. (2014) Profiling the orphan enzymes. *Biol Direct*, 9, 10.
- Stepanov, I., Upadhyaya, P., Carmella, S. G., Feuer, R., Jensen, J., Hatsukami, D. K. & Hecht, S. S. (2008) Extensive metabolic activation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(7), 1764-1773.
- Ter-Minassian, M., Asomaning, K., Zhao, Y., Chen, F., Su, L., Carmella, S. G., Lin, X., Hecht, S. S. & Christiani, D. C. (2011) Genetic variability in the metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). *Int J Cancer*, 130(6), 1338-1346.

- Trauger, J. W., Jiang, A., Stearns, B. A. & LoGrasso, P. V. (2002) Kinetics of allopregnanolone formation catalyzed by human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type III (AKR1C2). *Biochemistry*, 41(45), 13451-9.
- Tsin, A., Betts-Obregon, B. & Grigsby, J. G. (2018) Visual cycle proteins: structure, function, and roles in human retinal disease. *J Biol Chem*, in press, doi: 10.1074/jbc.AW118.003228.
- Verma, K., Zang, T., Gupta, N., Penning, T. M. & Trippier, P. C. (2016) Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines. *ACS Med Chem Lett*, 7(8), 774-9.
- Walker, E. A. & Stewart, P. M. (2003) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab*, 14(7), 334-339.
- Wang, X., Abdelrahman, D. R., Zharikova, O. L., Patrikeeva, S. L., Hankins, G. D., Ahmed, M. S. & Nanovskaya, T. N. (2010) Bupropion metabolism by human placenta. *Biochem Pharmacol*, 79(11), 1684-1690.
- Wang, X., Gerard, C., Theriault, J. F., Poirier, D., Doillon, C. J. & Lin, S. X. (2015) Synergistic control of sex hormones by 17beta-HSD type 7: a novel target for estrogen-dependent breast cancer. *J Mol Cell Biol*, 7(6), 568-579.
- Weber, S., Salabei, J. K., Möller, G., Kremmer, E., Bhatnagar, A., Adamski, J. & Barski, O. A. (2015) Aldo-keto Reductase 1B15 (AKR1B15): a mitochondrial human aldo-keto reductase with activity toward steroids and 3-keto-acyl-CoA conjugates. *J Biol Chem*, 290(10), 6531-45.
- Wilk-Zasadna, I., Bernasconi, C., Pelkonen, O. & Coecke, S. (2015) Biotransformation in vitro: An essential consideration in the quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation (QIVIVE) of toxicity data. *Toxicology*, 332, 8-19.
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L. & Maser, E. (2003) Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem Biol Interact*, 143-144, 459-468.
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L. & Maser, E. (2004) The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Toxicology*, 197(3), 253-261.
- Wu, X., Li, X., Fu, Q., Cao, Q., Chen, X., Wang, M., Yu, J., Long, J., Yao, J., Liu, H., Wang, D., Liao, R. & Dong, C. (2017) AKR1B1 promotes basal-like breast cancer progression by a positive feedback loop that activates the EMT program. *J Exp Med*, 214(4), 1065-1079.
- Yang, S., Jan, Y. H., Mishin, V., Heck, D. E., Laskin, D. L. & Laskin, J. D. (2017) Diacetyl/l-Xylulose Reductase Mediates Chemical Redox Cycling in Lung Epithelial Cells. *Chem Res Toxicol*, 30(7), 1406-1418.
- Yang, X., Hua, W., Ryu, S., Yates, P., Chang, C., Zhang, H. & Di, L. (2018) 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 Human Tissue Distribution, Selective Inhibitor, and Role in Doxorubicin Metabolism. *Drug Metab Dispos*, 46(7), 1023-1029.

Zhang, J., Gong, Y. & Yu, Y. (2010) PG F(2 $\alpha$ ) Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol*, 1, 116.

Zhang, W., Wang, L., Zhang, L., Chen, W., Chen, X., Xie, M., Yan, G., Hu, X., Xu, J. & Zhang, J. (2014) Synthesis and biological evaluation of steroidal derivatives as selective inhibitors of AKR1B10. *Steroids*, 86, 39-44.

Zhong, L., Liu, Z., Yan, R., Johnson, S., Zhao, Y., Fang, X. & Cao, D. (2009) Aldo-keto reductase family 1 B10 protein detoxifies dietary and lipid-derived alpha, beta-unsaturated carbonyls at physiological levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 387(2), 245-250.



## 7. Soubor publikovaných prací

**P1: Skarydova, L., Skarka, A., Solich, P., Wsol, V. (2010)**  
Enzyme stereospecificity as a powerful tool in searching for new enzymes. *Curr Drug Metab*, 11(6), 547–559.

**P2:** Skarka, A., Škarydova, L., Štambergová, H., Wsól, V. (2011) Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*, 191, 66–74.

**P3: Skarydova, L., Nobilis, M., Wsol, V. (2013) The role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone. *Xenobiotica*, 43(4), 346–354.**

**P4: Skarydova, L., Zverinova, M., Stambergova, H., Wsol, V.** (2013) A simple identification of novel carbonyl reducing enzymes in the metabolism of the tobacco specific carcinogen NNK. *Drug Metab Lett*, 6(3), 174–181.

**P5: Skarydova, L., Tomanova, R., Havlikova, L., Stambergova, H., Solich, P., Wsol, V. (2014) Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metab Pharmacokinet*, 29(2), 177–84.**

**P6: Skarydova, L., Zivna, L., Xiong, G., Maser, E., Wsol, V. (2008)**  
AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary  
flavonoids. *Chem Biol Interact*, 178, 138–144.

**P7: Skarydova, L.,** Hofman, J., Chlebek, J., Havrankova, J., Kosanova, K., Skarka, A., Hostalkova, A., Plucha, T., Cahlikova, L., Wsol, V. (2014) Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 24(143), 250–258.

**P8: Zemanova, L.,** Hofman, J., Novotna, E., Musilek, K., Lundova, T., Havrankova, J., Hostalkova, A., Chlebek, J., Cahlikova, L., Wsol, V. (2015) Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *J Nat Prod*, 25, 78(11), 2666–2674.



**P9:** Hulcova, D., Breiterova, K., **Zemanova, L.**, Siatka, T., Safratova, M., Vaneckova, N., Hostalkova, A., Wsol, V., Cahlikova, L. (2017) AKR1C3 Inhibitory Potency of Naturally-occurring Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types, *Nat Prod Commun*, 12, 2, 245–246.

**P10: Skarydova, L., Skarka, A., Novotna, R., Zivna, L., Martin, H.J., Wsol, V., Maser, E. (2009) Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology*, 264(1-2), 52-60.**

**P11: Skarydova, L.,** Andrys, R., Holubova, L., Stambergova, H., Knavova, J., Wsol, V., Bilkova, Z. (2013) Efficient isolation of carbonyl-reducing enzymes using affinity approach with anticancer drug oracin as specific ligand. *J Sep Sci*, 36(7), 1176-1184.

**P12:** Andrys, R., **Zemanova, L.**, Lenco, J., Bilkova, Z., Wsol, V. (2015) Carbonyl reducing enzymes as targets of a drug-immobilized affinity carrier. *Chem Biol Interact*, 234, 169–77.

**P13: Skarydova, L., Wsol, V. (2012.)** Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics – well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metab Rev*, 44(2), 173–191.

**P14:** Stambergova, H., **Skarydova, L.**, Dunford, J.E., Wsol, V. (2014) Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem Biol Interact*, 207, 52–57.

**P15:** Skarka, A., **Skarydova, L.**, Stambergova, H., Wsól, V. (2014) Purification and reconstitution of human membrane-bound DHRS7 (SDR34C1) from *Sf9* cells. *Protein Expr Purif*, 95, 44–49.

**P16:** Lundova, T., **Zemanova, L.**, Malcekova, B., Skarka, A., Stambergova, H., Havrankova, J., Safr, M., Wsol, V. (2015) Molecular and Biochemical characterization of human dehydrogenase/reductase member 3 (DHRS3). *Chem Biol Interact*, 234, 178–187.



**P17:** Stambergova, H., **Zemanova, L.**, Lundova, T., Malcekova, B., Skarka, A., Safr, M., Wsol, V. (2016) Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids?. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 155, 112–119.

**P18:** Lundova, T., Štambergova, H., **Zemanova, L.**, Svobodova, M., Havrankova, J. Safr, M., Wsol, V. (2016) Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8 (DHRS8): description and evaluation of its biochemical properties. *Mol Cell Biochem*, 411 (1-2), 35-42.

**P19: Zemanová, L.,** Kirubakaran, P., Pato, I.H., Štambergová, H., Vondrášek, J. (2017) The identification of new substrates of human DHRS7 by molecular modeling and *in vitro* testing. *Int J Biol Macromol*, 105(1), 171–182.

**P20: Zemanová, L.,** Navrátilová, H., Andrýs, R., Šperková, K., Andrejs, J., Kozáková, K., Meier, M., Moller, G., Novotná, E., Šafr, M., Adamski, J., Wsól, V. (2018) Initial characterization of human DHRS1 (SDR19C1), a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Steroid Biochem Mol Biol*, in press, doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.07.013.

