

Abstrakt

Redukce je opakem oxidace a může jí být buď ztráta atomu kyslíku, nebo získání dvou atomů vodíku. Redukce karbonylové skupiny xenobiotik byla hlavním tématem této práce.

V naší práci jsme se pokusili identifikovat a charakterizovat lidské karbonylreduktázy zodpovědné za deaktivaci protinádorových léčiv. Rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí v rozvinutých zemích, proto je hledání nových a efektivních způsobů léčby velmi důležité. Inhibice enzymů, které se mohou podílet na rozvoji choroby nebo jejích relapsů a/nebo snížení účinnosti terapie deaktivací léčiv, může být způsobem, jak zlepšit léčbu a snad i snížit dávky léčiv a tím i incidenci nežádoucích účinků cytostatik.

V první části našeho projektu jsme se soustředili na rozpustnou cytosolickou reduktázu, AKR1C3. Tento enzym se účastní metabolismu pohlavních hormonů a může hrát důležitou roli v rozvoji rakoviny prsu a prostaty. Testovali jsme její schopnost metabolizovat protinádorová léčiva inkubací s oracinem a doxorubicinem a následným stanovením metabolitů pomocí HPLC. Podařilo se nám prokázat, že AKR1C3 je schopná deaktivovat doxorubicin s K_m 355 μM a oracin s K_m 110 μM . AKR1C3 tedy může ovlivnit protinádorovou terapii, zejména pokud je její exprese v zasažené tkáni zvýšená.

Druhá část projektu byla zaměřena na purifikaci nové lidské jaterní mikrosomální reduktázy použitím ÄKTA chromatografického systému. Použili jsme řadu chromatografických technik (iontově výměnná, afinitní chromatografie, gelová filtrace, elektrofocusing) a separačních metod. Oracin byl použit jako modelový substrát pro stanovení redukční aktivity. SDS-PAGE a Nativní PAGE byly důležité pro určení čistoty frakcí získaných purifikací, aktivní proužky byly analyzovány použitím Maldi-Tof. Pro stanovení obsahu proteinu ve vzorcích byly využity dvě metody, BCA a stanovení bílkoviny dle Bradforda.

Testovali jsme řadu separačních metoda podmínek, některé byly na pracovišti zavedeny a použity v dalších experimentech, jiné byly vyloučeny. Během tohoto dlouhého procesu jsme sledovali několik vodítek a díky práci celého týmu se nám podařilo částečně purifikovat novou lidskou membránově vázanou reduktázu, která je schopná metabolizovat protinádorové léčivo oracin.