

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VÝVOJ A APLIKACE AFINITNÍHO NOSIČE PRO IZOLACI
LIDSKÝCH KARBONYL-REDUKUJÍCÍCH ENZYMŮ**

Disertační práce

Školitel: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Odborný konzultant: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Mgr. Rudolf Andrýs

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Rudolf Andrýs

Děkuji tímto za finanční podporu Grantové agentuře Univerzity Karlovy (GAUK 926213/C/2013), Evropskému sociálnímu fondu a státnímu rozpočtu České republiky (TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235) a Univerzitě Karlově (SVV 260 186).

Děkuji především mému školiteli prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., dále pak mé poděkování patří RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D. za hodnotné rady a odbornou pomoc během vypracování této práce. V neposlední řadě mé poděkování patří všem členům Katedry biochemických věd za přínosné rady a vytváření přátelské atmosféry po celou dobu mého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Rudolf Andrýs
Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název disertační práce:

VÝVOJ A APLIKACE AFINITNÍHO NOSIČE PRO IZOLACI LIDSKÝCH KARBONYL-REDUKUJÍCÍCH ENZYMŮ

Již po několik tisíciletí tvoří základ lidské medicíny malé bioaktivní molekuly, které byly podávány ve formě rostlinných extraktů nebo syntetický připravených sloučenin. Jejich využití v moderní lékařské vědě ovšem není možné bez detailního porozumění jejich biochemických účinků a identifikace jejich molekulárních cílů. Metody chemické proteomiky, založené na specifické interakci mezi bioaktivní látkou a cílovou molekulou, patří v současné době k nejpoužívanějším technikám při identifikaci molekulárních cílů malých molekul. Oproti klasickým biochemickým metodám (např. 2D elektroforéza) se jedná o citlivé a především velmi selektivní techniky, díky kterým lze z komplexních biologických vzorků úspěšně identifikovat i biomolekuly, které se přirozeně vyskytují jen ve velmi malých koncentracích. Takovými biomolekulami jsou i karbonyl-redukující enzymy, které představují fyziologicky důležitou skupinu proteinů, jelikož se podílí na metabolismu řady endogenních (např. prostaglandiny, steroidní hormony) i xenobiotických (např. antracykliny, oracin) sloučenin. I když je většina dosud charakterizovaných karbonyl-redukujících enzymů cytosolických, v nadrodině dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) se nachází i řada membránově vázaných zástupců. Znalosti o jejich podílu na metabolismu xenobiotik ale zatím nejsou příliš velké. Výzkumem stereospecifity redukce potenciálního protinádorového léčiva oracinu však byla zjištěna přítomnost dosud neznámých mikrosomálních karbonyl-redukujících enzymů, které se podílí na jeho metabolismu. Dosavadní pokusy o jejich purifikaci ovšem skončily nezdarem. Ačkoli byly získány proteinové frakce, které vykazovaly metabolickou aktivitu vůči oracinu i požadovanou stereospecifitu

jeho redukce, využitím neselektivních purifikačních technik (iontově-výměnná chromatografie, hydrofobně-interakční chromatografie) nebylo možné obsažené enzymy získat v dostatečném množství a čistotě pro jejich následnou identifikaci pomocí MS.

Cílem tohoto projektu bylo vytvoření originálního afinitního nosiče schopného selektivně izolovat karbonyl-redukující enzymy z komplexních biologických vzorků. Za tímto účelem byla testována sada magnetických i nemagnetických částic, na které bylo různými způsoby imobilizováno potenciální protinádorové léčivo oracin. Afinitní nosič s nejlepšími vlastnostmi byl následně testován se sérií čistých rekombinantně připravených enzymů a s buněčnými homogenáty obsahujícími overexprimované cílové enzymy. Ve všech případech bylo prokázáno, že námi připravený afinitní nosič s imobilizovaným léčivem oracinem byl schopen izolovat karbonyl-redukující enzymy, které mají afinitu vůči oracinu. Afinitní nosič byl následně zařazen do purifikačního protokolu membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů z lidské jaterní tkáně. Byly tak získány proteinové frakce s metabolickou aktivitou vůči oracinu i požadovanou stereospecifitou jeho redukce. Metodou hmotnostní spektrometrie byly v těchto frakcích následně identifikovány mikrosomální enzymy DHRS1, RDH16 a 17 β -HSD6 bez známé afinity a metabolické aktivity vůči oracinu. Dále byl identifikován enzym 11 β -HSD1, u kterého byla afinita vůči oracinu popsána již dříve. U enzymů DHRS1 a RDH16 byla afinita vůči oracinu následně potvrzena u rekombinantně připravených enzymů. Tyto rekombinantní formy ale zatím bohužel nepotvrdili významnou metabolickou aktivitu vůči tomuto léčivu. Potvrzení jejich afinity vůči tomuto xenobiotickému substrátu ovšem může naznačovat jejich další potenciální roli v biotransformaci jiných xenobiotik.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Rudolf Andryš
Supervisor: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D

Title of dissertation thesis:

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AFFINITY CARRIER FOR ISOLATION OF HUMAN CARBONYL-REDUCING ENZYMES

For several millennia the human medicine is based on application of small bioactive molecules that are administered in the form of plant extracts or synthetic compounds. However, their use in modern medicine is not possible without a detailed understanding of their biochemical effects and identification of their molecular targets. Chemical proteomics based on the specific recognition between the bioactive molecule and the target molecule is currently the most widely used techniques for identification of molecular targets of small molecules. Compared to conventional biochemical methods (e.g. 2D electrophoresis), chemical proteomics represents particularly sensitive and very selective technique that enable successful identification of biomolecules from complex biological samples that are naturally presented in very small concentrations. Carbonyl-reducing enzymes, which play an important role in physiology due to their involvement in metabolism of various endogenous (e.g. prostaglandins, steroid hormones) and xenobiotic (e.g. anthracyclines, oracin) substrates, also represent such low abundance biomolecules. Although the majority of today known carbonyl-reducing enzymes represent soluble proteins, there are many membrane-bound members in short chain dehydrogenases/reductases (SDR) superfamily. However, the knowledge on their role in metabolism of xenobiotics is quite poor. Based on the research on the reduction stereospecificity of anticancer drug oracin, there were predicted microsomal carbonyl-reducing enzymes involved in the metabolism and inactivation. However, previous attempts to purify these enzyme failed. Although

the obtained protein fractions exhibited metabolic activity towards oracin with desired stereospecificity, using non-selective purification techniques (ion-exchange chromatography, hydrophobic-interaction chromatography) was not possible to obtain desired enzymes in sufficient quantity and purity for their subsequent identification by MS.

The aim of this project was to develop suitable affinity carrier capable to selectively purify carbonyl-reducing enzymes from complex biological samples. For this purpose several types of magnetic and non-magnetic beads were modified with anticancer drug oracin to form an affinity carrier. The carrier showing the best binding capacity was subsequently tested with a series of pure carbonyl-reducing enzymes and complex biological samples. The in-house developed affinity carrier was able to capture carbonyl-reducing enzymes having affinity towards oracin in all cases. Thus, affinity carrier was implemented into purification protocol of human microsomal carbonyl-reducing enzymes. Obtained fractions exhibited metabolic activity towards oracin with desired stereospecificity of its reduction. Using mass spectrometry proteins DHRS1, RDH16 and 17 β -HSD6, with unknown affinity and metabolic activity towards oracin were successfully isolated and identified. Furthermore, enzyme 11 β -HSD1 with already described affinity towards oracin was identified too. The affinity of enzymes DHRS1 and RDH16 towards oracin was subsequently demonstrated by using recombinant proteins. Although these recombinant proteins have not confirmed significant metabolic activity of this drug yet, their isolation and identification as its potential molecular target may indicate their role in biotransformation of other xenobiotics.

OBSAH

ÚVOD.....	12
1. TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1. Karbonyl-redukující enzymy v metabolismu xenobiotik.....	13
1.1.1. Aldo-ketoreduktasy (AKR)	15
1.1.2. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)	17
1.1.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	18
1.1.3.1. Mikrosomální enzymy s potenciální rolí v redukčním metabolismu xenobiotik	21
1.2. Metody izolace a identifikace cílových proteinů.....	23
1.2.1. Profilování proteinů na základě aktivity (ABPP)	25
1.2.2. Chemická proteomika založená na afinitní chromatografii (CCCP)	27
1.2.2.1. Stacionární fáze používané při afinitních chromatografiích.....	28
1.2.2.2. Ligandy pro syntézu afinitního nosiče.....	29
1.2.2.3. Spojovací raménka	31
1.2.2.4. Provedení afinitní chromatografie	33
1.3. Oracin jako ligand pro přípravu afinitního nosiče na izolaci lidských karbonyl-redukujících enzymů.....	38
1.3.1. Biotransformace oracinu.....	38
1.3.1.1. Biotransformace oracinu v lidské jaterní tkáni.....	39
2. CÍL PRÁCE	41
3. MATERIÁLY A METODY	42
3.1. Biologický materiál	42
3.1.1. Lidská jaterní tkáň	42
3.1.2. Rekombinantně připravené enzymy	42
3.2. Chemikálie	42
3.3. Stacionární fáze pro přípravu afinitních nosičů	44
3.4. Přístrojové vybavení.....	44
3.5. Metody.....	45

3.5.1. Modifikace struktury oracinu	45
3.5.2. Příprava afinitních nosičů s ligandem oracinem.....	46
3.5.2.1. Vazba spojovacích ramének na stacionární fáze karbodiimidovou metodou.....	47
3.5.2.2. Vazba spojovacího raménka Jeffaminu ED-600 na povrch Perlózy MG reduktivní aminací.....	47
3.5.2.3. Imobilizace oracinu na povrch stacionární fáze Mannichovou kondenzací.....	48
3.5.2.4. Imobilizace oracinu na povrch stacionární fáze aminolýzou esteru.	49
3.5.2.5. Stanovení účinnosti imobilizace oracinu na povrch stacionárních fází.....	49
3.5.3. Zpracování vzorků lidské jaterní tkáně	50
3.5.3.1. Příprava jaterních subcelulárních frakcí	50
3.5.3.2. Solubilizace lidských jaterních mikrosomů	50
3.5.3.3. Odsolení a následná separace solubilizovaných mikrosomů pomocí iontově výměnné chromatografie.....	50
3.5.3.4. Předčištění lidského jaterního cytosolu gelovou filtrací	51
3.5.4. Zpracování mikrosomálních frakcí z <i>Sf9</i> hmyzích buněčných linií s rekombinantně připraveným enzymem.....	51
3.5.4.1. Solubilizace mikrosomálních frakcí.....	51
3.5.4.2. Purifikace rekombinantně připravených proteinů.....	51
3.5.4.3. Odstranění imidazolu z roztoku purifikovaných proteinů	51
3.5.5. Afinitní chromatografie.....	52
3.5.5.1. Původní protokol afinitní chromatografie	52
3.5.5.2. Modifikovaný protokol afinitní chromatografie	52
3.5.5.3. Afinitní chromatografie komplexních biologických vzorků	52
3.5.5.4. Afinitní chromatografie na nemagnetickém nosiči.....	53
3.5.6. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza	53
3.5.7. Western blot analýza elučních frakcí po afinitní chromatografii	54
3.5.8. Digesce proteinů z gelu pro hmotnostní spektrometrii	54
3.5.9. Hmotnostně spektrometrická analýza štěpených proteinů	55

3.5.10. Stanovení metabolické aktivity frakcí	55
3.5.10.1. Inkubace frakcí s oracinem	55
3.5.10.2. Podmínky UHPLC analýza metabolitů oracinu.....	55
3.5.10.3. HPLC analýza enantiomerů.....	56
3.5.11. Stanovení koncentrace bílkoviny	56
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	57
4.1. Strategie přípravy afinitního nosiče.....	57
4.1.1. Potvrzení účinnosti imobilizace oracinu na povrch stacionárních fází... 62	
4.2. Ověření funkčnosti připravených afinitních nosičů.....	63
4.2.1. Afinitní nosiče s oracinem imobilizovaným Mannichovou kondenzací... 63	
4.2.1.1. Stanovení schopnosti afinitního nosiče AN02 zachytit enzym CBR1 65	
4.2.2. Afinitní nosiče s oracinem imobilizovaným aminolýzou oracinu	66
4.2.2.1. Stanovení schopnosti afinitního nosiče AN05 zachytit enzym CBR1 68	
4.3. Ověření selektivity vybraného afinitního nosiče AN05	69
4.4. Modifikace separačního protokolu	70
4.4.1. Modifikace vazebných a elučních podmínek	72
4.4.2. Úprava eluční strategie	73
4.5. Test univerzálnosti afinitního nosiče AN05 se známými cytosolickými enzymy	77
4.6. Nemagnetický afinitní nosič AN08.....	79
4.6.1. Modifikace imobilizační strategie oracinu.....	79
4.6.2. Afinitní chromatografie.....	80
4.7. Afinitní chromatografie modelového biologického vzorku s nosičem AN05. 81	
4.7.1. Modifikace protokolu afinitní chromatografie pro komplexní vzorky	82
4.7.2. Stanovení nespecifických interakcí s povrchem afinitního nosiče	84
4.8. Izolace karbonyl-redukujících enzymů z lidského jaterního cytosolu.....	85
4.8.1. Gelová filtrace	86
4.8.2. Afinitní chromatografie.....	87

4.9. Izolace membránových karbonyl-redukujících enzymů z lidských jaterních mikrosomů.....	90
4.9.1. První purifikační krok na Q-Sepharose.....	91
4.9.2. Afinitní chromatografie frakce FT po Q-Sepharose	92
4.9.2.1. Stanovení nespecifických interakcí s povrchem afinitního nosiče....	95
4.9.3. Afinitní chromatografie frakce Q12.....	96
4.9.3.1. Stanovení nespecificky interagujících proteinů.....	100
4.9.3.2. Charakterizace rekombinantního enzymu RDH16.....	102
4.9.3.3. Charakterizace rekombinantní formy enzymu DHRS1	104
5. ZÁVĚR	107
6. SEZNAM ZKRATEK.....	108
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	110
8. PŘÍLOHY	122
8.1. Publikace vztahující se k tématu disertační práce	122
8.1.1. Publikace I.....	123
8.1.2. Publikace II	133
8.2. Ostatní publikace v časopisech s impaktním faktorem.....	143

ÚVOD

Již téměř 50 let představuje afinitní chromatografie unikátní purifikační strategii, která v mnohých ohledech předčí jiné purifikační techniky založené na pH, iontové síle nebo hydrofilitě. Jedná se totiž o jedinou techniku, která je schopna purifikovat biomolekuly na základě jejich biologické funkce nebo jedinečných strukturních rysů. Díky této velmi specifické interakci je metoda afinitních chromatografie vhodnou technikou pro izolaci biomolekul, které se obvykle vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Takovými biomolekulami jsou například karbonyl-redukující enzymy, které hrají důležitou roli v metabolismu řady endogenních i xenobiotických látek. I přes jejich značný význam stále existuje mnoho zástupců, o kterých máme pouze částečné informace nebo dokonce vůbec žádné. Velkou část těchto málo popsaných enzymů tvoří především membránově vázaní zástupci, jejichž studium s sebou přináší mnohé obtíže jako je například nutnost jejich solubilizace pomocí detergentů. K charakterizaci takových enzymů je nicméně zapotřebí čistého proteinu, který lze z biologických materiálů získat pouze purifikací.

Tato práce navazuje na výzkum Katedry biochemických věd v oblasti identifikace a charakterizace nových lidských membránově vázaných enzymů, účastnících se metabolismu xenobiotik.

1. TEORETICKÁ ČÁST

Ačkoli genomové studie přinesly v posledním desetiletí mnoho nových informací, neříkají nám bohužel nic o funkci nebo biochemických vlastnostech samotných kódovaných proteinů. Na druhou stranu i mnohé klasické biochemické metody (např. 2D elektroforéza nebo inkubace se substrátem), které mohou odhalit roli proteinů v metabolických drahách, mají jistá omezení. Zřejmě tím největším obvykle bývá vysoká komplexnost biologických vzorků, takže minoritní proteiny mohou být snadno maskovány těmi hojně se vyskytujícími (Miao *et al.*, 2012). K jasné charakterizaci je proto zapotřebí čistého proteinu. I jednoprocentní znečištění jinak čistého vzorku může nicméně výrazně zkreslit výsledky měření (Ward and Swiatek, 2009). Získání purifikovaného proteinu z komplexních biologických vzorků často velmi složité, a to zejména v případě membránově vázaných proteinů. Ve skupině lidských membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů byl z tkání například dosud úspěšně purifikován pouze jediný zástupce; 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (Maser *et al.*, 2002). Další pokusy o purifikaci nových lidských membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů, s aktivitou vůči xenobiotikům, provedené Škarydovou *et al.* (Škarydová *et al.*, 2009) skončily nezdarem. I když byly autoři schopni získat proteinovou frakci s požadovanými biochemickými vlastnostmi, nepodařilo se jim identifikovat obsažené enzymy. Vzhledem k fyziologickému významu karbonyl-redukujících enzymů v metabolismu endogenních i xenobiotických substrátů, bylo vytvoření citlivé separační techniky, která by umožnila jejich selektivní izolaci z komplexních biologických vzorků, velmi potřebné.

1.1. Karbonyl-redukující enzymy v metabolismu xenobiotik

Karbonylové funkční skupiny (aldehydy, ketony a chinony) jsou běžnou součástí jak endogenních (např. steroidy, prostaglandiny, hormony), tak xenobiotických látek (např. farmaka nebo polutanty životního prostředí) a často jsou zodpovědné za vlastní biologický účinek takových sloučenin. Tyto funkční skupiny jsou zároveň poměrně reaktivní. Díky svému elektrofilnímu charakteru se jednotlivé látky mohou vázat na nukleofilní biologické makromolekuly (např. lipidy

nebo nukleové kyseliny) a působit tak toxicky. Enzymy zodpovědné za detoxifikaci těchto reaktivních karbonylových sloučenin tak hrají klíčovou úlohu v regulaci jejich biologických účinků (Oppermann, 2007) a představují důležité proteiny I. fáze biotransformace. Řadíme mezi ně proteiny z několika nadrodin: aldehyddehydrogenasy (ALDH), aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a NAD(P)H-dependentní chinonreduktasy (QR). (Tab. 1). Bylo nicméně zjištěno, že většina enzymů podílejících se na redukčním metabolismu karbonylových sloučenin náleží do nadrodin AKR a SDR (Rosemond and Walsh, 2004; Matsunaga *et al.*, 2006; Hoffmann and Maser, 2007).

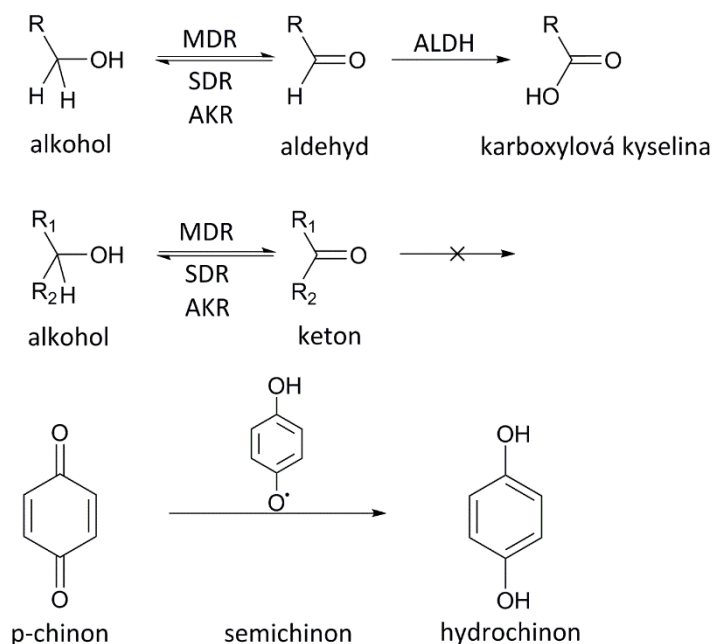
Tab. 1: Hlavní nadrodiny enzymů podílejících se na metabolismu karbonylových sloučenin (Rosemond and Walsh, 2004; Matsunaga *et al.*, 2006; Hoffmann and Maser, 2007).

Enzymy	Preferovaný kofaktor	Subcelulární lokalizace
AKR	NAD(P)H	cytosol, Golgiho aparát, mitochondrie
MDR	NADH	cytosol
SDR	NAD(P)H	cytosol, mikrosomy, mitochondrie, peroxisomy
QR	NAD(P)H, RNH	cytosol

Zatímco aldehydy mohou být metabolizovány na příslušné alkoholy nebo karboxylové kyseliny, ketony mohou podstupovat pouze redukční reakce. Chinony jsou redukovány na příslušné semichinony a hydrochinony (Obr. 1). Vzniklé produkty jsou méně reaktivní, polárnější než původní látky a jsou i lepšími substráty pro konjugační enzymy II. fáze biotransformace (např. glukuronidasy nebo glutathion-S-transferasy), díky čemuž je umožněna jejich exkrece z organismu. (Hoffmann and Maser, 2007; Penning and Drury, 2007).

Karbonyl-redukující enzymy ke své funkci potřebují přítomnost kofaktorů (donorů protonu) nikotinamidadeninukleotidu (NADH) nebo nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH). Chinonreduktasy dále jako kofaktoru využívají mimo jiné i dihydronikotinamidribosu (RNH) (Rosemond and Walsh, 2004). V závislosti na použitém kofaktoru jsou tyto enzymy v *in vitro*

podmínkách schopné katalyzovat jak redukční tak oxidační reakce. V *in vivo* podmínkách ovšem převažuje pouze jeden z možných metabolických směrů.



Obr. 1: Hlavní metabolické přeměny aldehydů, ketonů a chinonů pomocí enzymů zodpovědných za biotransformaci karbonylových sloučenin. Aldehydy jsou působením AKR a SDR enzymů redukovány na alkoholy nebo oxidovány aldehyddehydrogensami na karboxylové kyseliny, zatímco ketony mohou být pouze redukovány na příslušné alkoholy. Chinony jsou redukovány chinonreduktasami na příslušné hydrochinony (upraveno dle Oppermann, 2007).

1.1.1. Aldo-ketoreduktasy (AKR)

Aldo-ketoreduktasy jsou převážně monomerní cytosolické, NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy s molekulovou hmotností 34-37 kDa (Jez *et al.*, 1997). Enzymy této nadrodiny se nacházejí téměř u všech živých organismů (např. rostliny, bakterie, kvasinky, hmyz, ryby, savci) včetně člověka a vyznačují se širokou substrátovou specifikou. Mezi jejich substráty patří sacharidy, lipidy, steroidy, prostaglandiny stejně tak jako mnohá léčiva, nitrosaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky nebo aldehyd aflatoxinu (Penning, 2015).

V současné době je známo kolem 190 AKR proteinů, které se na základě sekvenční podobnosti a biologické funkce dále dělí do 16 rodin a 4 podrodin (A, B, C, D) (AKR Superfamily, 2015). V jednotlivých rodinách sdílejí proteiny více jak 40% sekvenční podobnost, přičemž pro zařazení do stejné podrodiny musí proteiny sdílet více jako 60% podobnost (Jez and Penning, 2001). Společným znakem všech proteinů této nadrodiny jsou (α/β)₈-soudek, který se skládá z osmi α-helixů a osmi β-skládaných listů a tetráda aminokyselin v aktivním místě (Y-H-D-K).

U člověka bylo dosud identifikováno 15 zástupců (Tab. 2) (Penning, 2015). Podíl na metabolismu xenobiotických substrátů byl nejpodrobněji popsán u zástupců podrodiny **AKR1C**. Všechny 4 enzymy jsou exprimovány v játrech, ale mimo tento orgán je jejich distribuce odlišná. Zatímco enzym AKR1C4 je exprimován téměř výhradně v játrech, enzymy AKR1C2 a AKR1C3 se v největší míře nacházejí v prostatě a mléčné žláze (Penning *et al.*, 2004). Fyziologickými substráty těchto enzymů jsou především steroidy, kde katalyzují přeměny v polohách 3 α -, 17 β - a 20 α - a dále prostaglandiny. Z xenobiotik metabolizují např. doxorubicin, daunorubicin, oracin, dolasetron, naloxon, ketotifen, 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), chinony atd. (Matsunaga *et al.*, 2006; Barski *et al.*, 2008; Novotná *et al.*, 2008).

Aktivita vůči xenobiotikům byla dobře popsána i u enzymu **AKR1B10**. Tento enzym je převážně exprimován v tenkém a tlustém střevě, játrech, brzlíku a nadledvinách (Martin *et al.*, 2006). Zároveň byla popsána jeho zvýšená exprese v nádorové tkáni plic, jater, děložního čípku a dělohy, což z tohoto enzymu činí možný biomarker nádorového bujení (Balendiran *et al.*, 2009). Ačkoli sdílí 71% sekvenční podobnost s enzymem AKR1B1, vykazuje mnohonásobně vyšší katalytickou aktivitu vůči xenobiotikům, jako jsou například methylglyoxal nebo nitrobenzaldehydy. Dále se podílí na metabolismu doxorubicinu, oracinu, NNK nebo dolasetronu (Penning, 2005; Barski *et al.*, 2008).

Metabolismus xenobiotických substrátů byl dále popsán u enzymů AKR1A1 (např. benzo[a]pyren) (Osorio-Yáñez *et al.*, 2012), AKR7A2 a AKR7A3 (např. aflatoxin B1 dialdehyd, 2-karboxybenzaldehyd, akrolein nebo methylglyoxal) (Ellis *et al.*, 1993; Barski *et al.*, 2013).

Tab. 2: Přehled lidských aldo-ketoreduktas (upraveno dle Penning, 2015).

Protein	Alternativní název
AKR1A1	Aldehydreduktasa
AKR1B1	Aldosareduktasa
AKR1B10	Aldosareduktasa tenkého střeva
AKR1B15	-
AKR1C1	3 α (20 α)-hydroxysteroiddehydrogenasa
AKR1C2	3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 3
AKR1C3	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 5
AKR1C4	3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1
AKR1D1	5 β -steroidreduktasa
AKR1E2	1,5-anhydro-D-fruktosareduktasa
AKR6A3	β 1-podjednotka draselného napětově řízeného kanálu
AKR6A5	β 2-podjednotka draselného napětově řízeného kanálu
AKR6A9	β 3-podjednotka draselného napětově řízeného kanálu
AKR7A2	Aflatoxin B1-aldehydreduktasa 1
AKR7A3	Aflatoxin B1-aldehydreduktasa 2

1.1.2. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

Nadrodina MDR je velmi rozsáhlá skupina proteinů s velmi různorodou enzymovou aktivitou, jejíž zástupci se obvykle skládají s 350 aminokyselin (Jörnvall *et al.*, 1999). Podílejí se na metabolismu, regulačních procesech a ochraně proti buněčnému poškození (Knoll, 2008). V současné době je známo téměř 500 rodin čítající více než 155 000 zástupců (Jörnvall *et al.*, 2015), kteří spolu sdílejí méně než 30% podobnost. Struktura MDR proteinů se obvykle skládá ze dvou domén, přičemž vazebné místo pro kofaktor se nachází na C-konci a je tvořena Rossmannovým záhybem s šesti paralelními β -skládanými listy mezi dvěma α -helixy. Na N-konci se nachází vazebné místo, které je tvořeno jádrem antiparalelních β -skládaných listů obklopeným α -helixy (Persson *et al.*, 2008; Hedlund *et al.*, 2010).

U člověka již bylo identifikováno 25 genů a 40 zástupců. Mezi nejznámější MDR proteiny patří mezi zinek-dependentní alkoholdehydrogenasy (ADH), chinonoxidoreduktasy (QOR), polyoldehydrogenasy a leukotrien-B4-

dehydrogenasy (Hedlund *et al.*, 2010). Zatím nejlépe prostudovanou skupinou jsou **alkoholdehydrogenasy**. V současné době rozeznáváme 6 savčích typů, přičemž u člověka byly dosud identifikovány pouze 4 typy (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4) (Estonius *et al.*, 1996). Ačkoli lidský genom obsahuje i gen pro typ ADH5, na úrovni proteinu tento enzym dosud nebyl identifikován (Ostberg *et al.*, 2014). Alkoholdehydrogenasy vykazují širokou substrátovou specifitu vůči mnohým endogenním i xenobiotickým alkoholům, které metabolizují na příslušné aldehydy (Kavanagh *et al.*, 2008). ADH1 a ADH2 jsou hlavními jaterními enzymy zodpovědnými za detoxikaci ethanolu. ADH3, též zvaná jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa, hraje důležitou roli v protekci buněk proti toxickému působení formaldehydu. U tohoto enzymu byla rovněž popsána i schopnost redukce S-nitrosoglutathionu. Na rozdíl od enzymů ADH1 a ADH2 vykazuje ADH3 jen velmi nízkou aktivitu vůči ethanolu. Poslední dosud identifikovanou lidskou alkoholdehydrogenasou je ADH4, jejímž hlavním úkolem je metabolismus ethanolu v žaludeční mukóze (Estonius *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 2008; Ostberg *et al.*, 2014; Jörnvall *et al.*, 2015).

1.1.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem představují jednu z největších a neustále se rozrůstajících nadrodin proteinů. Na rozdíl od nadrodiny AKR obsahuje jak cytosolické, tak membránově vázané zástupce (membrány endoplazmatického retikula, mitochondrii, peroxisomů). V současnosti obsahuje 464 rodin s téměř 680 000 zástupci (Persson and Kallberg, 2013; Tang and Le, 2014; Jörnvall *et al.*, 2015). Na základě specifických motivů v aktivním místě nebo v místě vážící kofaktor se dále rozlišuje 7 typů SDR proteinu: klasické (C), prodloužené (E), střední (I), divergentní (D), komplexní (X), atypické (A) a nepřiřazené (U) (Persson *et al.*, 2009; Persson and Kallberg, 2013). SDR proteiny se nacházejí u nejjednodušších jednobuněčných organismů stejně tak i u vyšších eukaryot, což jen potvrzuje jejich nezbytnost pro udržení životně důležitých metabolických pochodů (Jörnvall *et al.*, 1999). Jedná se o NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy, epimerasy a dehydrogenasy s nízkou sekvenční podobností (15-30%), obvykle se skládající z 250 aminokyselin (350 aminokyselin v případě prodloužených typů) (Matsunaga *et al.*, 2006; Moummou *et al.*, 2012). I přes svou neobvyklou

různorodost sdílejí všichni členové nadrodiny SDR několik strukturních motivů. Jedná se o vazebné místo pro kofaktor (TGxxxGxG), tetradu aminokyselin v aktivním místě (N-S-Y-K) a trojrozměrné uspořádání (α/β)-soudku s centrálním β listem tvořící typické Rossmannovo uspořádání (Persson *et al.*, 2009).

Databáze UniProt v současné době uvádí 64 potvrzených lidských SDR proteinů (UniProt, 2015), přičemž dosud bylo dobře popsáno pouze 14 zástupců. Redukční aktivita vůči xenobiotickým substrátům byla přitom dobře popsána pouze u karbonylreduktasy 1 (CBR1), karbonylreduktasy 3 (CBR3), 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 (11 β HSD1). Prvotní informace naznačují, že na reduktivním metabolismu xenobiotik by se dále mohli podílet enzymy dehydrogenasa/reduktasa 2 (DHRS2), dehydrogenasa/reduktasa 3 (DHRS3) dehydrogenasa/reduktasa 4 (DHRS4) a dehydrogenasa/reduktasa 7 (DHRS7). Úroveň poznání těchto enzymů je ale stále velmi omezená.

CBR1 (SDR21C1) je cytosolická NADPH-dependentní reduktasa se širokou substrátovou specifitou. Enzym se nachází ve vysokých koncentracích v jaterní tkáni a pokožce, což potvrzuje roli tohoto proteinu jako důležitého hráče v ochraně proti škodlivému působení xenobiotik. Distribuce tohoto enzymu ovšem není omezena jen na tkáně, které přicházejí do kontaktu s potenciálně škodlivými látkami vnějšího prostředí, což naznačuje roli tohoto proteinu i v metabolismu endogenních látek (Wirth and Wermuth, 1992). Mezi nejvýznamnější endogenní substráty patří prostaglandiny, tetrahydrobiopterin a isatin. Z xenobiotik jsou metabolizovány např. NNK, doxorubicin, daunorubicin, oracin, loxoprofen, metyrapon, haloperidol (Matsunaga *et al.*, 2006; Malátková *et al.*, 2010)

CBR3 (SDR21C2) je stejně jako CBR1 cytosolická NADPH-dependentní reduktasa s expresí ve vaječnících, slinivce, játrech a ledvinách. Enzym má mnohem užší spektrum substrátů a obvykle nižší katalytickou aktivitu nežli CBR1, nicméně hodnoty Michaelisovy konstanty pro menadion, 4-benzoylpyridin a 4-nitrobenzaldehyd byly porovnatelné nebo dokonce nižší. U enzymu byla rovněž popsána aktivita vůči anthracyklinům doxorubicinu a daunorubicinu. Jediným doposud známým endogenním substrátem je isatin (Malátková *et al.*, 2010).

11 β -HSD1 (SDR26C1) je dosud nejlépe charakterizovaný membránově vázaný karbonyl-redukující enzym, u kterého byla popsána aktivita vůči xenobiotikům. Jedná se o NADPH-dependentní oxidoreduktasu, jejíž fyziologickou funkcí je

prereceptorová regulace účinku kortikosteroidů (především kortisonu) jejich metabolickou přeměnou na aktivní 11-hydroxy formu (Odermatt and Nashev, 2010). Z xenobiotických substrátů byla popsána aktivita vůči metyraponu, prednisolonu, triadimedonu, oracinu, 4-nitrobenzaldehydu, NNK, 4-nitroacetofenonu, benfluronu a ketoprofenu (Maser *et al.*, 2006).

DHRS2 (SDR25C1) je NADPH-dependentní reduktasa se subcelulární lokalizací v cytosolu, jádře a mitochondriích. Výsledky naznačují, že tento enzym hraje roli v regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Dosud u něj byla popsána aktivita vůči třem cytotoxickým xenobiotikům hexan-3,4-dionu nebo heptan-2,3-dion a 1-fenylpropan-1,2-dionu (Gabrielli and Tofanelli, 2012).

DHRS3 (SDR16C1) je mikrosomální NAD(P)(H)-dependentní reduktasa s dominantní lokalizací v sítnici a předpokládanou účastí na metabolismu retinoidů (Haeseleer *et al.*, 1998). Mimo sítnici byla jeho exprese pozorována ve varlatech, tenkém střevě a játrech. Z xenobiotických substrátů byla popsána aktivita vůči NNK, acetoexamidu, 4-nitroacetofenonu a 1,2-difenylethan-1,2-dionu (Lundová *et al.*, 2014).

DHRS4 (SDR25C2) je peroxisomální NADPH-dependentní reduktasa, která se vyskytuje ve formě tetrameru. Na rozdíl od zvířecích forem vykazuje lidský enzym pouze nízkou aktivitu vůči retinoidům, vůči kterým jsou enzymy aktivní. Tento enzym je nicméně vysoce aktivní vůči xenobiotickým aromatickým α -dikarboxylovým sloučeninám jako je 1,2-difenylethan-1,2-dion, ale v porovnání se zvířecími enzymy postrádá aktivitu vůči alifatickým α -dikarboxylovým sloučeninám. Pouze u lidského zástupce byla popsána schopnost redukovat 3-ketosteroidy na příslušné 3 β -hydroxysteroidy, což nasvědčuje o pravděpodobné úloze enzymu v metabolismu 5 β -dihydro-3-ketosteroidů (Matsunaga *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2009).

DHRS7 (SDR34C1) je mikrosomální NAD(P)H-dependentní enzym s dosud plně neobjasněnou fyziologickou funkcí. Některé studie nicméně naznačují, že by tento enzym mohl mít podobné funkce jako 11 β -HSD1 (Keller *et al.*, 2006). Na úrovni proteinu i mRNA je enzym exprimován v mnoha tkáních jako jsou játra, srdeční sval, kosterní svalstvo, sítnice, prostata a nadledviny. Dosud byla popsána redukční aktivita vůči některým steroidům (estron, kortison, 4-androsten-3,17-

dione), z xenobiotik pak 1,2-naftochinonu, 4-nitrobenzaldehydu, NNK a dalším (Štambergová *et al.*, 2014, Štambergová *et al.*, 2015).

1.1.3.1. Mikrosomální enzymy s potenciální rolí v redukčním metabolismu xenobiotik

Ačkoli hrají cytosolické enzymy důležitou roli v biotransformaci xenobiotik, díky svému mnohdy lipofilnímu charakteru se tyto látky preferenčně distribuují v membránách bohatých na lipidy. V membráně endoplazmatického retikula se nacházejí dva důležité enzymatické systémy I. fáze biotransformace, cytochrom P450 (CYP) a flavinové monooxygenasy (FMO). Předpokládá se, že 9 z 10 dnes používaných léčiv je metabolizováno některou z isoform systémů CYP (Škarydová and Wsól, 2012). S výjimkou enzymu CYP2E1 ale tyto enzymy katalyzují převážně oxidační reakce. Jelikož karbonylové sloučeniny rovněž splňují požadavek lipofily a s tím spojené pravděpodobnosti distribuce v biologických membránách, mikrosomální karbonyl-redukující enzymy by rovněž mohly představovat důležité enzymy I. fáze biotransformace. Většina z nich ovšem byla dosud charakterizována pouze ve vztahu k endogenním substrátům nebo nebyla charakterizována vůbec.

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (11 β -HSD)

V současné době jsou známy 3 enzymy 11 β -HSD; 11 β -HSD1 (SDR26C1), 11 β -HSD2 (SDR9C3) a 11 β -HSD3 (SDR26C2). Fyziologickou funkcí isoform 1 a 2 je prerreceptorová regulace účinku kortikosteroidů a to především v tkáni nadledvin. Zatímco enzym 11 β -HSD1 katalyzuje jak redukční, tak dehydrogenasovou aktivitu vůči kortisonu, enzym 11 β -HSD2 vykazuje pouze dehydrogenasovou aktivitu (Odermatt and Nashev, 2010). Enzym 11 β -HSD3 byl charakterizován jako NADP⁺-dependentní kortisoldehydrogenasa s unikátní tkáňovou expresí v mozku. Informace o tomto jsou ovšem stále poměrně malé a aktivita vůči xenobiotikům dosud nebyla testována (Odermatt and Nashev, 2010; Ohno *et al.*, 2013).

Retinoldehydrogenasy (RDH)

Retinoldehydrogenasy jsou NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, jejichž fyziologickou funkcí se zdá být účast na metabolismu retinoidů. Dosud bylo identifikováno 11 lidských zástupců s expresí v sítnici, játrech, plicích, ledvinách atd. S výjimkou mitochondriálního RDH13 (SDR7C3) jsou zbylé retinoldehydrogenasy

vázány na membrány endoplazmatického retikula. V závislosti na preferovaném kofaktoru katalyzují RDH enzymy oxidační nebo redukční reakce, přičemž, u pěti zástupců převládá redukční metabolismus. Jsou jimi RDH11 (SDR7C1), RDH12 (SDR7C2), RDH14 (SDR7C4), RDH17(DHRS3, SDR16C1) (viz 1.1.3.) a RDH8 (SDR28C2). Mimo enzymu RDH17 ovšem u žádného z nich dosud nebyla popsána aktivita vůči xenobiotickým substrátům (Haeseleer *et al.*, 2002; Lidén and Eriksson, 2006; Lundová *et al.*, 2014).

17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD)

Lidské 17 β -HSD jsou NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, které hrají klíčovou úlohu v metabolismu pohlavních hormonů. V současné době je známých šest lidských mikrosomálních zástupců: 17 β -HSD2 (SDR9C2), 17- β HSD3 (SDR12C2), 17 β -HSD7 (SDR37C1), 17 β -HSD11 (SDR16C2), 17 β -HSD12 (SDR12C1) a 17 β -HSD13 (SDR16C3). Dosud u těchto enzymů nebyl zaznamenán reduktivní metabolismus xenobiotik, nicméně u některých zástupců byl popsán oxidační metabolismus syntetických steroidů (Škarydová and Wsól, 2012).

Lidské dehydrogenasy/reduktasy SDR nadrodiny

Lidské dehydrogenasy/reduktasy SDR nadrodiny (DHRS) tvoří velmi rozmanitou a málo prozkoumanou skupinu proteinů. Dosud bylo identifikováno 16 zástupců, přičemž dobře charakterizována byla jen necelá polovina. Některé enzymy, jako například DHRS1, dokonce nebyly charakterizovány vůbec. Jak již bylo popsáno výše, prvotní studie prokázali pravděpodobnou aktivitu vůči xenobiotikům již u enzymů DHRS2 (Gabrielli and Tofanelli, 2012), DHRS3 (Lundová *et al.*, 2014), DHRS4 (Endo *et al.*, 2009) a DHRS7 (Štambergová *et al.*, 2014, 2015).

1.2. Metody izolace a identifikace cílových proteinů

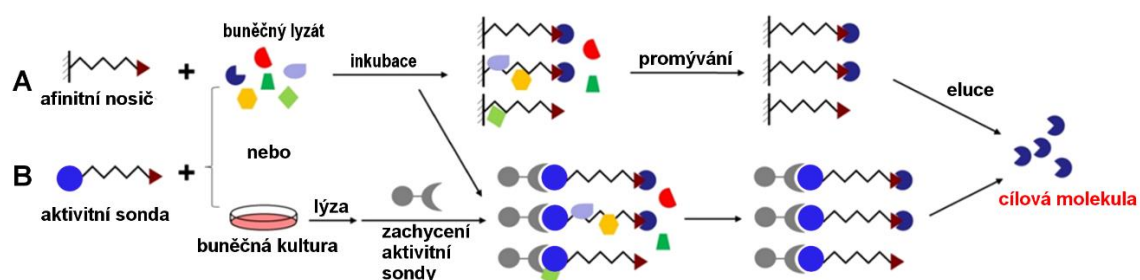
Využití malých bioaktivních molekul je již po tisíciletí základním kamenem lidské medicíny. Tyto látky byly během staletí podávány jako samostatné entity nebo jako komplexní směsi bez hlubší znalosti o mechanismu jejich účinku. Rozvoj organické syntézy a izolace aktivních molekul z přírodních zdrojů postupem času rozšířili seznam potenciálních bioaktivních molekul (Ziegler *et al.*, 2013). Bez podrobné znalosti biochemického účinku je ale jejich využití v moderní medicíně nemožné. K určení biologické funkce bioaktivních molekul se v současné době hojně používá fenotypový screening (Etzion and Muslin, 2009). Na rozdíl od experimentů s purifikovanými proteiny je hlavní předností této metody možnost stanovení biologického účinku bioaktivních látek na reálném modelu biologických systémů (např. buněčné linie). Na druhou stranu, metoda popisuje pouze celkový efekt aktivní látky na biologický systém a neidentifikuje konkrétní cílové molekuly, které jsou zodpovědné za vlastní biologický účinek. Určení těchto molekulárních cílů je ovšem nezbytné pro správné pochopení mechanismu účinku bioaktivních látek (Zheng *et al.*, 2015).

Lidský proteom se skládá z přibližně 30 000 proteinů (Human Proteome Map, 2015), přičemž asi 2 % z nich již byly identifikovány jako molekulární cíle používaných léčiv. Předpokládá se ale, že takových proteinů by mělo být až 15 % (Dixon and Stockwell, 2009). Nukleové kyseliny, sacharidy a lipidy mohou také být cíle pro malé molekuly (např. léčiva). Hledání molekulárních cílů bioaktivních molekul tak lze přirovnat k hledání jehly v kupce sena (Clamp *et al.*, 2007). V současné době jsou za hlavní cíle většiny používaných léčiv považovány enzymy, membránové transportéry, iontové kanály, nukleární receptory a proteiny signálních drah (Landry and Gies, 2008). Znalost nových proteinů jako cílů malých molekul je tak důležitou informací při navrhování nových léčiv. Velmi často ovšem dochází i ke stanovení tzv. vedlejších cílů. Obvykle se jedná o makromolekuly, které mohou být nezbytné k aktivní odpovědi organismu na léčbu nebo mohou být zodpovědné za nežádoucí a toxické účinky léčiv (Lounkine *et al.*, 2012).

Identifikovat proteiny, které specificky interagují s malými molekulami lze pomocí metod chemické proteomiky. Jedná se multidisciplinární obor, který spojuje organickou syntézu, strukturní biologii, biochemii, buněčnou biologii a hmotnostní

spektrometrii (MS). V současné době existují dva hlavní směry chemické proteomiky (Obr. 2) (Katayama and Oda, 2007; Rix and Superti-Furga, 2009; Miao *et al.*, 2012):

- (I) profilování proteinů na základě aktivity (ABPP-activity-based protein profiling)
- (II) chemická proteomika založená na afinitní chromatografii (CCCP-compound-centric chemical proteomics)

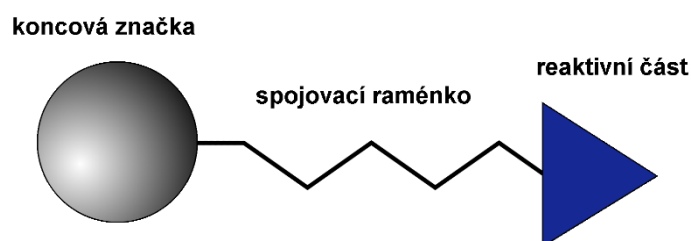


Obr. 2: Obecný pracovní postup chemické proteomiky založené na afinitní chromatografii (CCCP) (A) a profilování proteinů na základě aktivity (ABPP) (B). Při ABPP dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi aktivitní sondou a cílovými molekulami. Takto značené proteiny jsou následně izolovány pomocí specifické koncové značky. CCCP metoda k izolaci cílových molekul metodu inkubace s afinitním nosičem s imobilizovaným ligandem. V obou případech jsou purifikované proteiny analyzovány pomocí MS (upraveno dle Zheng *et al.*, 2015).

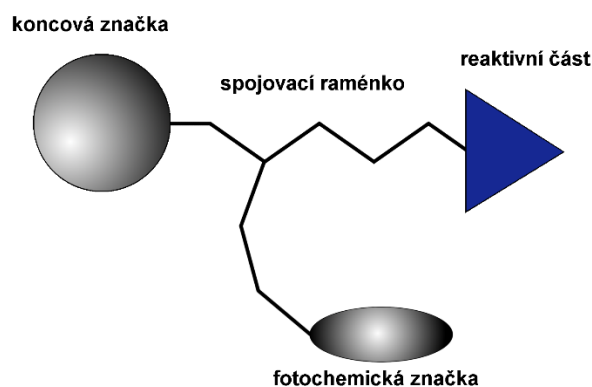
Někteří autoři uvádějí ještě třetí směr chemické proteomiky, a to globální proteomiku. Jedná se ovšem o metodu necílenou na specifický protein nebo skupinu proteinů a není proto mnohými autory řazena mezi metody chemické proteomiky (Miao *et al.*, 2012). Globální proteomika se snaží porovnávat a kvantifikovat změny proteinových profilů při systémových proteomických analýzách a vyhodnotit tak celkovou buněčnou odpověď na terapii příslušným léčivem. Jedná se tedy o nescifickou metodu, jejímž cílem je stanovení maximálního počtu ovlivněných proteinů. Hlavní nevýhodou této metody je vysoká pravděpodobnost maskování proteinů o nízké koncentraci proteiny vyskytujícími se ve vysokých koncentracích. Málo zastoupené proteiny jsou ale paradoxně velmi často těmi nejdůležitějšími molekulárními cíli (Miao *et al.*, 2012). Metoda globální proteomiky byly použita například při studiu buněčné odpovědi na léčivo donepezil u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (Paul *et al.*, 2008). Analýzou bylo zjištěno, že podáváním léčiva donepezilu bylo modulováno 75 plazmatických proteinů, což jen odráží komplexitu biologických systémů.

1.2.1. Profilování proteinů na základě aktivity (ABPP)

ABPP využívá molekulových (aktivitních) sond (ABP-activity based probe), které se kovalentně váží do aktivního místa cílových proteinů. Tyto sondy se obvykle skládají ze tří částí: reaktivní části, spojovacího raménka a značky (Obr. 3). Reaktivní část slouží k selektivnímu navázání sondy na aminokyselinové zbytky v aktivním místě metabolicky aktivního proteinu. V případě neaktivních forem proteinů (např. zymogeny nebo při obsazení vazebného místa enzymu inhibitorem) k takové interakci nedochází (Saghatelian and Cravatt, 2005; Miao *et al.*, 2012)(Saghatelian and Cravatt, 2005). Tato část musí být dostatečně selektivní, aby umožňovala co možná nejspecifičtější interakci s požadovaným proteinem nebo skupinou proteinů. Sondy proto obvykle obsahují elektrofilní funkční skupiny (např. estery sulfonátu, fluorované fosfonáty, acyoxymethylketony nebo epoxidy), které reagují s nukleofilními zbytky v aktivním místě cílového proteinu za vzniku kovalentní vazby. Specifickou skupinu ABPP sond představují fotoaktivní značky. Ty využívají afinitní interakce mezi reaktivní částí sondy a specifickou oblastí cílového proteinu. Vlastní vazba reaktivní části na cílový protein tedy v tomto případě nemá charakter kovalentní vazby. K jejímu vytvoření dochází až aktivací fotochemické značky pomocí UV (Obr. 4) (Berger *et al.*, 2004).



Obr. 3: Základní struktura ABPP sondy, která obsahuje reaktivní část, zodpovědnou za navázání sondy v aktivním místě metabolicky aktivního enzymu, spojovací raménko, které slouží ke spojení reaktivní části a koncové značky, která slouží k zachycení aktivitních sond z roztoku vzorku.



Obr. 4: Struktura ABPP sondy s fotochemickou značkou. Ty využívají afinitní interakce mezi reaktivní částí sondy a specifickou oblastí cílového proteinu. Vlastní interakce tedy v tomto případě nemá charakter kovalentní vazby, ale k jejímu vytvoření dochází až působením fotochemické značky po aktivaci UV světlem.

Spojovací raménko slouží ke spojení reaktivní části a koncové značky a zároveň prodlužuje jejich vzájemnou vzdálenost, takže nedochází ke sterickému bránění vzniku kovalentní vazby mezi reaktivní částí sondy a cílovou molekulou. Nejběžněji používanými raménky jsou alkylové řetězce nebo polyethylenglykoly (Cravatt *et al.*, 2008). Koncová značka aktivní sondy slouží k identifikaci nebo purifikaci proteinů s navázanými sondami od zbylých složek směsi. Běžně používanými značkami jsou biotin, fluorescenční molekuly nebo radioaktivní izotopy. Pomocí biotinové značky mohou být značené proteiny ze vzorku purifikovány využitím avidin-biotin afinitní chromatografie a následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Fluorescenční a radioaktivní značky slouží k přímé vizualizaci značených proteinů po předchozím rozdělení pomocí SDS-PAGE (Berger *et al.*, 2004; Saghatelian and Cravatt, 2005; Cravatt *et al.*, 2008).

ABPP je velmi účinná metoda pro monitorování změn enzymových aktivit způsobených patologickými procesy. Například Singaravelu *et al.* (Singaravelu *et al.*, 2010) použil ABPP ke stanovení enzymových aktivit viru hepatitidy C (HCV) během replikačního cyklu. Studie odhalila 13 nových proteinů hrajících roli v replikaci viru HCV, které by v budoucnu mohly být využity jako cílové molekuly při vývoji nových léčiv.

ABPP je rovněž efektivním nástrojem při odhalování vedlejších cílů známých léčiv. Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2010) takto pomocí ABPP stanovil nové molekulární cíle strukturních analogů orlistatu (tetrahydrolipstatin), což je běžně používané léčivo při léčbě obezity. Nedávné studie odhalily, že toto léčivo zároveň účinkuje

jako inhibitor thioesterasové domény syntasy mastných kyselin, což z orlistatu činí potenciální léčivo v léčbě nádorových onemocnění. Užitím ABPP metody bylo nově popsáno osm nových molekulárních cílů tohoto léčiva, což může výrazně přispět k rozvoji nových protinádorových léčiv odvozených od léčiva orlistatu.

1.2.2. Chemická proteomika založená na afinitní chromatografii (CCCP)

Tato metoda využívá klasickou biochemickou metodu, afinitní chromatografii (Cuatrecasas *et al.*, 1968), a spojuje ji s hmotnostně spektrometrickou analýzou. Metoda se zakládá na afinitní interakci mezi bioaktivní molekulou (ligandem) a cílovým proteinem. Na rozdíl od ABPP se zde ovšem nedochází k vytvoření kovalentní vazby mezi párem protein-ligand ale pouze k nekovalentním interakcím (vodíkové můstky, hydrofobní interakce nebo Van der Waalsových síly) (Murray *et al.*, 2012). V současné době se jedná o jednu z nejpoužívanějších metod chemické proteomiky (Zheng *et al.*, 2015). Bioaktivní molekula je nejprve imobilizována na povrch inertní stacionární fáze za vzniku afinitního nosiče. Ten je následně inkubován s proteinovým extraktem (např. buněčný lysát), čímž dojde k interakci s cílovými proteiny. V dalším kroku jsou odstraněny proteiny, které interagují s vlastním ligandem nebo s povrchem stacionární fáze nespecificky. V posledním kroku dojde k uvolnění (eluci) specificky zachycených molekul. Ty jsou obvykle analyzovány pomocí SDS-PAGE s následnou digescí proteinů pomocí trypsinu a MS/MS analýzou vzniklých peptidů (Obr. 2). Na základě porovnání získaných MS spekter s proteinovými databázemi (např. Uniprot) dojde k identifikaci molekulárních cílů imobilizované bioaktivní molekuly (Saghatelian and Cravatt, 2005). CCCP metoda byla úspěšně aplikována při identifikaci molekulárních cílů mnohých léčiv, jako jsou např. flavopiridol (Schnier *et al.*, 1999), roscovitin (Bach *et al.*, 2005), gefitinib (Brehmer *et al.*, 2005), takrolimus (Shimizu *et al.*, 2000), methotrexát (Nishio *et al.*, 2008) nebo ampicilin (von Rechenberg *et al.*, 2005). CCCP je rovněž vhodnou metodou pro studium kinas, které hrají důležitou úlohu v signálních drahách (Inagaki *et al.*, 1985; Bantscheff *et al.*, 2007; Daub *et al.*, 2008). Tato technika byla rovněž použita i při identifikaci cílových proteinů endogenních látek jako jsou oxalát (Roop-ngam and Thongboonkerd, 2010; Roop-ngam *et al.*, 2012), prostaglandin J₂ (Maekawa *et al.*, 2011) nebo L-arginin (Hiramoto *et al.*, 2010).

1.2.2.1. *Stacionární fáze používané při afinitních chromatografiích*

V afinitních purifikacích se jako stacionární fáze (matrice) označují všechny materiály, ke kterým je kovalentně navázána bioaktivní molekula. V současné době jsou nejčastěji používanými materiály po přípravu stacionárních fází agarosa, celuloza, dextran, polymethylakrylát, polyakrylamid a silikon ve formě mikropartikulí. (Magdeldin and Moser, 1996). Základními vlastnostmi takových maticí jsou:

- (I) velký povrch při co nejmenším objemu použitého materiálu
- (II) přítomnost funkčních skupin nutných k imobilizaci ligandu
- (III) minimální schopnost nescifických interakcí
- (IV) chemická a mechanická odolnost

Stacionární fáze můžeme dělit na porézní a neporézní. Porézní materiály (též zvané jako pryskyřice nebo gely) obvykle představují v průměru 50-150 μm velké mikropartikule tvořené sacharidovými (např. agarosa, celuloza, dextran) nebo akrylamidovými polymery s póry o velikosti 30 nm. Povrch těchto fází je bohatě substituován hydroxylovými funkčními skupinami, které mohou být využity k imobilizaci ligandu. Přítomné $-\text{OH}$ skupiny rovněž výrazně zvyšují hydrofilní charakter, díky čemuž jsou tyto materiály méně náchylné k možným nescifickým interakcím. Díky své vysoké porozitě se tyto stacionární fáze vyznačují velkým aktivním povrchem a s tím spojenou vysokou vazebnou kapacitou (Jungbauer, 2005; Prasath *et al.*, 2010). Vysoká porozita těchto materiálů s sebou ovšem přináší i jisté nevýhody, jelikož převážná část aktivního povrchu se nachází uvnitř partikulí. Separované biomolekuly (např. proteiny) tak musí vstupovat do pórů partikulí, aby zde mohli interagovat s imobilizovaným ligandem, což představuje problém zejména pro objemnější proteiny. Jejich izolace tak může být výrazně omezena (Wu *et al.*, 1998; Eiselt *et al.*, 2000). Nutnost prostupovat skrz póry stacionárních fází s sebou navíc přináší riziko mechanického poškození separovaných proteinů (Wu *et al.*, 1998).

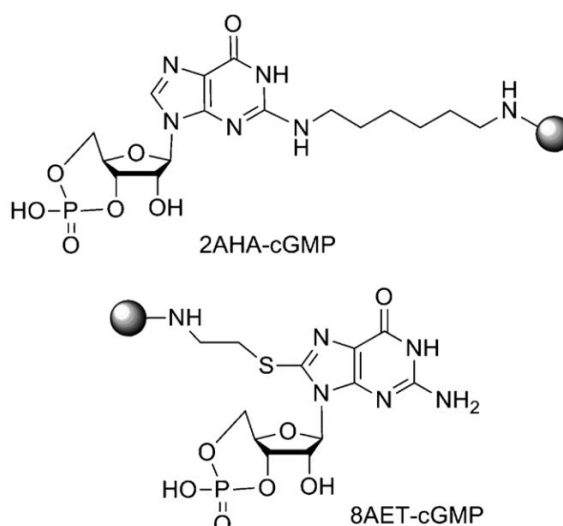
Neporézní sorbenty obvykle představují mikropartikule o velikosti v řádu jednotek mikrometrů. Hlavní výhodou těchto nosičů je absence nutnosti difuze proteinů dovnitř mikropartikulí, jako je tomu v případě porézních materiálů.

Separace proteinů tak mohou probíhat rychleji, efektivněji a v menších objemech (Chen and Lee, 2001). Většina těchto stacionárních fází je odvozena od silikonu, polystyrenu nebo methylakrylátu (Li, 1997; Chen and Lee, 2001) a jejich povrch je často potažen tenkou vrstvou přírodního nebo syntetického polymeru (Berkovsky *et al.*, 1993; Tanyolaç and Özdural, 2000). Tato modifikace s sebou přináší výhodu v možnosti zavedení rozličných funkčních skupin (např. -OH, -NH₂, -COOH, -CNBr) na povrch stacionárních fází, které následně slouží k imobilizaci ligandu (Korecká *et al.*, 2005).

Specifickým druhem neporézních materiálů jsou magnetické mikropartikelky. Jedná se o v průměru 1-4 μm velké, superparamagnetické mikropartikelky tvořené železitými oxidy. Jejich povrch je obvykle potažen vrstvou inertního materiálu (např. silikon), který minimalizuje nespecifické interakce a umožňuje zavedení reaktivních funkčních skupin, nutných pro imobilizaci bioaktivních molekul. Díky svým malým rozměrům se magnetické mikropartikelky vyznačují velkým povrchem, který umožňuje imobilizovat značné množství ligandu při použití minimálního objemu matrice (Šafařík and Šafaříková, 2000).

1.2.2.2. Ligandy pro syntézu afinitního nosiče

Separční účinnost afinitního nosiče je silně závislá na výběru vhodného ligandu, jeho prostorové orientaci a dále na fyzikálně-chemických vlastnostech stacionární fáze. Prostorové uspořádání afinitního nosiče je jedním z nejdůležitějších kritérií, jelikož bioaktivní molekula musí být na povrch stacionární fáze imobilizována tak, aby byla umožněna interakce s cílovým proteinem a zároveň nedošlo ke ztrátě její biologické aktivity. Vliv prostorové orientace ligandu byl popsán například během imobilizace cGMP pomocí dvou odlišných pozic jeho purinového skeletu (Obr. 5). Výsledné afinitní nosiče byly schopné zachytit různé cílové proteiny (Scholten *et al.*, 2006). Kombinací vhodné orientace ligandu v prostoru a modifikací délky spojovacího raménka tak lze významně ovlivnit spektrum specificky zachycených proteinů stejně jako množství nespecifických interakcí (Roop-ngam and Thongboonkerd, 2010).



Obr. 5: Struktura afinitních nosičů s ligandem cGMP. Imobilizací cGMP pomocí různých míst jeho purinového skeletu došlo ke vzniku dvou afinitních nosičů s rozdílnými afinitami vůči cílovým molekulám (Ziegler *et al.*, 2013).

Úspěšná afinitní purifikace vyžaduje přítomnost biospecifického ligandu, kovalentně navázaného na povrch stacionární fáze. Jako ligandy mohou sloužit jak nízkomolekulární látky (např. léčiva, inhibitory, barviva nebo steroidy), tak i biologické makromolekuly (např. imunoglobuliny, DNA, RNA, peptidy nebo i celé proteiny) (Haeckel *et al.*, 1968; Magdeldin and Moser, 1996; Dangerfield *et al.*, 2006; Moser and Hage, 2010). Ligandy mohou být zcela selektivní pro jednotlivý protein nebo velmi malou skupinu proteinů (specifické protilátky, receptory, steroidní hormony, vitamíny, specifické inhibitory) nebo méně selektivní, které reagují se strukturálně různorodými molekulami. Takovým ligandem je například stafylokokový protein G, který je schopen vázat celou skupinu IgG imunoglobulinů (Zheng *et al.*, 2015). Ligand by měl být dále schopen tvořit s cílovými proteiny reverzibilní komplexy, které ale musí být dostatečně stabilní, aby nedošlo k vymytí cílových proteinů během promývacích kroků, ale až cílenou změnou média (Bantscheff *et al.*, 2009).

Chemická struktura ligandu musí obsahovat funkční skupiny, pomocí kterých je možné ho imobilizovat k povrchu stacionární fáze. Nejběžnějšími takovými skupinami jsou aminy, thioly, hydroxylové skupiny a karboxylové skupiny. Je rovněž důležité, aby tyto funkční skupiny neovlivňovali schopnost ligandu interagovat s cílovou molekulou, pokud byly do struktury ligandu přidány dodatečně z důvodu umožnění jeho imobilizace (Hedhammar *et al.*, 2006).

Imobilizace ligandu na povrch stacionární fáze

Imobilizace ligandu obvykle probíhá ve třech krocích. Stacionární fáze je nejprve aktivována zavedením reaktivních funkčních skupin, které ve druhém kroku interagují s funkčními skupinami ligandu za vzniku kovalentní vazby. V posledním kroku jsou nevyužité reaktivní skupiny stacionární fáze zablokovány vhodnou nízkomolekulární látkou, jako je např. ethanolamin. V opačném případě by volné reaktivní skupiny stacionární fáze mohli reagovat s biologickými makromolekulami vzorku (Hermanson, 2013). V tabulce 3 jsou shrnuty nejběžněji používané aktivní funkční skupiny, které slouží k imobilizaci ligandu na povrch aktivovaných stacionárních fází (Hedhammar *et al.*, 2006).

Tab. 3: Nejčastěji používané reaktivní funkční skupiny stacionárních fází sloužící k imobilizaci ligandu (upraveno dle Hedhammar *et al.*, 2006).

Reaktivní funkční skupina stacionární fáze	Struktura stacionární fáze	Funkční skupina ligandu	Struktura vzniklého nosiče
Kyanid		NH ₂ -Ligand	
Epoxid		HS-Ligand	
N-hydroxysukcinimid-karbonát		NH ₂ -Ligand	
N,N'-imidazol-karbamát		NH ₂ -Ligand	
Tosyl		NH ₂ -Ligand	

1.2.2.3. Spojovací raménka

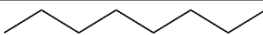
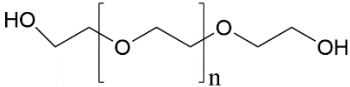
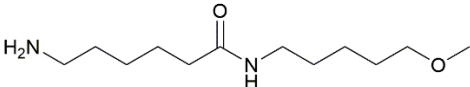
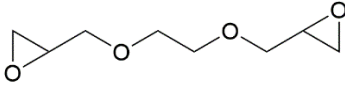
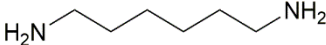
Spojovací raménka neslouží pouze k zavedení reaktivních funkčních skupin na povrch stacionárních fází, nezbytných k imobilizaci ligandů, ale především jako prostředek k odstranění možného sterického bránění stacionární fáze, které by mohlo vést k znemožnění interakce mezi ligandem a cílovou molekulou (Obr. 6).

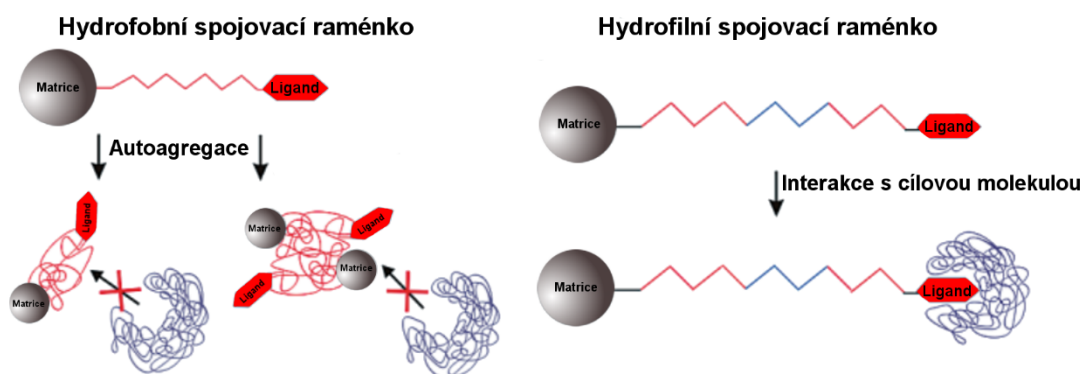


Obr. 6: Vliv délky spojovacího raménka na schopnost zachytit cílové molekuly. V případě nedostatečné vzdálenosti mezi ligandem a stacionární fází může docházet ke sterickému bránění interakce s cílovou molekulou (upraveno dle Magdeldin and Moser, 1996).

Nejběžnějšími typy používaných ramének jsou uhlovodíkové řetězce, polyethylenglykoly, peptidy, 6-amino-N-(5-methoxypentyl)hexanamid, divalentní epoxidy (např. ethylenglykoldiglycidilether) a diaminy (Jeffamine, bis-3-aminoprolylamin, 1,6-diamonohexan (Tab. 4) (Hermanson, 2013; Ziegler *et al.*, 2013). Hlavní nevýhodou uhlovodíkových řetězců je jejich hydrofobní povaha, která může zvyšovat množství nespecificky interagujících proteinů s afinitním nosičem pomocí hydrofobních interakcí, čímž dochází ke zvýšení komplexity koncových elučních frakcí (Obr. 7). Následná detekce a identifikace pravděpodobných cílů je poté zkreslena přítomností kontaminujících proteinů (Zheng *et al.*, 2015). Z toho důvodu se jako raménka první volby používají hydrofilní řetězce, a to především ethylenglykoly. Nevýhodou takových ramének je ovšem jejich relativně krátká délka. Z důvodu sterické nepřístupnosti je tak znemožněna interakce objemných proteinů s imobilizovaným ligandem. Ve snaze zlepšit tento nedostatek bylo navrženo polyprolinové rámenko. Na rozdíl od ethylenglykolu je polyprolinové raménko pevnější a delší, takže lépe umožňuje interakci ligandu s objemnými proteiny (Ziegler *et al.*, 2013).

Tab. 4: Základní typy spojovacích ramének používaných při syntéze afinitních nosičů (Hermanson, 2013; Ziegler et al., 2013).

Spojovací raménka	Struktura
Uhlovodíkové řetězce	
Polyethylenglykoly	
6-amino-N-(5-methoxypentyl)hexanamid	
divalentní epoxidy	
diaminy	



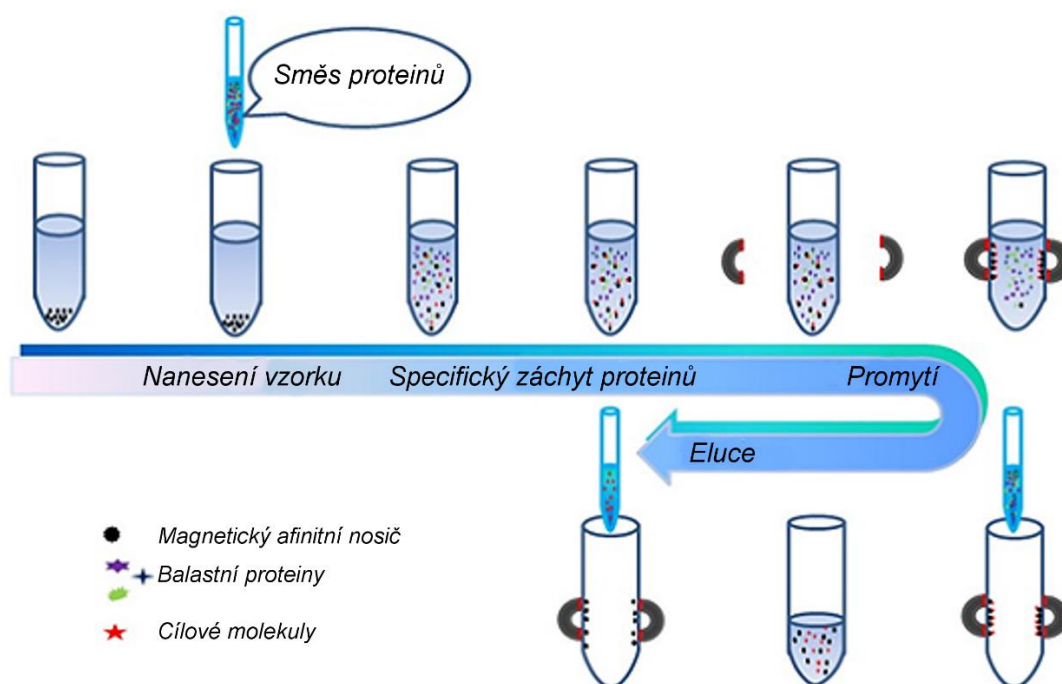
Obr. 7: Vliv hydrofobních vlastností spojovacího raménka na průběh afinitní separace. Příliš hydrofobní raménka mohou vést k jejich autoagregaci a zároveň zvyšovat pravděpodobnost nespecifických interakcí (upraveno dle Guiffant et al., 2007).

Snahy o omezení kontaminace způsobené nespecificky interagujícími proteiny s povrchem afinitních nosičů vedly k vytvoření selektivně štěpitelných spojovacích ramének. Štěpením dojde pouze k uvolnění ligandu se specificky navázanými proteiny, zatímco molekuly nespecificky interagující se spojovacími raménky nebo stacionární fází zůstávají imobilizovány na povrchu nosiče. Takovými raménky jsou například diazobenzeny, acylhydrazony, estery kyseliny levulinové, peptidy nebo fotosensibilní molekuly (Ziegler et al., 2013).

1.2.2.4. Provedení afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie obvykle probíhá v klasickém kolonovém uspořádání nebo metodou vsádkové chromatografie v závislosti na použitém typu stacionární

fáze a především na charakteru analyzovaného vzorku. (Dunnill and Lilly, 1974). Funkčnost kolonové chromatografie s nemagnetickými porézními stacionárními fázemi byla při separaci biomolekul ověřena v minulosti v mnoha případech. Tento přístup ovšem není vhodný vždy, např. při analýzách velmi komplexních vzorků (např. buněčné lyzáty bez předchozí úpravy), dochází k omezené prostupnosti rozměrných částic vzorků sorbentem. V takových případech je vhodnější metoda vsádkové chromatografie (Obr. 8) s magnetickými neporézními partikulami. Magnetický nosič s imobilizovaným ligandem je smíchán se vzorkem (buněčný lyzát, krevní plazma, mléko, moč, prepurifikovaná proteinová frakce atd.), obsahujícím cílové molekuly. Vzniklá suspenze je inkubována po dobu požadovanou k vyvázání cílových molekul. Aplikací magnetického pole jsou mikropartikelky rychle odstraněny ze vzorku a zachycené cílové molekuly mohou být eluovány a použity v dalších krocích (Šafařík and Šafaříková, 2004).



Obr. 8: Schématické znázornění magnetické vsádkové chromatografie (upraveno dle E&K Scientific, 2016).

Magnetické separační techniky přinášejí oproti nemagnetickým sorbentům několik výhod. Jedná se obvykle o velmi jednoduchý proces s pouze několika pracovními kroky. Celá purifikace se může odehrát na pracovním stole v rámci jedné mikrozkuřavky. Není zde požadavek na nákladné chromatografické zařízení, centrifugy, filtry nebo jiné přístrojové vybavení a separace může být provedena

s komplexním biologickým vzorkem bez předchozí úpravy (Schuster *et al.*, 2000). Díky magnetickým vlastnostem mohou být partikule snadno odstraněny z roztoku vzorku. Magnetické separace jsou obvykle velmi šetrné k cílovým proteinům, takže je možné izolovat i objemné proteiny, které jsou nevhodné pro klasické kolonové chromatografie (Hofmann *et al.*, 2002). Na rozdíl od kolonových chromatografií nevede magnetická vsádková chromatografie k zisku velkého objemu naředěného proteinové vzorku (de Dios Alché and Dickinson, 1998).

Eluční strategie

Úkolem elučního pufru je rozrušení interakce mezi ligandem a cílovou molekulou. Při volbě vhodné eluční strategie musí být brán zřetel na rozdílné mechanismy působení jednotlivých elučních činidel (Tab. 5). Eluční činidla mohou být použita samostatně nebo v kombinacích, kdy dochází k rozrušení více typů vazeb současně. Při použití komplexních elučních činidel se obvykle jedná o kompromis mezi účinností eluce a zachováním biologické aktivity (Firer, 2001).

Tab. 5: Přehled elučních strategií založených na změně pH, změně iontové síly roztoku, denaturaci, snížení polaritu nebo kompetici o vazebné místo.

Princip eluce	Pufry
Změna pH	100 mM glycin-HCl, pH 2,5-3,0 100 mM kyselina citronová, pH 3,0 100 mM glycin-NaOH, pH 10,5 150 mM hydroxid amonný, pH 10,5 50-100 mM triethylamine (TEA), pH 11,5 50-100 mM triethanolamin (TEOA), pH 11,5
Iontová síla a/nebo chaotropní účinek	3,5-4 M chlorid hořečnatý 5 M chlorid lithný 2,5 M jodid sodný, pH 7,5 0,2-3,0 M thiokyanatan sodný
Denaturace	2-6 M guanidin-HCl 2-8 M močovina 1% deoxycholát 1% SDS
Organická rozpouštědla	10% dioxan 50% ethylenglykol, pH 8-11,5 (zároveň i chaotropní účinek)
Kompetitivní eluce	> 0,1 M kompetitivní ligand

Pufry o extrémním pH pracují na principu přerušování iontových sil. Při jejich použití je obvykle nezbytná následná neutralizace získaných frakcí, aby se zabránilo denaturaci eluovaných molekul (Firer, 2001; Hedhammar *et al.*, 2006). Změny v iontové síle pomocí vysokých koncentrací anorganických solí rovněž rozrušují iontové vazby. Jedná se o efektivní a nedenaturující eluční činidla, která ale mohou zvýšit hydrofobní interakce mezi afinitním nosičem a biologickými makromolekulami. Chaotropní činidla (např. KSCN) naproti tomu rozrušují jak iontové, tak hydrofobní interakce. (Firer, 2001; Hedhammar *et al.*, 2006). S vodou mísitelná organická rozpouštědla snižují polaritu elučního činidla a rozrušují tak hydrofobní interakce mezi ligandem a cílovou molekulou. Mezi nejčastěji používaná činidla patří methanol, dioxan a ethylenglykol (Firer, 2001; Hedhammar *et al.*, 2006). Denaturační činidla jako je guanidin nebo močovina rozrušují vazby vodíkovými můstky a patří mezi neúčinnější způsoby eluce. Jejich použití je ovšem limitováno na eluci nejvíce stabilních proteinů, odstranění „lepivých“ proteinů

během regenerace chromatografických kolon anebo v případě, že není požadován eluát se zachovalou biologickou aktivitou (Firer, 2001; Hedhammar *et al.*, 2006).

I přes neustálý vývoj metod pro identifikaci molekulárních cílů malých molekul v uplynulých dekádech, stále neexistuje všeobecně použitelný přístup, který by mohl být použit u většiny případů. Tento jev je způsoben rozdílnou chemickou povahou bioaktivních molekul (např. heterocykly vs. sacharidy), jejich rozdílnými afinitami k cílovým molekulám, druhem cílové molekuly (např. membránový vs. cytosolický protein), relativním množstvím hledané molekuly v biologických vzorcích a komplexitou použitých vzorků (Ziegler *et al.*, 2013). Ačkoli výše zmíněné proteomické přístupy využívají rozdílné strategie a každá z metod má své přednosti i limity (Tab. 6), všechny mohou poskytnout důležité informace o mechanismu působení bioaktivních molekul.

Tab. 6: Porovnání metod chemické proteomiky (upraveno dle Ziegler *et al.*, 2013).

Metoda chemické proteomiky	Druh experimentu	Cíl	Forma bioaktivní molekuly	Pracovní postup	Výhody	Nevýhody
Globální proteomika	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Celý proteom	Nemodifikovaná molekula	Nemodifikované léčivo reaguje s endogenními cíli s následnou proteomickou analýzou	Necílená analýza celého proteomu	Zkreslení výsledků abundančními proteiny
ABPP	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Jednotlivá skupina nebo skupiny proteinů	Aktivní	Reaktivní část sondy se kovalentně váže na cílový protein s následnou izolací pomocí koncové značky a proteomickou analýzou	Přímé odhalení enzymových aktivit v biologických systémech	- Chemická modifikace ABP sondy - Rozpuštěnost cílových proteinů
CCCP	<i>in vitro</i>	Jednotlivá skupina nebo skupiny proteinů	Imobilizovaná molekula na inertním nosiči	Molekula je imobilizována na povrchu inertního nosiče, inkubována s biologickým vzorkem a zachycené proteiny jsou analyzovány.	- Metoda aplikovatelná na všechny druhy biologických materiálů - Může odhalit posttranslační modifikace	- Chemická modifikace molekuly před imobilizací. - Rozpuštěnost cílových proteinů. - Nespecifické interakce.

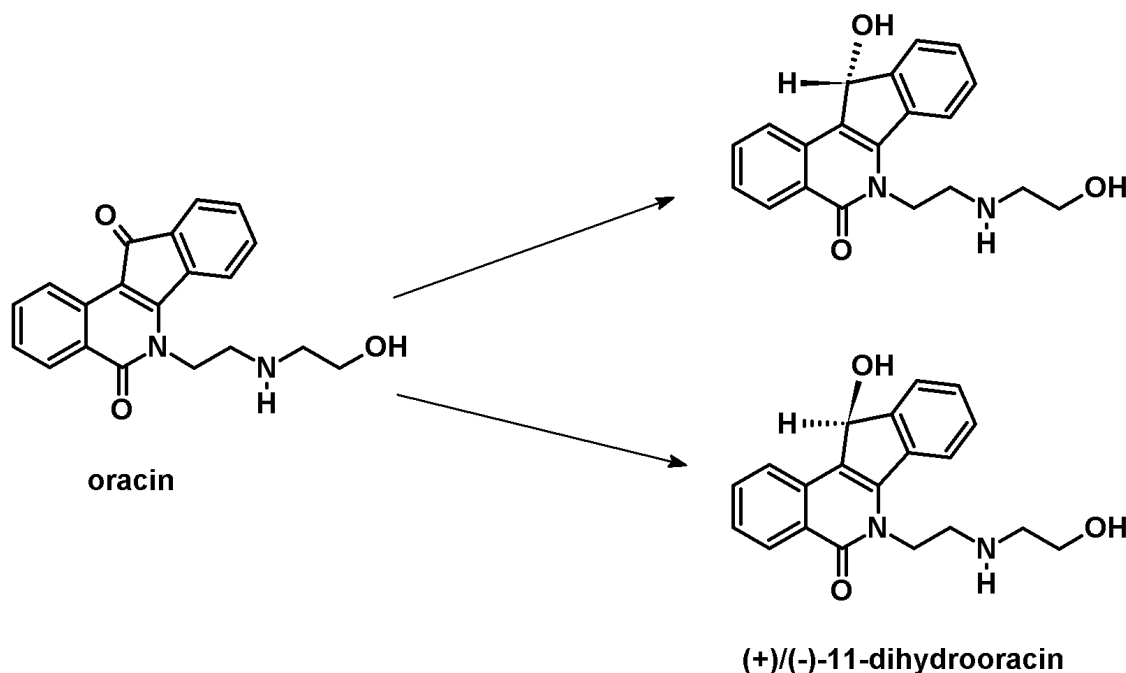
1.3. Oracin jako ligand pro přípravu afinitního nosiče na izolaci lidských karbonyl-redukujících enzymů

Oracin (6[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c]isochinolin) je potenciálním cytostatickým léčivem odvozeným od isochinolinu (Melka, 1993). Základním mechanismem účinku tohoto léčiva je interkalace do buněčné DNA, což má za následek porušení čtecího rámce genetické informace a inhibici proteosyntézy. Citlivost mnohých tumorů vůči oracinu ovšem nespočívá pouze v tomto jednom mechanismu, ale bylo popsáno i několik dalších způsobů, kterými tlumí buněčný růst. Jedná se o inhibici topoisomerasy II, stimulaci aerobní spotřeby glukosy, tvorbu laktátu a indukci buněčné apoptózy (Melka, 1993; Wsól *et al.*, 2004). Cytostatický účinek oracinu byl testován na deseti myších a potkaních nádorových modelech při perorálním a parenterálním podání. V pěti případech (ascitická forma sarkomu S37, solidní Ehrlichův karcinom, Gardnerův lymfosarkom, leukemie L1210 a P388) jevil oracin přímou cytotoxicitu k buňkám zvířecích tumorů a zároveň u zvířat prodlužoval průměrnou dobu přežití. V případě Gardnerova lymfosarkomu, většina zvířat nejevila žádné známky nádorového bujení již po jedné perorální dávce. Na základě těchto výsledků byly provedeny testy s lidskými nádorovými buňkami. Oracin významně snižoval celkovou hmotu rakovinných buněk u ascitické formy sarkomu S37, solidního Ehrlichova karcinomu a HK adenokarcinomu. Nicméně Krebsův ascitický tumor a Nemth-Kellerův lymfom na vystavení oracinu nereagovaly. (Wsól *et al.* 2002, Wsól *et al.* 2004, Melka *et al.* 1993).

1.3.1. Biotransformace oracinu

Biotransformace oracinu byla studována *in vitro* i *in vivo* testech na šesti zvířecích modelech (myš, potkan, morče, mini-prase, pes, králík) (Szotáková *et al.*, 1996; Wsól *et al.*, 1996) a dále v lidské jaterní tkáni (Wsól *et al.* 1999). Hlavní metabolickou přeměnou oracinu je redukce karbonylové skupiny v poloze 11 indenoisochinolinového skeletu. Vzhledem k přítomnosti chirálního centra může vzniklý metabolit 11-dihydrooracin (6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c] isochinolin (DHO)) existovat ve dvou

enantiomerních formách ((+)-DHO a (-)-DHO) (Wsól et al. 1999; Melka 1993) (Obr. 9).



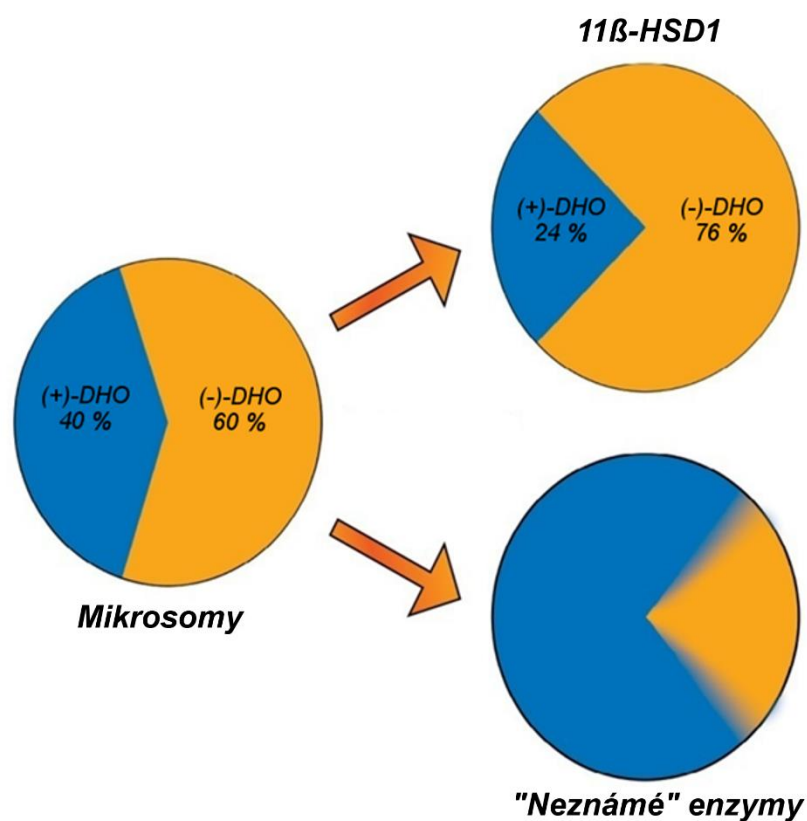
Obr. 9: Hlavní metabolická přeměna molekuly oracinu na (+)-DHO a (-)-DHO enantiomery (Wsól et al., 1999a).

U všech testovaných zvířecích modelů byla biotransformace oracinu pozorována jak u cytosolických, tak mikrosomálních subcelulárních frací, přičemž stereospecifita tvorby jednotlivých enantiomerů závisela na druhu (u myší, potkanů, mini-prasat a psů převyšuje tvorba (+)-DHO) a pohlaví zvířat (Wsól et al. 1999).

1.3.1.1. Biotransformace oracinu v lidské jaterní tkáni

U člověka byla v jaterní tkáni pozorována metabolická přeměna oracinu jak u cytosolické, tak mikrosomální subcelulární frakce. Z cytosolických enzymů byla aktivita vůči oracinu popsána u enzymů AKR1B10 (Martin *et al.*, 2006), AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4 (Wsól *et al.*, 2007; Novotná *et al.*, 2008), CBR1 a CBR3 (Pilka *et al.*, 2009), přičemž každý z enzymů vykazoval konkrétní míru stereospecifity redukce. U mikrosomálních enzymů byla k dnešnímu dni redukční aktivita vůči oracinu popsána pouze u jediného lidského zástupce, a to 11 β -HSD1 (SDR26C1) (Wsól et al. 1999). Analýzou stereospecifity jeho redukce bylo zjištěno, že tento enzym redukuje oracin na příslušné enantiomery v poměru 26 % (+)-DHO/74 % (-)-DHO. Inkubací oracinu s kompletními lidskými jaterními

mikrosomy ale bylo dosaženo jiného poměru; 40 % (+)-DHO/60 % (-)-DHO (Wsól *et al.*, 2003). Tento rozdíl bylo možné vysvětlit přítomností dalšího či dalších membránově vázaných mikrosomálních enzymů, jejichž stereospecifita redukce oracinu je posunuta ve prospěch (+)-DHO enantiomeru (Obr. 10). Takový enzym (enzymy) byl částečně purifikován Škarydovou *et al.* (Škarydová *et al.*, 2009). Částečně purifikovaná frakce měla stereospecifitu redukce oracinu výrazně posunutou ve prospěch (+)-DHO (86 % (+)-DHO/14 % (-)-DHO). Došlo tak k potvrzení předpokladu o přítomnosti dalších mikrosomálních karbonyl-redukujících enzymů, které metabolizují oracin. Použitím klasických purifikačních technik (iontově výměnná chromatografie, hydrofobně interakční chromatografie a SDS-elektroforéza) se ale autorům nepodařilo jednoznačně identifikovat žádný karbonyl-redukující enzym.



Obr. 10: Znázornění stereospecifity redukce oracinu lidskými jaterními mikrosomy a dosud jediným dobře charakterizovaným mikrosomálním enzymem 11β -HSD1. Na základě rozdílů těchto stereospecifit redukce byla předpovězena přítomnost dalších mikrosomálních karbonyl-redukujících enzymů, které metabolizují oracin ve prospěch (+)-DHO enantiomeru (upraveno dle Škarydová *et al.*, 2009).

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vytvořit unikátní afinitní nosič s ligandem oracinem a využít ho pro izolaci a následnou identifikaci karbonyl-redukujících enzymů. Proces se skládal z řady kroků, jejichž konečným cílem bylo zavedení afinitní separace do rozpracovaného purifikačního protokolu lidských membránově vázaných enzymů redukujících modelový substrát oracin (Škarydová *et al.*, 2009).

Dílčí cíle práce zahrnovaly:

- Návrh strategie imobilizace ligandu oracinu na různé typy stacionárních fází vhodných pro afinitní separace.
- Vytvoření různých typů afinitních nosičů s navázaným oracinem.
- Otestování účinnosti separace vytvořených afinitních nosičů pomocí vybraného karbonyl-redukujícího enzymu.
- Výběr nejvhodnějšího afinitního nosiče s navázaným ligandem oracinem a optimalizace účinnosti separačního postupu, selektivity a univerzálnosti vybrané afinitního nosiče.
- Testování vybraného afinitního nosiče s různými komplexními biologickými vzorky, identifikace zachycených proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Zavedení afinitního kroku s vybraným afinitním nosičem do rozpracovaného purifikačního protokolu neznámých lidských mikrosomálních karbonyl-redukujících enzymů podílejících se na metabolismu oracinu.
- Charakterizace elučních frakcí získaných z afinitní separace zavedené do purifikačního protokolu z hlediska aktivity a stereospecifity redukce oracinu.
- Identifikace proteinů obsažených v eluční frakci získané z afinitní separace zavedené do purifikačního protokolu pomocí hmotnostní spektrometrie a vytipování enzymu zodpovědného za redukci oracinu.
- Charakterizace rekombinantně připraveného vytipovaného enzymu z hlediska aktivity a stereospecifity redukce oracinu.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. Biologický materiál

3.1.1. Lidská jaterní tkáň

Lidské mikrosomální a cytosolické frakce byly připraveny z jaterní tkáně, která byla získána v rámci dárcovského programu ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Vzorke tkáně byly uskladněny při -80°C.

3.1.2. Rekombinantně připravené enzymy

Rekombinantní formy cytosolických enzymů AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 a CBR3 byly připraveny za pomoci geneticky modifikovaného organismu *E. coli* a následně purifikovány pomocí HisTrap afinitní chromatografie na přístroji Äkta Purifier dle protokolu Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2014) v rámci ostatních projektů na Katedře biochemických věd.

Rekombinantní formy membránových enzymů RDH16 a DHRS1 byly připraveny Mgr. Hanou Štambergovou, Ph.D. jako mikrosomální frakce obohacené o cílový protein za pomoci *Sf9* hmyzích expresních systémů podle protokolu Štambergové et al. (Štambergová *et al.*, 2014).

3.2. Chemikálie

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetonitril pro LC/MS (Sigma-Aldrich, Německo)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)

Alkylovaný oracin (připraveno na Katedře biochemických věd)

Amersham ECL Prime Western blotting systém (GE-Healthcare, Velká Británie)

Bis-3-aminopropylamin (BAPA) (Sigma-Aldrich, Německo)

Bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)

Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Německo)

Činidlo Bradfordové (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Penta, Česká republika)
Dihydrooracin (DHO) (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Česká republika)
Dimethylformamid (DMF) (Sigma-Aldrich, Německo)
Dodecylsulfát sodný (SDS) (Merck, USA)
Ethanol 96% (Dr. Kulich Pharma, Česká republika)
Ethylacetát (Dr. Kulich Pharma, Česká republika)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Penta, Česká republika)
Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, Německo)
Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Sigma-Aldrich, Německo)
Glycerol 85% (Dr. Kulich Pharma, Česká republika)
Glycin (Sigma-Aldrich, Německo)
Hexansulfonát sodný monohydrát (Sigma-Aldrich, Německo)
Hovězí sérový albumin (BSA) (Bio-Rad, USA)
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Penta, Česká republika)
Hydroxid amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
Hydroxid sodný (Penta, Česká republika)
Chloristan sodný (Fluka, Německo)
Isobutanol (Sigma-Aldrich, Německo)
Jeffamine ED-600 (Sigma-Aldrich, Německo)
Kit na stanovení bílkoviny kyselinou bicinchoninovou (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina 6-aminohexanová (Ahx) (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina 6-bromhexanová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina boritá (Lachema, Česká republika)
Kyselina chloristá (Penta, Česká republika)
Kyselina chlorovodíková 99% (Penta, Česká republika)
Kyselina octová 99% (Penta, Česká republika)
Kyselina o-fosforečná 85% (Penta, Česká republika)
Kyselina triflouroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, Německo)
Merkaptoethanol (Dr. Kulich Pharma, Česká republika)
Methanol p.a. (Penta, Česká republika)
Methanol pro LC/MS (Sigma-Aldrich, Německo)
Methoxid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
Methylester kyseliny 6-bromhexanové (připraveno na Katedře biochemických věd)

N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, Německo)
N,N-dimethylformamid Sigma-Aldrich, Německo)
N-hydroxysulfosukcinimid sodný (S-NHS) (Sigma-Aldrich, Německo)
Nikotinamid dinukleotid fosfát (NADP⁺) (Fluka, Německo)
Oracin (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Česká republika)
Persíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, Německo)
Precision plus protein standard, All blue (Bio-Rad, USA)
Síran amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
Thiosíran sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
Toluen p.a. (Penta, Česká republika)
Triethylamin (Fluka, Německo)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Penta, Česká republika)
Triton X-100 (Fluka, Německo)
 α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)

3.3. Stacionární fáze pro přípravu afinitních nosičů

Magnetické partikule: SiMAG-COOH (Chemicell, Německo)
SiMAG-NH₂ (Chemicell, Německo)
Perlóza MG (PERLOZA s.r.o., Česká republika)
Nemagnetické partikule: CM-Sepharosa (Sigma-Aldrich, Německo)

3.4. Přístrojové vybavení

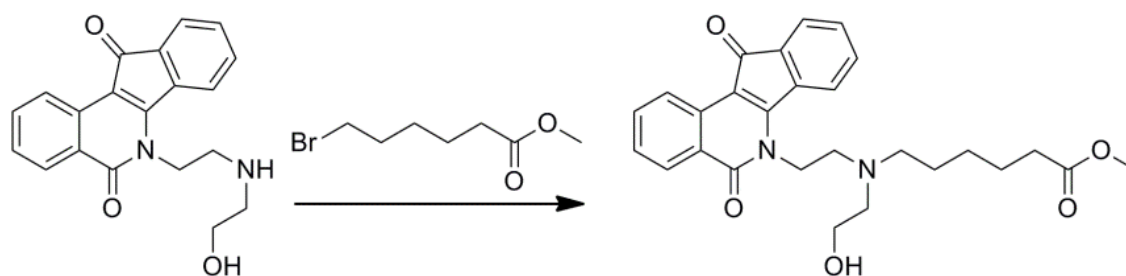
Äkta Purifier (Amersham Biosciences, Švédsko)
Analytické váhy (Scaltec, Německo)
Automatické pipety, špičky (Bio-Hit, Německo)
Centrifuga Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi (Thermo Electron Corporation, USA)
Centrifuga Mini spin plus (Eppendorf, Německo)
Elektroforéza MiniProtean (Bio-Rad, USA)
Hmotnostního spektrometru AB 4800 MALDI-TOF/TOF (AB Sciex, USA)
Homogenizátor dle Pottera a Elvehjema (B. Braun Biotech, USA)
HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA)
UHPLC Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, USA)
Chromatografické kolony:

HiTrap odsolovací 5 ml (GE-Healthcare, Velká Británie)
HiTrap Q-Sepharosa FF 1 ml (GE-Healthcare, Velká Británie)
HisTrap FF 1 ml (GE-Healthcare, Velká Británie)
ZORBAX Eclipse Plus Rapid Resolution HD C₁₈ kolona 2,1 mm x 50 mm,
1,8 µm (Agilent Technologies, USA)
OD-R Chiracel 240 mm x 4,6 mm (Daicel Chemical Industries, Japonsko)
Superdex 75 100/300 GL (Amersham Biosciences, Švédsko)
Empore™ C18-SD SPE kolonek (Supelco, USA)
Kývačka Unimax 1010 (Heidolph, Německo)
MALDI destička (AB Sciex, USA)
Mikrostrříkačka (Hamilton, USA)
Mikrozkumavky (Eppendorf, Německo)
Mini-Protean elektroforéza (Bio-Rad, uSA)
Molecular Imager Gel Doc XR (Bio-Rad, USA)
Předvážky (Kern, Německo)
Rotátor (Biosan, Lotyšsko)
Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)
Termomixér Eppendorf comfort (Eppendorf, Německo)
Třepačka IKA MS 3 basic (IKA, Německo)
Ultrazvuková vana UC 005 AJ1 (Tesla)
Vakuový koncentrátor Eppendorf 50 301 (Eppendorf, Německo)
Zkumavky Amicon Ultra-4 10K (Merck, USA)

3.5. Metody

3.5.1. Modifikace struktury oracinu

Oracin (0,3 mmol) byl resuspendován v acetonitrilu s 1,5 mmol K₂CO₃ a KI. Následně bylo přidáno 0,27 mmol methylesteru kyseliny 6-bromhexanové. Výsledná reakční směs byla po zahřátí na 80°C míchána po dobu 16 hodin (Obr. 11). Vzniklý N-alkylester oracinu byl následně vytřepán do chloroformu a odpařen do sucha ve vakuové odparce.



Obr. 11: Chemická modifikace molekuly oracinu pomocí methylesteru kyseliny 6-bromhexanové.

3.5.2. Příprava afinitních nosičů s ligandem oracinem

Při přípravě afinitních nosičů bylo použito několik imobilizačních technik v závislosti na použitém druhu stacionární fáze, spojovacího raménka a typu oracinu (Tab. 7).

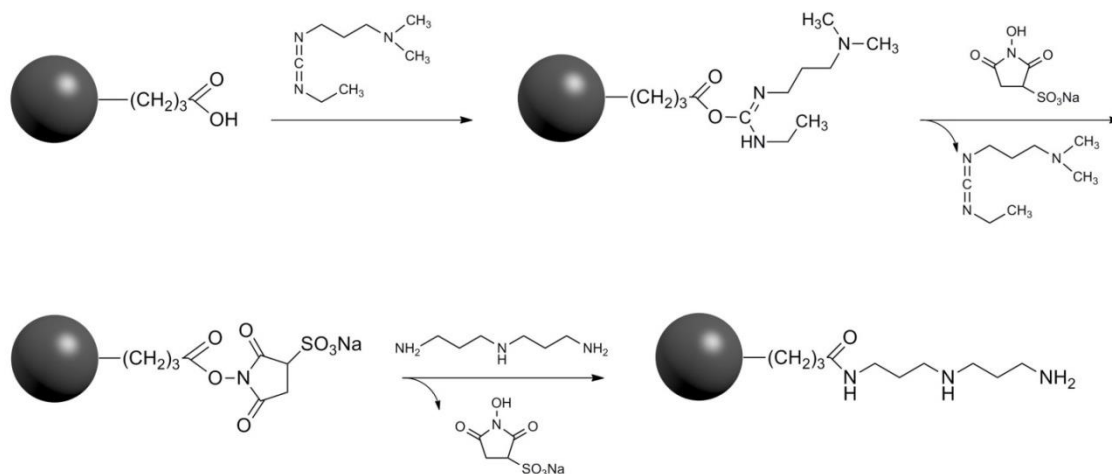
Tab. 7: Přehled použitých imobilizačních technik při přípravě afinitních nosičů s ligandem oracinem.

Částice	Spojovací raménko	Imobilizace spojovacího raménka	Typ oracinu	Imobilizace oracinu
Perlóza MG (1 ml)	Jeffamine ED-600 (5 mg)	Reduktivní aminace	Nemodifikovaný (500 µg)	Mannichova kondenzace
	Jeffamine ED-600 (5 mg)	Reduktivní aminace	Modifikovaný (100 µg)	Aminolýza esteru
SiMAG-NH ₂ (1 mg)	-	-	Nemodifikovaný (500 µg)	Mannichova kondenzace
	-	-	Modifikovaný (100 µg)	Aminolýza esteru
	Ahx (2 mg)	Karbodiimidová metoda	Modifikovaný (100 µg)	Aminolýza esteru
SiMAG-COOH (1 mg)	BAPA (2 mg)	Karbodiimidová metoda	Nemodifikovaný (500 µg)	Mannichova kondenzace
	BAPA (2 mg)	Karbodiimidová metoda	Modifikovaný (100 µg)	Aminolýza esteru
CM-Sepharosa (1 ml)	BAPA (2 mg)	Karbodiimidová metoda	Modifikovaný (100 µg)	Aminolýza esteru

3.5.2.1. Vazba spojovacích ramének na stacionární fáze karbodiimidovou metodou

Povrch partikulí SiMAG-COOH, SiMAG-NH₂ a CM-Sepharosy byl modifikován karbodiimidovou metodou dle Starose et al. (Staros *et al.*, 1986) pomocí bis-3-aminopropylaminu (BAPA) a kyseliny 6-aminohexanové (Ahx). 1 mg partikulí nebo 1 ml CM-Sepharosy byl resuspendován v 50 mM MES pufru (pH 6,0) a aktivován pomocí 7,5 mg 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) a 1,25 mg esteru N-hydroxysulfosukcinimidu (S-NHS). Následně byly přidány 2 mg spojovacího raménka BAPA v případě stacionárních fází SiMAG-COOH a CM-Sepharosy nebo Ahx v případě SiMAG-NH₂ mikropartikulí. Vzniklá reakční směs reagovala po dobu 3 hodin za neustálého míchání (Obr. 12). Modifikované partikule byly poté několikrát promyty 50 mM MES pufrem (pH 6,0) a převedeny do vhodného pufru v závislosti na použité imobilizační strategii oracinu.

Stacionární fáze SiMAG-COOH a CM-Sepharosa modifikované spojovacím raménkem BAPA byly použity jako tzv. kontrolní mikropartikule při stanovení účinnosti imobilizace oracinu kompetitivní ninhydrinovou metodou a při určení nespecificky interagujících proteinů s povrchem stacionárních fází.

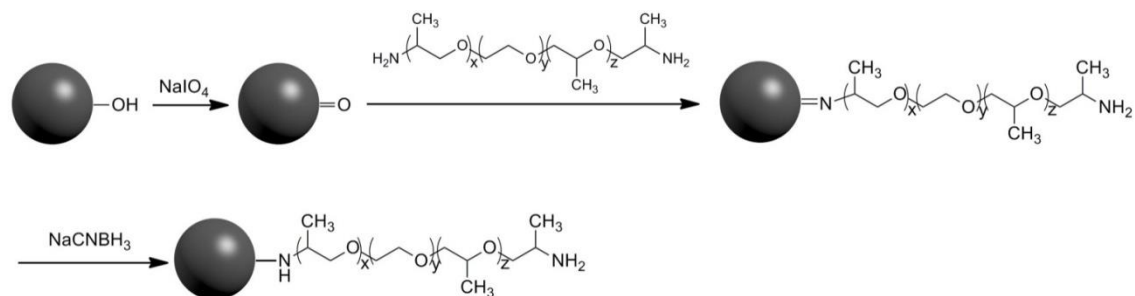


Obr. 12: Schématické znázornění vazby spojovacího raménka BAPA na povrch partikulí SiMAG-COOH pomocí karbodiimidové metody.

3.5.2.2. Vazba spojovacího raménka Jeffaminu ED-600 na povrch Perlózy MG reduktivní aminací

Perlóza MG byla modifikována pomocí prodlužovacího raménka Jeffamine ED-600. 1 ml partikulí byl promyt destilovanou vodou a aktivován 200 mM NaIO₄ po dobu 90 minut. Aktivovaná Perlóza MG byla poté převedena do 100 mM

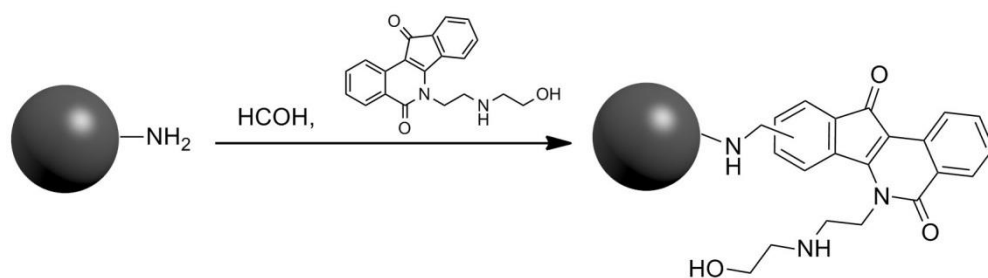
Na-fosfátového pufru (pH 7,4) a bylo přidáno 5 mg Jeffaminu ED-600. Vzniklá nestabilní Schiffova base byla po deseti minutách redukována na stabilní sekundární amin pomocí 7 mg NaCNBH₃ (Obr. 13). Modifikovaná Perlóza MG byla poté promyta 100 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,4) a převedena do vhodného pufru v závislosti na použité imobilizační strategii oracinu.



Obr. 13: Průběh vazby spojovacího raménka Jeffamine ED-600 na povrch Perlózy MG reduktivní aminací.

3.5.2.3. Imobilizace oracinu na povrch stacionární fáze Mannichovou kondenzací

Partikule obsahující -NH₂ funkční skupinu (SiMAG-NH₂, SiMAG-NH₂ + Ahx, SiMAG-COOH + BAPA a Perlóza MG + Jeffamine ED-600) byly resuspendovány ve 100 mM MES pufru s 150 mM NaCl (pH 4,7). K partikulím bylo přidáno potřebné množství oracinu (100-500 µg) a 37% formaldehydu (finální koncentrace 4,5%). Výsledná směs se reagovala přes noc při 37°C za neustálého míchání (Obr. 14). Následující den byl vzniklý afinitní nosič převeden do destilované vody a připraven k dalšímu použití.



Obr. 14: Schéma znázorňující imobilizaci oracinu na povrch stacionární fáze Mannichovou kondenzací.

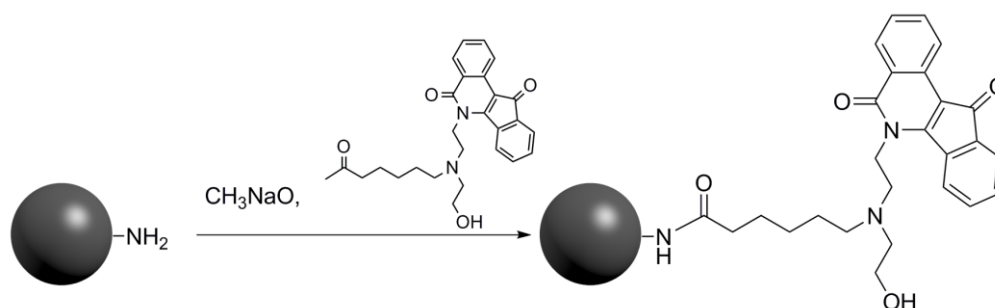
3.5.2.4. Imobilizace oracinu na povrch stacionární fáze aminolýzou esteru

Reakce katalyzovaná hydroxidem sodným

Partikule obsahující $-NH_2$ funkční skupinu (SiMAG- NH_2 , SiMAG- NH_2 + Ahx, SiMAG-COOH + BAPA, Perlóza MG + Jeffamine ED-600 a CM-Sepharosa + BAPA) byly resuspendovány v methanolu. Následně bylo přidáno 100 μg alkylovaného oracinu a potřebně množství NaOH (finální koncentrace 100 mM) (Blackburn and Jencks, 1968). Reakční směs byla zahřáta na 37°C a míchána přes noc. Druhý den byl vzniklý afinitní nosič převeden do destilované vody a připraven k dalšímu použití.

Reakce katalyzovaná methoxidem sodným

Partikule obsahující $-NH_2$ funkční skupinu (SiMAG- NH_2 , SiMAG- NH_2 + Ahx, SiMAG-COOH + BAPA, Perlóza MG + Jeffamine ED-600 a CM-Sepharosa + BAPA) byly resuspendovány ve směsi toluenu s dimethylformamidem (DMF) v poměru 1:2. Do reakční směsi bylo přidáno 100 μg modifikovaného oracinu a 5,4 mg methoxidu sodného (finální koncentrace 100 mM). Směs byla zahřáta na 60°C a míchána po dobu 16 hodin (Obr. 15) (Ohshima *et al.*, 2012). Druhý den byl vzniklý afinitní nosič převeden do destilované vody a připraven k dalšímu použití.



Obr. 15: Imobilizace modifikovaného oracinu na povrch stacionární fáze aminolýzou esteru.

3.5.2.5. Stanovení účinnosti imobilizace oracinu na povrch stacionárních fází

Účinnost imobilizace oracinu byla určena kompetitivní ninhydrinovou metodou na základě kvantifikace volných primárních aminoskupin, přítomných na povrchu afinitních nosičů. K 10 μl 20 mM ninhydrinu bylo přidáno 80 μl destilované vody a 20 μg magnetických partikulí. Po 30 minutové inkubaci byly partikule odebrány a ke zbylému supernatantu bylo přidáno 150 μl 20 mM glycinu. Získaná směs byla zahřáta na 80°C po dobu 5 minut. Vzniklý Ruhemannův purpur byl následně spektrofotometricky měřen při 570 nm.

3.5.3. Zpracování vzorků lidské jaterní tkáně

3.5.3.1. Příprava jaterních subcelulárních frakcí

Jaterní subcelulární frakce byly připraveny dle Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2009). Deset gramů lidské jaterní tkáně bylo homogenizováno v trojnásobném množství 100 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,4). Homogenát byl podroben centrifugaci po dobu 20 minut při 5 000 x g. Tím byly odstraněny zbytky tkáně, jádra a buněčné membrány. Odebraný supernatant byl podroben druhé centrifugaci při 20 000 x g na 60 minut, čímž došlo k sedimentaci mitochondrií. Supernatant po tomto kroku byl podroben třetímu centrifugačnímu kroku při 105 000 x g po dobu 65 minut. Tímto došlo k oddělení mikrosomální od cytosolické subcelulární frakce. Pro zajištění úplného odstranění cytosolické frakce byl získaný supernatant ještě třikrát resuspendován v homogenizačním pufru a třikrát centrifugován při 105 000 x g po dobu 65 minut. Po posledním centrifugačním kroku byly výsledné mikrosomy resuspendovány v Na-fosfátovém pufru s přídávkem 20% (v/v) glycerolu, pH 7,4 a takto uloženy v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

3.5.3.2. Solubilizace lidských jaterních mikrosomů

K mikrosomální subcelulární frakci byl přidán stejný objem solubilizačního pufru (10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 40% (v/v) glycerol, 1% (w/v) Triton X-100) a vzorek byl míchán na ledu po dobu 45 min. Poté byl vzorek centrifugován na 38 000 rpm po dobu 1 hodiny. Vzniklý supernatant (solubilizované mikrosomy) byl odebrán a podroben dalším krokům.

3.5.3.3. Odsolení a následná separace solubilizovaných mikrosomů pomocí iontově výměnné chromatografie

Solubilizované mikrosomy byly za pomoci přístroje Äkta Purifier odsoleny (kolona: HiTrap Desalting 5 ml; mobilní fáze: 25 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v), Triton X-100, pH 8,0; průtok: 0,5 ml/min) a následně rozděleny pomocí iontově výměnné chromatografie (HiTrap Q-Sepharosa FF 1 ml; pufr A (nanášecí): 25 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, pH 8,0; pufr B (eluční): 25 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v), Triton X-100, 1 M NaCl, pH 8,0; průtok: 0,5 ml/min). Zachycené proteiny byly z iontově-výměnné kolony eluovány

gradientovou elucí, přičemž bylo použito stoupající koncentrace pufru B (0-100 %). U všech získaných frakcí byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu.

3.5.3.4. Předčištění lidského jaterního cytosolu gelovou filtrací

Jeden mililitr lidského jaterního cytosolu (koncentrace 10 mg/ml), získaný během přípravy jaterních subcelulárních frakcí, byl zredukován na 100 μ l za použití zkumavek Amicon Ultra-4 10K (10 000 rpm po dobu 10 minut při teplotě 4°C) a rozdělen gelovou filtrací (kolona: Superdex 75 100/300 GL; mobilní fáze: 60 mM Na-fosfátový pufr, 1.1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0,01% (v/v), Triton X-100, pH 7,4; průtok: 0,5 ml/min). Frakce obsahující převážně proteiny o molekulové hmotnosti 37 kDa byla podrobena afinitnímu purifikačnímu kroku.

3.5.4. Zpracování mikrosomálních frakcí z Sf9 hmyzích buněčných linií s rekombinantně připraveným enzymem

3.5.4.1. Solubilizace mikrosomálních frakcí

Mikrosomální frakce z Sf9 hmyzí buněčné linie (3.1.1.2.), obohacená o cílový enzym, byla smíchána se solubilizačním pufrům (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol, 0,6% (w/v) Igepal-CA 630) v poměru 1:5 a na ledu míchána po dobu 45 minut. Vzorek byl poté centrifugován při 105 000 x g po dobu 1 hodiny.

3.5.4.2. Purifikace rekombinantně připravených proteinů

Cílové enzymy byly ze solubilizovaných mikrosomů purifikovány za pomoci His-trap afinitní chromatografie na přístroji Äkta Purifier (kolona: HisTrap FF 1 ml, pufr A (nanášecí): 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol, 1 mM Igepal CA-630, 30 mM imidazol, pH 7,4; pufr B (eluční): 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol, 1 mM Igepal CA-630, 500 mM imidazol, pH 7,4; nanášecí průtok: 0,1 ml/min, eluční průtok: 0,5 ml/min). Eluce zachycených enzymů byla provedena 100 % pufru B.

3.5.4.3. Odstranění imidazolu z roztoku purifikovaných proteinů

Imidazol byl z roztoku purifikovaného proteinu odstraněn několikanásobnou centrifugací při 4 000 x g a 4°C za použití zkumavek Amicon Ultra-4 10K. Proteiny byly takto převedeny do pufru o složení: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol, 0,05% (w/v) Igepal CA-630, pH 8,0.

3.5.5. Afinitní chromatografie

Afinitní separace s magnetickými nosiči byly provedeny metodou vsádkové chromatografie v chladící místnosti při teplotě 8°C a vzorky byly uchovávány na ledu. Prvotní pokusy byly provedeny dle protokolu 3.5.5.1. Z důvodu nedostatečné separační účinnosti byl postup dále modifikován (3.5.5.2.). Analýza komplexních biologických vzorků si následně vyžádala další úpravy separačního protokolu (3.5.5.3.).

Afinitní chromatografie s nemagnetickým nosičem byla provedena v kolonovém uspořádání na přístroji Äkta Purifier (3.5.5.4.).

3.5.5.1. Původní protokol afinitní chromatografie

Afinitní nosič byl ekvilibrován vazebným pufrům (100 mM Na-fosfátový pufr, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4) a inkubován s roztokem karbonyl-redukujícího enzymu (celkové množství 17,6 µg) po dobu jedné hodiny za neustálého míchání. Nenavázané enzymy byly odebrány a nosič byl několikrát promyt promývacím pufrům (60 mM Na-fosfátový pufr, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4). Zachycené enzymy byly následně uvolněny elučním pufrům (45 mM NH₄OH, 10% (v/v) glycerol, pH 10). Veškeré frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (3.5.6.) a byla stanovena jejich redukční aktivita vůči oracinu (3.5.10.).

3.5.5.2. Modifikovaný protokol afinitní chromatografie

Afinitní nosič byl promyt promývacím pufrům (60 mM Na-fosfátový pufr, 1.1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4) a inkubován s vybraným vzorkem po dobu jedné hodiny za neustálého míchání. Supernatant byl poté odebrán a afinitní nosič byl několikrát omyt promývacím pufrům. Zachycené enzymy byly eluovány 200 µl elučního pufru (150 mM NH₄OH, 1.1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, pH 11) po dobu 10 minut za míchání na rotátoru. Veškeré frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (3.5.6.) a byla stanovena jejich redukční aktivita vůči oracinu (3.5.10.).

3.5.5.3. Afinitní chromatografie komplexních biologických vzorků

Požadované množství afinitního nosiče bylo ekvilibrováno promývacím pufrům (60 mM Na-fosfátový pufr, 1.1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0,01% (v/v), Triton X-100, pH 7,4) a následně inkubováno s BSA blokačním pufrům

(60 mM Na-fosfátový pufr, 1.1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) BSA, 0,01% (v/v) Triton X-100, pH 7,4) po dobu 30 minut. Blokační pufr byl odstraněn a nosič byl krátce opláchnut promývacím pufrem. Dále byl k afinitnímu nosiči přidán vybraný vzorek. Po hodinové inkubaci za neustálého míchání na rotátoru byla proteinová frakce odebrána a nosič byl důkladně promyt promývacím pufrem. Proteiny mající afinitu vůči oracinu byly následně vymyty 200 μ l elučního pufru (150 mM NH₄OH, 1.1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol, pH 11) po dobu 10 minut. Získané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (3.5.6.) a byla stanovena jejich redukční aktivita vůči oracinu (3.5.10.)

Stejný protokol byl použit i pro identifikaci nescificky interagujících proteinů s povrchem stacionární fáze. Na místo afinitního nosiče s imobilizovaným oracinem byly nicméně použity kontrolní partikule (3.5.2.1.).

3.5.5.4. Afinitní chromatografie na nemagnetickém nosiči

Nemagnetický afinitní nosič, založený na stacionární fázi CM-Sepharosa (Tab. 7), byl použit pro přípravu chromatografické kolony (1 ml). Pomocí připravené kolony byla provedena afinitní separace na přístroji Äkta Purifier (pufr A (nanášecí): 60 mM Na-fosfátový pufr, 1.1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4; pufr B (eluční): 150 mM NH₄OH, 1.1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol, pH 11; nanášecí průtok: 0,1 ml/min, eluční průtok: 0,5 ml/min). Eluce zachycených enzymů byla provedena 100 % pufrem B. Všechny získané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (3.5.6.).

3.5.6. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza

Proteinové frakce, získané během různých separačních kroků, byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Laemmli, 1970) na 1,0 mm Tris-glycinových gelech (12,5% (w/v) separační gel a 4% (w/v) zaostřovací gel). Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem v poměru 4:1 (250 mM Tris-HCl, 10% (w/v) SDS, 30% (w/v) glycerol, 0.02% (w/v) bromfenolová modř, 5% (w/v) 2-mercaptoethanol) a v termomixéru zahřáty na 95°C po dobu 3 minut. Takto připravené vzorky byly nanášeny na gel a rozděleny působením konstantního napětí (100 V pro zaostřovací gel a 150 V pro separační gel). Obsažené proteiny byly

vizualizovaný pomocí koloidní Coomassie Brilliant Blue G-250 (Candiano *et al.*, 2004) a byla provedena denzitometrická analýza množství obsažených proteinů pomocí přístroje Molecular Imager Gel Doc XR.

3.5.7. Western blot analýza elučních frakcí po afinitní chromatografii

Proteiny obsažené v akrylamidovém gelu po rozdělení pomocí SDS-PAGE (3.5.6.) byly tankovou metodou přeneseny na Immobilon P PVDF membránu působením konstantního proudu 100 mA po dobu 16 hodin. Membrána s přenesenými proteiny byla omyta v TBS-T pufru (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,6) a následně inkubována s roztokem blokovacího mléka (5% (w/v) Blotting grade blocker v TBS-T pufru) po dobu 1,5 hodiny. Blokovací roztok byl poté odstraněn a membrána byla inkubována s roztokem primární protilátky (myší polyklonální anti-DHRS1 protilátka (ab70036), ředění 1:1 000, rozpuštěná v 3% (w/v) Blotting grade blocker v TBS-T, inkubace 16 hodin). Druhý den byla po odstranění primární protilátky a promytí membrány TBS-T pufrům přidána sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (králičí polyklonální anti-myší protilátka (Dako P 0260), ředění 1:20 000, rozpuštěná v 3% (w/v) Blotting grade blocker v TBS-T, inkubace 1,5 hodiny). K následné chemiluminiscenční detekci byl použit Amersham ECL Prime Western blotting systém.

3.5.8. Digeste proteinů z gelu pro hmotnostní spektrometrii

Vizualizované proteiny byly vyřezány z SDS-gelu a odbarveny působením 40% (v/v) acetonitrilu při 30°C. Disulfidové můstky byly redukovány 10 mM DTT po dobu 45 minut při 57°C. Takto zredukované cysteinové zbytky byly alkylovány pomocí 55 mM jodoacetamidu po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Gelové kousky byly poté několikrát opláchnuty destilovanou vodou a dehydratovány působením acetonitrilu. Obsažené proteiny byly následně štěpeny pomocí trypsinu modifikovaného pro sekvenaci (finální koncentrace 4 ng/μl) v 50 mM NH₄HCO₃. Štěpení probíhalo přes noc při 37°C za občasného míchání. Vzniklé peptidy byly druhý den izolovány trojnásobnou extrakcí pufrů s rostoucí koncentrací acetonitrilu (0,1% (v/v) TFA v 40% (v/v) acetonitrilu, 0,1% TFA (v/v) v 60% (v/v) acetonitrilu a 0,1% (v/v) TFA v 80% (v/v) acetonitrilu). Extrakty byly spojeny, odpařeny do

sucha na vakuové odparce, rozpuštěny v 0,1% TFA v 5% acetonitrilu a odsoleny pomocí Empore™ C18-SD SPE kolonek a poté opět odpařeny do sucha.

3.5.9. Hmotnostně spektrometrická analýza štěpených proteinů

Odparek po SPE extrakci (3.5.8.) byl resuspendován v 5 µl roztoku α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (5 mg/ml v 50% (v/v) acetonitrilu a 0,1% (v/v) TFA). Tato směs (0,8 µl) byla v triplikátech nanášena na MALDI destičku. Obsažené peptidy byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru AB 4800 MALDI-TOF/TOF. Analýza byla provedena na Ústavu molekulární patologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové PharmDr. Jurajem Lenčem, Ph.D.

3.5.10. Stanovení metabolické aktivity frakcí

3.5.10.1. Inkubace frakcí s oracinem

Metabolická aktivita proteinových frakcí, získaných během různých purifikačních kroků, byla stanovena na základě inkubace s 5 mM roztokem oracinu po dobu 30 nebo 60 minut při 37°C (Škarydová *et al.*, 2009). Reakce byla odstartována přidáním 10 µl 5 mM oracinu do inkubační směsi (finální složení směsi: 0,5 mM oracin; NADPH-generační systém: 0,8 mM NADP⁺, 6 mM glukosa-6-fosfát, 35 jednotek glukosa-6-fosfát dehydrogenasy, 3 mM MgCl₂; doplněno 100 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,4) do celkového objemu 100 µl) a zastavena přidáním 40 µl 26% (v/v) NH₄OH a zchlazením na 0°C. Vzniklý metabolit 11-dihydrooracin (DHO) byl vytřepán do 1 ml ethylacetátu po dobu 15 minut. Získaná organická fáze byla převedena do nových mikrozkušavek a odpařena do sucha ve vakuové odparce.

3.5.10.2. Podmínky UHPLC analýza metabolitů oracinu

Metoda pro stanovení metabolitu oracinu (DHO) dle Wsóla *et al.* (Wsól *et al.*, 1996) byla modifikována pro UHPLC (kolona: ZORBAX Eclipse Plus Rapid Resolution HD C₁₈ 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm; mobilní fáze: 10 mM hexansulfonan sodný a 0,04 mM triethylamine (pH 3,27) s acetonitrilem v poměru 78:22 (v/v); průtok: 0,7 ml/min; fluorescenční detekce: excitace/emise při vlnových délkách 340/418 nm). Vzorky z inkubací s oracinem (3.5.10.1.) byly rozpuštěny v 50 µl mobilní fáze a pro analýzu bylo nastříkováno 10 µl. Výsledky byly vyhodnoceny

pomocí metody kalibrační přímky a interpretovány jako množství ng DHO vzniklých během 30 minutové inkubace (ng DHO/30 min)

3.5.10.3. HPLC analýza enantiomerů

Chirální analýza vzniklých enantiomerů DHO byla provedena metou dle Wsóla et al. (1999) (kolona: OD-R Chiracel kolona 4,6 mm x 250 mm; mobilní fáze: 300 mM chloristan amonný (pH 3.0) s acetonitrilem v poměru 69:31 (v/v); průtok: 0,5 ml/min; fluorescenční detekce: excitace/emise při vlnových délkách 340/418 nm). Vzorky z inkubací s oracinem (3.5.10.1.) byly rozpuštěny ve 150 µl mobilní fáze a na kolonu bylo dávkováno 100 µl. Výsledky byly vyhodnoceny jako poměr procentuální poměr vzniklých enantiomerů.

3.5.11. Stanovení koncentrace bílkoviny

Koncentrace bílkoviny ve vzorcích byla stanovena pomocí metody BCA nebo metodou dle Bradfordové. Stanovení probíhalo v 96-jamkové mikrotitrační destičce dle přiložených protokolů.

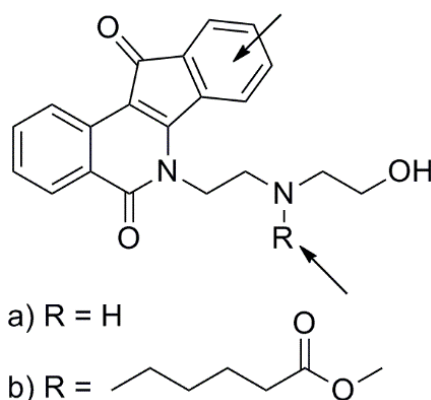
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Karboxyl-redukující enzymy zastávají v organismu řadu důležitých funkcí. Stále ovšem představují poměrně málo prozkoumanou skupinu proteinů, zejména v oblasti membránově vázaných zástupců. Jejich bližší studium tak může přinést zcela nové a zajímavé poznatky. Koncentrace karboxyl-redukujících enzymů v tkáních je ovšem velmi nízká a jejich izolace pomocí klasických neselektivních technik (např. iontově-výměnná chromatografie, hydrofobně interakční chromatografie nebo gelová filtrace) je tak velmi složitá a vyžaduje velké množství vstupního materiálu (Iwata *et al.*, 1990; Breyer-Pfaff and Nill, 2000; Maser *et al.*, 2002; Korecká *et al.*, 2005). Afinitní chromatografie je naproti tomu metodou velmi selektivní a představuje proto vhodnou techniku pro izolaci takových enzymů (Magdeldin and Moser, 1996). Z komerčně dostupných afinitních technik je při purifikacích reduktas stále používána například Red-Sepharosa, která využívá interakce mezi imobilizovaným červeným barvivem a širokou škálou NADP⁺ dependentních enzymů (Worrall, 1996). Metoda byla použita například při izolaci cytosolických enzymů AKR1A1 a AKR1B1 z lidské placenty (Vander Jagt *et al.*, 1990) nebo při purifikaci mikrosomálního enzymu 11 β -HSD1 z lidské jaterní tkáně (Maser *et al.*, 2002). Do současné doby ovšem nebyl k dispozici komerčně dostupný afinitní nosič, který by umožnil selektivní izolaci karboxyl-redukujících enzymů s aktivitou vůči xenobiotikům z komplexních biologických vzorků, jakými jsou například tkáňové nebo buněčné homogenáty. Cílem této práce tedy bylo vytvořit afinitní nosič, specifický pro skupinu karboxyl-redukujících enzymů, který by byl schopný izolovat tyto enzymy z komplexních biologických vzorků v aktivní formě, dostatečném množství a v požadované čistotě.

4.1. Strategie přípravy afinitního nosiče

Před vlastním započítím práce bylo nezbytné zvolit vhodnou strategii přípravy afinitního nosiče. Jak již bylo zmíněno, klíčovými faktory pro správnou funkci afinitního nosiče jsou vhodný ligand, správná prostorová orientace ligandu a fyzikálně-chemické vlastnosti spojovacích ramének a stacionárních fází (Roop-ngam and Thongboonkerd, 2010; Ziegler *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2015).

Jelikož afinitní nosič ke své funkci využívá základní vlastnosti enzymů, a to specifickou a reverzibilní tvorbu komplexu enzym-substrát/inhibitor, bylo v této práci jako vhodný ligand vybráno potenciální protinádorové léčivo oracin. V minulosti totiž bylo prokázáno, že se na jeho redukci podílí celá řada karbonyl-redukujících enzymů (Wsól *et al.*, 2004, 2007; Martin *et al.*, 2006; Novotná *et al.*, 2008; Škarydová *et al.*, 2009) a všechny by tak teoreticky mohli být izolovány pomocí afinitního nosiče s takovým ligandem. Analýzou redukce léčiva oracinu lidskými jaterními mikrosomy byla dále potvrzena přítomnost dalších „neznámých“ enzymů, které se podílejí na jeho metabolismu (Wsól *et al.*, 2003). Jelikož je hlavní metabolickou přeměnou oracinu v organismu redukce jeho karbonylové skupiny v poloze 11, bylo nutné toto léčivo imobilizovat tak, aby byla právě tato skupina stericky přístupná pro interakci s aktivním místem enzymů. Zvýšené variability tohoto parametru bylo dosaženo využitím různých vazebných míst přítomných v chemické struktuře oracinu (Obr. 16). Oracin tak byl imobilizován jako nemodifikovaný pomocí aromatických kruhů jeho indenoisochinolinového skeletu nebo jako modifikovaný (příprava viz 3.5.1.) prostřednictvím postranního řetězce s methylesterovou funkční skupinou.

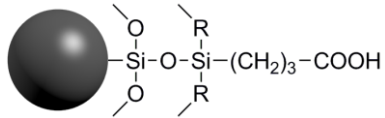
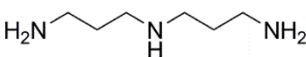
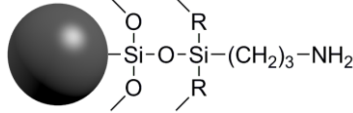
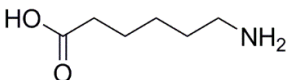
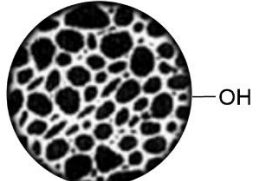
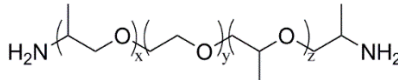
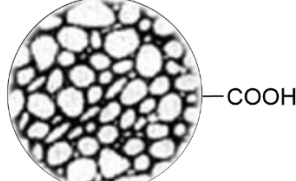


Obr. 16: Struktura oracinu, šipky znázorňují možná vhodná místa k jeho imobilizaci na povrch stacionárních fází pro přípravu afinitních nosičů.

Spektrum možných nosičů bylo dále rozšířeno implementací spojovacích ramének BAPA, Ahx a Jeffamine ED-600 lišících se svojí délkou a hydrofobními vlastnostmi. Jako stacionární fáze pro afinitní nosiče byly použity magnetické (SiMAG-NH₂, SiMAG-COOH, Perlóza MG) i nemagnetické (CM-Sepharosa) mikropartikule vyznačující se rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi

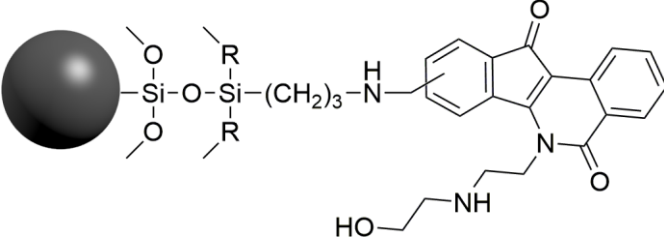
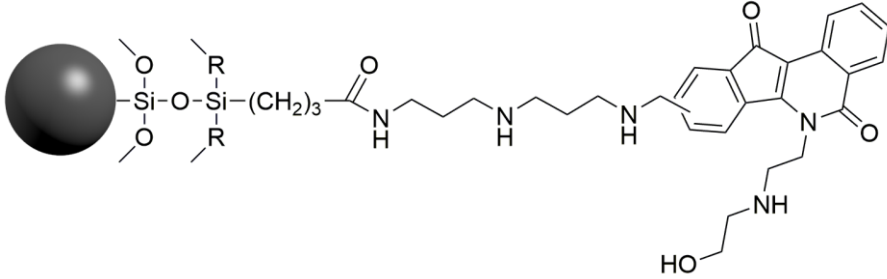
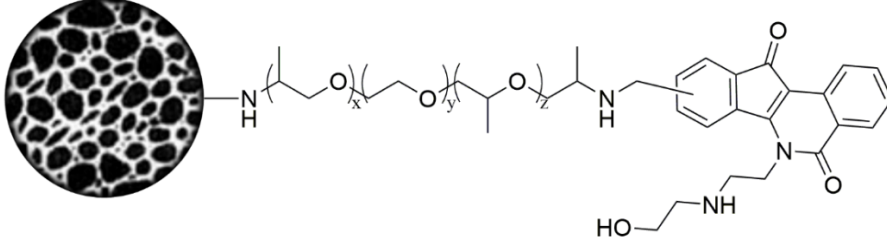
(hydrofilita, porozita, zeta potenciál), velikostí ($\varnothing_{\text{SiMAG}} = 1 \mu\text{m}$, $\varnothing_{\text{Perlóza MG}} = 80\text{-}100 \mu\text{m}$, $\varnothing_{\text{CM-Sepharosa}} = 45\text{-}165 \mu\text{m}$) a funkčními skupinami ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$). Seznam použitých stacionárních fází a spojovacích ramének je shrnut v Tabulce 8.

Tab. 8: Přehled stacionárních fází a spojovacích ramének použitých při syntéze afinitních nosičů.

Partikule	Struktura	Spojovací raménka	Struktura
SiMAG-COOH		BAPA	
SiMAG-NH2		Ahx	
Perlóza MG		Jeffamine ED-600	
CM-Sepharosa			

Kombinací výše zmíněných mikroparticulí, spojovacích ramének a ligandu oracinu bylo připraveno celkem 8 afinitních nosičů (Tab. 9, Tab. 10), které byly hodnoceny z hlediska schopnosti zachytit karbonyl-redukující enzymy v nativní, nedenaturované formě a v dostatečném množství. Při jejich vývoji tak byly sledovány následující parametry: vazebná kapacita, schopnost uvolnit zachycený enzym, zachování enzymové aktivity v elučních frakcích, selektivita a chemická stabilita.

Tab. 9: Přehled připravených afinitních nosičů s nemodifikovaným ligandem oracinem imobilizovaným Mannichovou kondenzací.

Kód nosiče	Struktura afinitního nosiče
AN01	
AN02	
AN03	

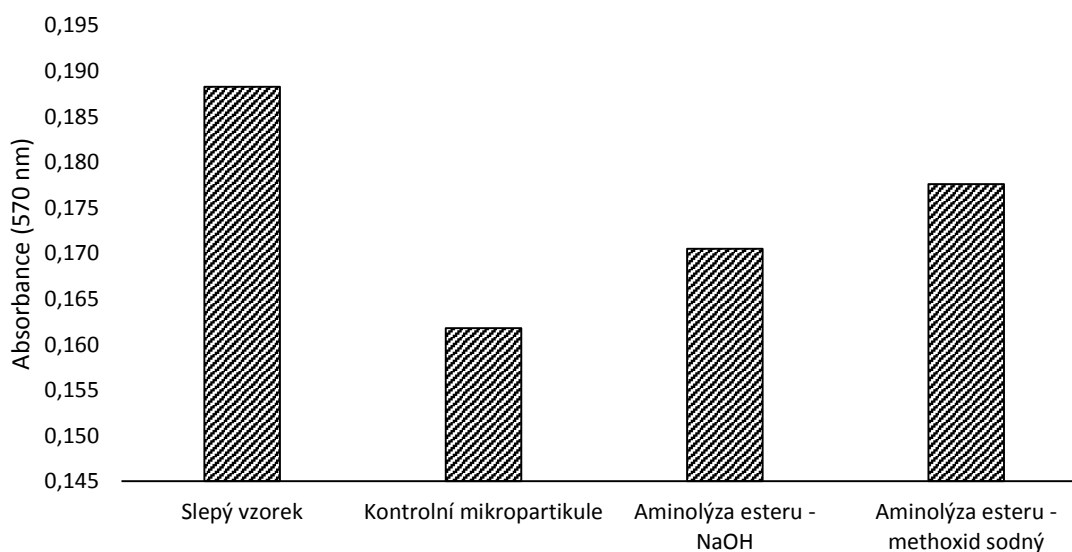
Tab. 10: Přehled připravených afinitních nosičů s modifikovaným ligandem oracinem immobilizovaným aminolýzou esteru.

Kód nosiče	Struktura afinitního nosiče
AN04	
AN05	
AN06	
AN07	
AN08	

4.1.1. Potvrzení účinnosti imobilizace oracinu na povrch stacionárních fází

Koncentrace imobilizovaného ligandu představuje velmi důležitý parametr afinitní separace, jelikož v případě jeho nedostatečné imobilizace by byla výrazně snížena kapacita připraveného afinitní nosiče. Příliš vysoká koncentrace ligandu může na druhou stranu zvýšit míru nespecifické sorpce biomolekul a to zejména v případě použití hydrofobního ligandu (Mohr, 1985). Bylo proto nutné nalézt optimální efektivitu imobilizační strategie.

Ligand oracin byl v průběhu přípravy afinitních nosičů imobilizován na povrch stacionárních fází pomocí dvou hlavních metod; Mannichovou kondenzací (3.5.2.3.) a aminolýzou esteru (3.5.2.4.1.). Účinnost těchto imobilizačních strategií byla hodnocena na základě kvantitativního stanovení volných primárních aminoskupin, přítomných na povrchu afinitních nosičů AN02 a AN05, pomocí kompetitivní ninhydrinové metody (3.5.2.5.) (Roop-ngam and Thongboonkerd, 2010). Jako kontrola byly použity mikropartikelule SiMAG-COOH modifikované spojovacím raménkem BAPA (Obr. 17).



Obr. 17: Stanovení účinnosti imobilizačních strategií oracinu (Mannichova kondenzace, aminolýza esteru v prostředí NaOH) pomocí kompetitivní ninhydrinové metody. Slepý vzorek představuje intenzitu Ruhemannova purpuru vzniklého bez přítomnosti jakékoli stacionární fáze.

Metoda využívá spektrofotometrického stanovení úbytku Ruhemannova purpuru při 570 nm, jehož intenzita je přímo úměrná množství dostupných primárních aminoskupin (Hwang and Ederer, 1975). Volné aminoskupiny

stacionárních fází, které nebyly využity pro vazbu oracinu, váží ninhydrin a snižují tak jeho množství pro následnou reakci s glycinem, následkem čehož dojde ke snížení intenzity Ruhemannova purpuru. Méně efektivní imobilizační strategie se tak projeví velmi slabým zbarvením, zatímco účinná imobilizace oracinu vede k výraznějšímu odstínu Ruhemannova purpuru. Z výsledků je patrné, že obě testované strategie vedly k úspěšné vazbě oracinu na povrch stacionárních fází, jelikož byla v obou případech naměřena vyšší intenzita Ruhemannova purpuru v porovnání s kontrolními mikropartikulemi. Potvrzením funkčnosti navrhovaných imobilizačních strategií bylo možné přejít k ověření schopnosti připravených afinitních nosičů zachytit karbonyl-redukující enzymy.

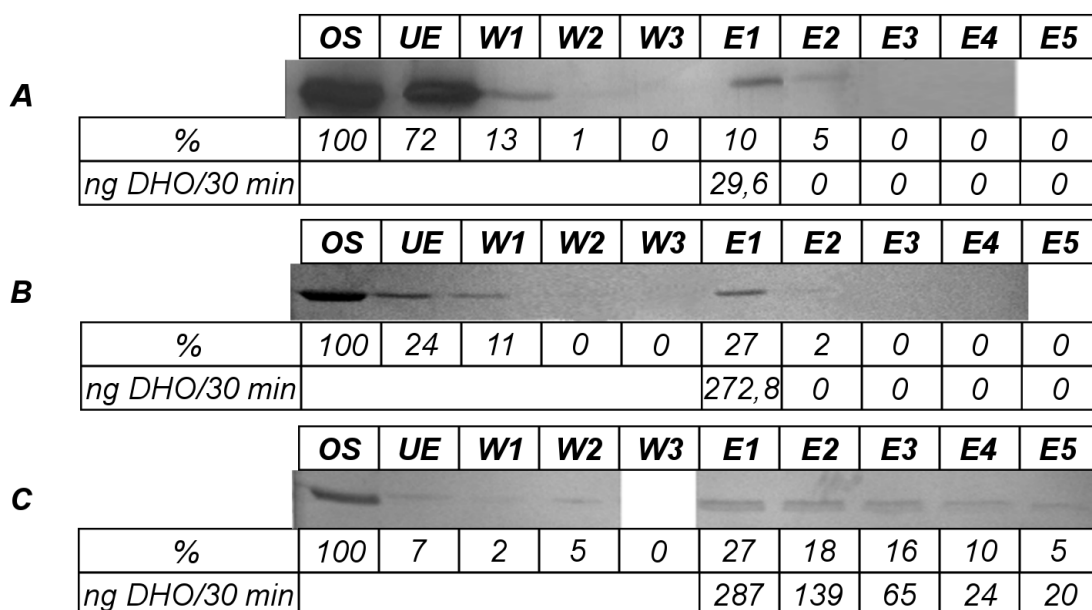
4.2. Ověření funkčnosti připravených afinitních nosičů

Afinitní nosiče AN01 - AN07 byly na počátku testovány na schopnost zachytit rekombinantně připravený karbonyl-redukující enzym AKR1C3, jehož aktivita vůči oracinu byla popsána již dříve (Wsól *et al.*, 2007). Všechny frakce získané po jednotlivých afinitních chromatografiích byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a bylo provedeno denzitometrické stanovení množství proteinu v jednotlivých frakcích (vyjádřeno jako procentuální množství proteinu). U vybraných elučních frakcí byla stanovena jejich redukční aktivita vůči oracinu. Tyto prvotní experimenty byly provedeny dle původního protokolu (3.5.5.1.).

4.2.1. Afinitní nosiče s oracinem imobilizovaným Mannichovou kondenzací

První pokusy byly provedeny s afinitním nosičem AN01, tedy s nosičem bez spojovacích ramének a oracinem imobilizovaným Mannichovou kondenzací. Efektivita záchytu enzymu AKR1C3 pomocí takového nosiče činila pouhých 10 % (Obr. 18 A) a také redukční aktivita byla zachována pouze v minimálním množství. Tento nízký záchyt karbonyl-redukujícího enzymu byl pravděpodobně způsoben prostorovou nepřístupností oracinu, který byl ukotven přímo na povrch mikropartikulí. Pro správnou funkci afinitního nosiče je důležité, aby klíčové funkční skupiny ligandů, odpovědné za vlastní interakci s makromolekulami, byly v dostatečné vzdálenosti od povrchu vlastního nosiče. Toho lze dosáhnout modifikací struktury ligandu nebo jeho umístěním na konec dlouhého spojovacího

raménka (Gala, 2002). Tento požadavek vedl k syntéze afinitních nosičů AN02 a AN03, kdy byla vzdálenost mezi ligandem oracinem a stacionární fází prodloužena zavedením spojovacích ramének BAPA (AN02) a Jeffamine ED-600 (AN03). Teoreticky tak byla umožněna snazší interakce mezi oracinem a aktivním místem enzymu AKR1C3. Výsledné nosiče následně prokázaly zlepšené vazebné vlastnosti pro enzym AKR1C3 oproti nosiči AN01 bez spojovacího raménka. Afinitní nosič AN02 vykazoval téměř třikrát větší schopnost zachytit karbonyl-redukující enzym AKR1C3 (Obr. 18 B) a v získaných elučních frakcích byla lépe zachována redukční aktivita vůči oracinu. Afinitní nosič AN03 byl dokonce schopný zachytit téměř veškerý přidaný enzym AKR1C3 (Obr. 18 C). Hydrofilní charakter Perlózy MG a její již dříve potvrzená biokompatibilita (Korecká *et al.*, 2005) pravděpodobně umožnila lepší zachování nativní struktury enzymu, výsledkem čehož byla větší výtěžnost afinitní chromatografie na tomto nosiči. Redukční aktivita elučních frakcí byla rovněž velmi dobře detekována, i když výsledný součet redukčních aktivit neodpovídal aktivitě původního vzorku. Důležité ovšem bylo, že naměřená redukční aktivita elučních frakcí korelovala se zachyceným množstvím enzymu, odhadnutým na základě elektroforézy. Enzym zachycený tímto nosičem ovšem nebylo možné uvolnit v jednom či dvou elučních krocích. Nejpravděpodobnějším důvodem byla vysoká porosita stacionární fáze Perlózy MG, která neumožnila rychlou změnu elučních podmínek, nutných k uvolnění enzymu (de Dios Alché and Dickinson, 1998). I když byl tedy afinitní nosič AN03 schopen zachytit větší množství enzymu AKR1C3 než tomu bylo v případě nosičů AN01 a AN02, nepředvídatelné eluční podmínky a nutnost použití většího objemu elučního pufu vedoucí k naředění zachyceného enzymu činili tento nosič méně vhodným pro jeho budoucí využití při izolaci lidských enzymů o nízké koncentraci.

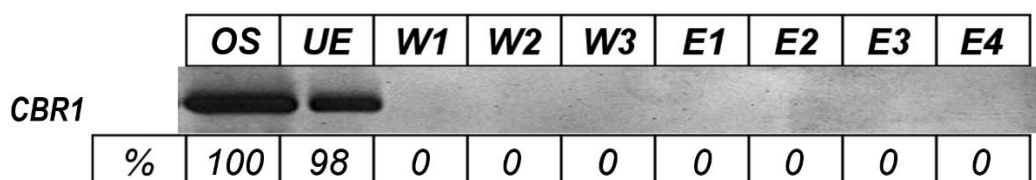


Obr. 18: SDS-PAGE analýza afinitních separací na nosičích oracinem vázaným Mannichovou kondenzací. (A) Separace na nosiči AN01; (B) separace na nosiči AN02; (C) separace na nosiči AN03 OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Na základě získaných výsledků byl pro další experiment vybrán nosič AN02. Nosič sice nevykazoval tak výraznou vazebnou kapacitu jako tomu bylo v případě nosiče AN03, zachycený enzym bylo nicméně možné uvolnit v jednom elučním kroku a nedocházelo k jeho nežádoucímu naředění. Vzhledem k předpokládanému využití afinitního nosiče při izolaci enzymů o velmi nízké koncentraci byl tento parametr rozhodujícím faktorem.

4.2.1.1. Stanovení schopnosti afinitního nosiče AN02 zachytit enzym CBR1

Vybraný afinitní nosič AN02 byl inkubován s karbonyl-redukujícím enzymem CBR1 z nadrodiny SDR, u kterého byla rovněž popsána schopnost redukovat oracin (Pilka *et al.*, 2009). V případě jeho úspěšné izolace by se jednalo o částečné potvrzení univerzálnosti afinitního nosiče AN02 vůči karbonyl-redukujícím enzymům s afinitou vůči oracinu, jelikož je enzym CBR1 strukturně odlišným typem proteinu oproti enzymu AKR1C3 z nadrodiny AKR.



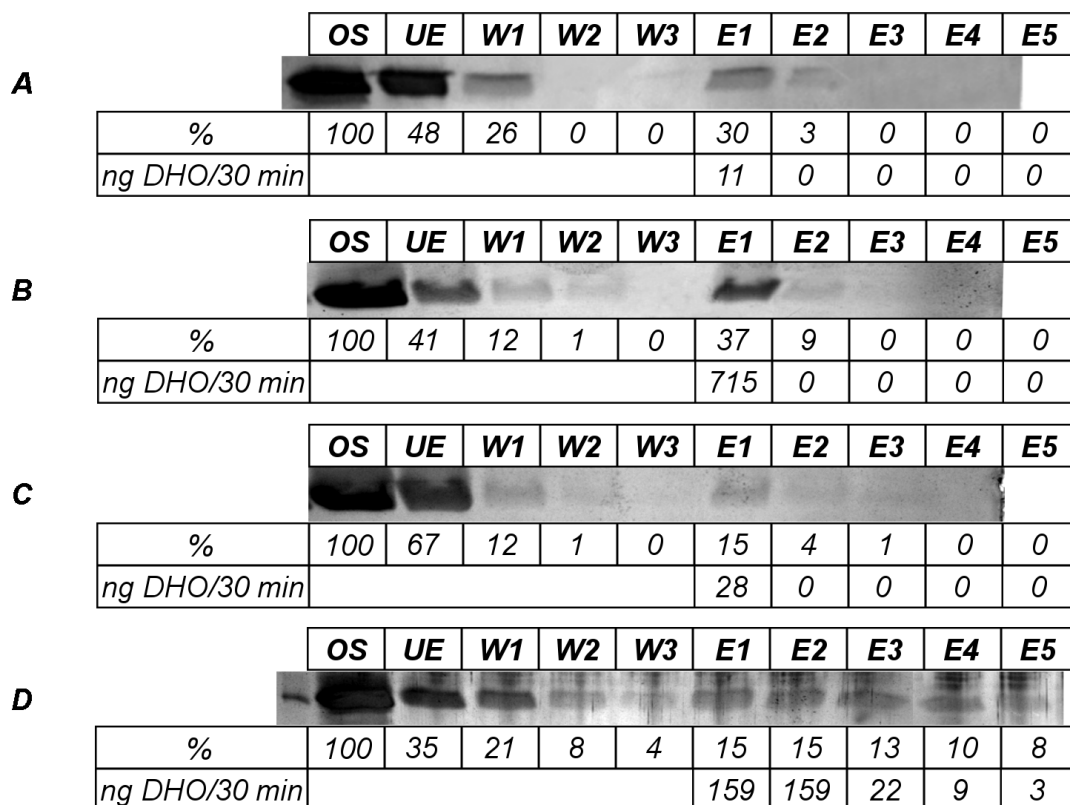
Obr. 19: SDS-PAGE analýza afinitní separace na nosiči AN02 s enzymem CBR1. OS-vzorek podrobený afinitní separací; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Pomocí afinitního nosiče AN02 ovšem tento enzym nebylo možné izolovat (Obr. 19). Tento jev bylo možné vysvětlit pravděpodobně nevhodnou prostorovou orientací ligandu oracinu, způsobenou imobilizační strategií Mannichovou kondenzací. Nebylo tak umožněno interakci mezi oracinem a aktivním místem enzymu CBR1, které je strukturně odlišné oproti enzymu AKR1C3. Jelikož při využití Mannichovy kondenzace mohlo dojít k navázání oracinu na povrch partikulí na několika pozicích jeho indenoisochinolinového skeletu, výsledkem takové reakce byla následně heterogenní směs mikropartikulí s rozdílnou schopností vázat karbonyl-redukující enzymy. Podobný efekt byl popsán Scholtenem et al. (Scholten *et al.*, 2006), kdy imobilizací ligandu cGMP pomocí dvou odlišných pozic jeho purinového skeletu byly získány afinitní nosiče schopné izolovat odlišné cílové molekuly. Z důvodu vysoké heterogenity afinitního nosiče AN02 způsobené imobilizací oracinu Mannichovou kondenzací a následnou nízkou reprodukovatelností získaných výsledků byla snaha o nalezení alternativní imobilizační strategie. Té bylo dosaženo cílenou modifikací postranního řetězce oracinu N-alkylací methylesterem kyseliny 6-bromhexanové (3.5.1.) a jeho následnou imobilizací aminolýzou esteru (3.5.2.4).

4.2.2. Afinitní nosiče s oracinem imobilizovaným aminolýzou oracinu

Modifikace struktury oracinu umožnila jeho imobilizaci prostřednictvím postranního řetězce, takže karbonylová skupina v poloze 11 indenoisochinolinového skeletu léčiva byla v tomto případě prezentována na povrchu nosiče bez možného sterického bránění spojovacím raménkem nebo stacionární fází, jako tomu bylo v případě imobilizace oracinu Mannichovou kondenzací. Modifikací struktury oracinu zároveň došlo k prodloužení vzdálenosti mezi vlastním léčivem a povrchem mikropartikulí. Prvním testovaným nosičem s imobilizovaným modifikovaným oracinem byl AN04. Cílená orientace oracinu

a zlepšené prostorové uspořádání afinitního nosiče AN04 přinesly mnohem lepší výsledky při zachycení karbonyl-redukujícího enzymu AKR1C3 v porovnání s výše popsanou separací na afinitním nosiči AN01, kdy byl oracin rovněž imobilizován bez využití spojovacího raménka (Obr. 20 A). Jelikož eluční frakce E1 obsahovala 30 % z celkového množství enzymu, byl tento výsledek spíše porovnatelný spíše s afinitní separací na nosiči AN02. V tomto případě ovšem nedošlo k zachování odpovídající redukční aktivity u zachyceného enzymu (pouze 0,5 % z aktivity původního vzorku OS). Důvodem této nečekaně nízké aktivity mohl být těsný kontakt mezi jednotlivými molekulami enzymu a povrchem magnetických mikropartikul i přes použití modifikovaného oracinu. Ačkoli je při afinitních chromatografiích vzdálenost 6-10 atomů uhlíku (nebo jejich ekvivalentu) mezi ligandem a povrchem stacionární fáze považována za dostatečnou (Bisen and Sharma, 2012), při využití nízkomolekulárních látek jako ligandů je často nezbytné použít delší spojovací raménka (Magdeldin and Moser, 1996). Prodloužení postranního řetězce oracinu o 6 atomů uhlíku pomocí kyseliny 6-bromhexanové tak bylo zřejmě nedostačující. Jelikož bylo jedním z našich kritérií při tvorbě afinitního nosiče zachování dostatečné redukční aktivity, byl tedy tento nosič shledán jako nevhodný. Ze stejných důvodů jako tomu bylo v případě syntézy afinitního nosiče AN02 byl i alkylovaný oracin navázán na partikule SiMAG-COOH modifikované spojovacím raménkem BAPA (AN05) a partikule SiMAG-NH₂ modifikované raménkem Ahx (AN06). Afinitní nosič AN05 následně prokázal do té doby nejlepší schopnost zachytit a následně efektivně uvolnit enzym AKR1C3 (Obr. 20 B). I když nedošlo k tak velkému záhytu, jak tomu bylo v případě nosiče AN03, dominantní část navázaného enzymu bylo možné eluovat v jednom elučním kroku. Oproti separaci na nosič AN04 byla u takto izolovaného enzymu zároveň zachována i významnější část jeho redukční aktivity (7 % z aktivity původního vzorku OS). Separace na strukturně podobném afinitním nosiči AN06 ovšem nepřinesla požadované zlepšení (Obr. 20 C). Nosič zachytil pouze 20 % z celkového množství enzymu AKR1C3 a jeho redukční aktivita byla zároveň velmi snížena. Pravděpodobným vysvětlením byla zvýšená hydrofobicita spojovacího raménka Ahx, v porovnání s raménkem BAPA, následkem čehož mohlo dojít k autoagregaci afinitního nosiče a tím i snížení jeho vazebné kapacity (Guiffant *et al.*, 2007).



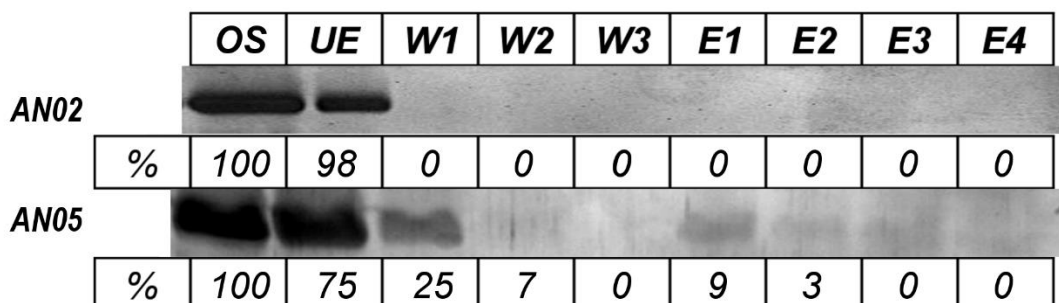
Obr. 20: SDS-PAGE analýza afinitních separací na nosičích oracinem vázaným aminolýzou esteru. (A) Separace na nosiči AN04; (B) separace na nosiči AN05; (C) separace na nosiči AN06; (D) separace na nosiči AN07. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Perlóza MG se spojovacím raménkem Jeffaminem ED-600 byla rovněž modifikována alkylovaným oracinem, nicméně získaný afinitní nosič AN07 vykazoval porovnatelné vlastnosti s afinitním nosičem AN03 s oracinem imobilizovaným Mannichovou kondenzací (Obr. 20 D). Opět došlo ke značnému záchytu enzymu AKR1C3, ale ani v tomto případě nebylo možné enzym uspokojivě uvolnit v jednom či dvou elučních krocích. Na základě získaných výsledků byly afinitní nosiče AN04, AN06 a AN07 shledány jako nevyhovující a pro další pokusy byl tedy vybrán pouze afinitní nosič AN05 složený z mikroparticulí SiMAG-COOH, spojovacího raménka BAPA a modifikovaného oracinu.

4.2.2.1. Stanovení schopnosti afinitního nosiče AN05 zachytit enzym CBR1

Stejně jako tomu bylo při testování afinitního nosiče AN02 byl i nosič AN05 inkubován s karbonyl-redukujícím enzymem CBR1. Analýza získaných frakcí potvrdila schopnost afinitního nosiče AN05 zachytit enzym CBR1 (Obr. 21). Bylo tedy zřejmé, že na rozdíl od afinitních nosičů s oracinem imobilizovaným

Mannichovou kondenzací byl nosič AN05 prostorově lépe konfigurován a byl proto potenciálně vhodnější pro izolaci karbonyl-redukujících enzymů náležících do obou hlavních nadrodin AKR i SDR proteinů z biologických vzorků.



Obr. 21: SDS-PAGE analýza znázorňující schopnost afinitních nosičů AN02 a AN05 zachytit enzym CBR1.

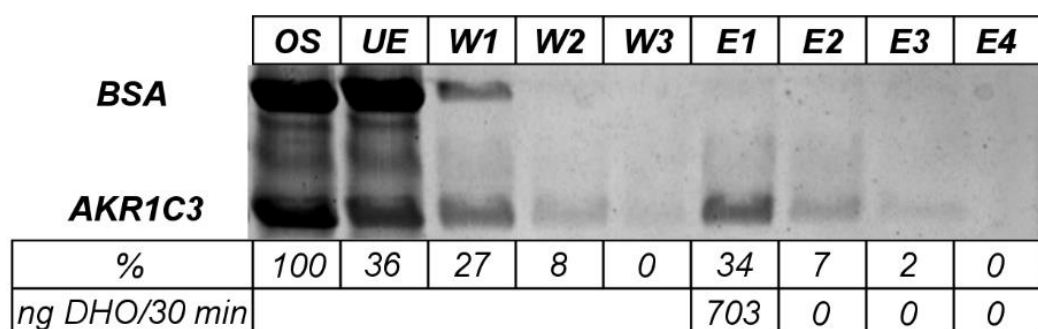
Při porovnání výsledků afinitních separací enzymů AKR1C3 a CBR1 pomocí nosiče AN05 je ale patrné, že množství zachyceného enzymu CBR1 bylo menší než tomu bylo v případě enzymu AKR1C3. Tento výsledek ovšem koresponduje s hodnotami Michaelisovy konstanty (K_m) uvedených enzymů. Jelikož má enzym CBR1, v porovnání s enzymem AKR1C3, 3-4 x vyšší hodnotu K_m vůči oracinu, má tudíž vůči tomuto substrátu i nižší afinitu (Wsól *et al.*, 2007; Novotná *et al.*, 2008). Jeho slabší záchyt tak plně odpovídá předpokladu, že karbonyl-redukující enzymy budou afinitním nosičem vázány na základě jejich afinit vůči oracinu.

I když všechny dosud testované afinitní nosiče (AN01-AN07) prokázaly schopnost zachytit karbonyl-redukující enzym AKR1C3, z následně vybraných nosičů AN02 a AN05 bylo možné izolovat i jiný enzym pouze v případě nosiče AN05, s imobilizovaným alkylovaným oracinem. Tento nosič tak prokázal největší potenciál k tomu, aby mohl být využit jako univerzální afinitní matrice pro izolaci karbonyl-redukujících enzymů s afinitou vůči ligandu oracinu a byl proto vybrán pro další testování.

4.3. Ověření selektivity vybraného afinitního nosiče AN05

Vybraný nosič AN05 bylo potřeba otestovat na jeho schopnost zachytit enzymy, které mají afinitu vůči oracinu v přítomnosti proteinů bez prokázané redukční aktivity vůči tomuto léčivu, jelikož se jednalo o klíčový parametr afinitního nosiče vzhledem k jeho potenciálnímu úspěšnému zařazení do purifikačního protokolu

karbonyl-redukujících enzymu z biologických vzorků. Afinitní nosič byl proto inkubován s modelovým vzorkem složeným z enzymu AKR1C3 a dvojnásobným molárním nadbytkem proteinu BSA. Jak je vidět na Obrázku 22, afinitní nosič selektivně zachytil pouze enzym AKR1C3, zatímco protein BSA nebyl schopen signifikantní vazby na povrch nosiče. Tento pokus tedy prokázal selektivitu afinitního nosiče vůči karbonyl-redukujícím enzymům v přítomnosti proteinu bez afinity vůči oracinu.



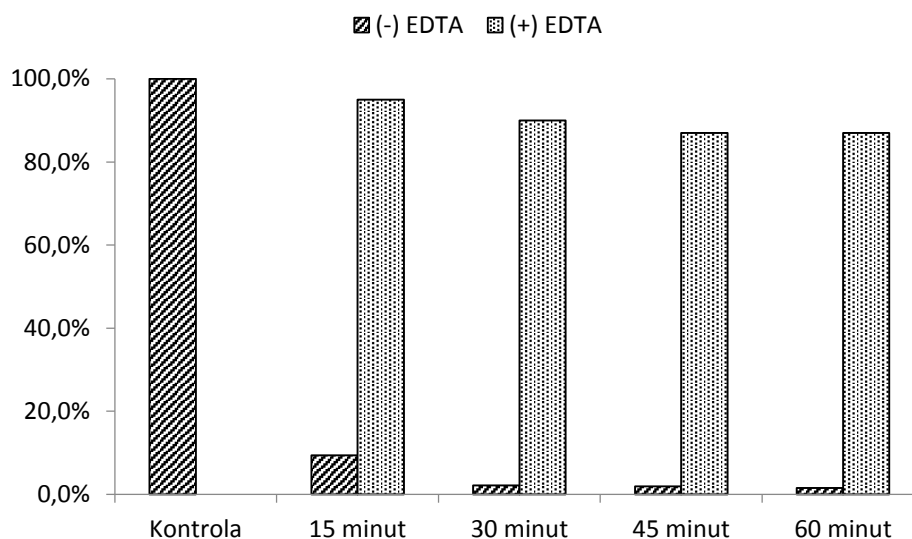
Obr. 22: SDS-PAGE znázorňující selektivitu afinitního nosiče AN05 vůči karbonyl-redukujícímu enzymu AKR1C3 v přítomnosti BSA. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Přítomnost jiného proteinu ve vzorku zároveň nikterak neovlivnila vazebnou kapacitu nosiče, který byl schopen zachytit porovnatelné množství enzymu AKR1C3 (přes 40 % z celkového množství), jako tomu bylo v případě testování afinitního nosiče s čistým enzymem (Obr. 20 B), s odpovídající karbonyl-redukující aktivitou vůči oracinu.

4.4. Modifikace separačního protokolu

Ačkoli výše zmíněný afinitní nosič AN05 prokázal svou schopnost zachytit modelové karbonyl-redukující enzymy AKR1C3 a CBR1 i selektivitu vůči enzymu AKR1C3 v přítomnosti BSA, celkový výtěžek afinitní separace nikdy nepřesáhl 50 % z celkového množství naneseného enzymu a jeho redukční aktivita byla vždy významně snížena. Možné vysvětlení se mohlo nacházet v chemické podstatě používaných magnetických mikropartikulí SiMAG-COOH. Jelikož je jádro těchto mikropartikulí tvořeno magnetitem (Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$)), samotné částice tak mohly sloužit jako potenciální zdroj nežádoucích iontů železa (Liao *et al.*, 2007). Bylo

prokázáno, že železité ionty jsou schopny působit oxidační stres, čímž dochází k poškození proteinů a organel (Stadtman, 1990; Letelier *et al.*, 2010). Tato teorie byla potvrzena inkubací kontrolních mikropartikulí (SiMAG-COOH + BAPA) s enzymem AKR1C3 při absenci a přítomnosti chelátoru EDTA (Obr. 23).



Obr. 23: Vliv chelátoru EDTA na redukční aktivitu enzymu AKR1C3 po inkubaci s kontrolními mikropartikulími. Aktivita enzymu byla měřena v časových intervalech 15 minut, 30 minut, 45 minut a 60 minut. Kontrola představuje míru redukční aktivity enzymu AKR1C3, který nebyl vystaven působení magnetických mikropartikulí.

EDTA je rutinně používaným agens, které brání oxidaci thiolových skupin proteinů a chrání je tak před oxidačním poškozením působeným volnými kovovými ionty (Fe, Cu, Zn, Mn) (López-Rayó *et al.*, 2011). Z Obrázku 24 je patrný protektivní vliv chelátoru EDTA na zachování redukční aktivity enzymu AKR1C3 vůči oracinu. Zatímco v experimentu bez přídavku EDTA byla aktivita enzymu významně snížena už po 15 minutách (méně než 10 % z původní aktivity), přídavek 1,1 mM EDTA do inkubační směsi zabránil výraznému poškození enzymu i po 60 minutové inkubaci. Separační protokol byl tedy modifikován ve smyslu složení vazebných i promývacích pufrů následkem čehož bylo nutné upravit i elučních podmínky (Tab. 11).

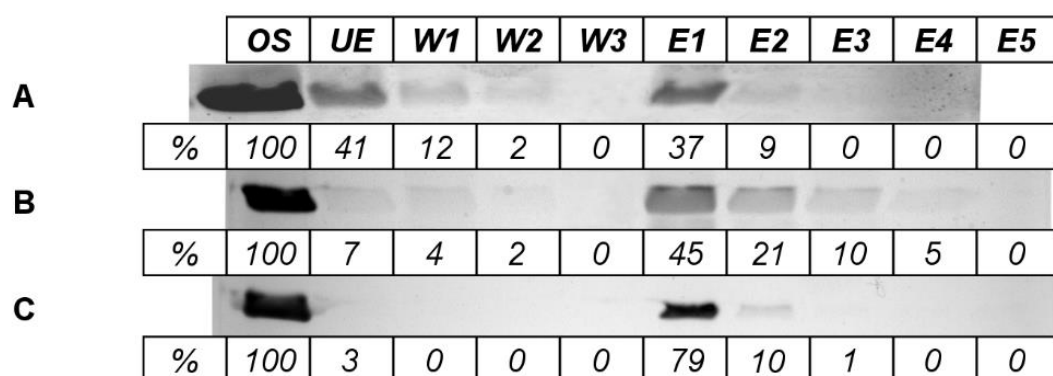
Tab. 11: *Shrnutí modifikací vazebných, promývacích a elučních podmínek separačního protokolu. Do všech pufrů bylo přidána 1,1 mM EDTA a síla elučního činidla byla zvýšena z 45 mM NH₄OH na 150 mM NH₄OH.*

Separací krok	Protokol	Pufry
Vazba	Původní protokol	100 mM Na-fosfátový pufr, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4 (1 h)
	Modifikovaný protokol	60 mM Na-fosfátový pufr, 1,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 10% (v/v) glycerol, pH 7,4 (1 h)
Promývání	Původní protokol	60 mM Na-fosfátový pufr, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4
	Modifikovaný protokol	60 mM Na-fosfátový pufr, 1,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, pH 7,4
Eluce	Původní protokol	45 mM NH ₄ OH, 10% (v/v) glycerol, pH 10 (1 min)
	Modifikovaný protokol	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, pH 11 (10 min)

4.4.1. Modifikace vazebných a elučních podmínek

Chelátor EDTA prokázal protektivní vliv na zachování redukční aktivity enzymu AKR1C3 vůči oracinu a bylo proto nutné testovat také jeho vliv na průběh celé afinitní chromatografie. Přídavek 1,1 mM EDTA do používaných pufrů následně významně zvýšil zachycené množství enzymu AKR1C3 (Obr. 24 B). Množství enzymu v povazebné frakci UE pokleslo na pouhých 7 % (oproti 41 % ze separace bez přídavku 1,1 mM EDTA (Obr. 24 A)) a celkové množství zachyceného enzymu se zvýšilo ze 46 % na 81 %. Chelatace kovových iontů, uvolňujících se z jádra magnetických mikroparticulí, pravděpodobně ochránila enzym před poškozením jeho nativní struktury a ten mohl následně interagovat s imobilizovaným ligandem. Zachycený enzym nicméně nebylo možné efektivně eluovat v jednom kroku a docházelo tak k jeho nežádoucímu naředění. Síla elučního činidla byla proto zvýšena ze 45 mM NH₄OH na 150 mM NH₄OH. Ani tato modifikace ovšem nepřinesla zlepšení v podobě efektivnějšího uvolnění zachycených enzymů. Toho bylo

dosaženo až prodloužením eluční doby z 1 na 10 minut (Obr. 24 C). Z obrázku je patrné, že přidavkem 1,1 mM EDTA do používaných pufrů a prodloužením doby působení elučního činidla byl značně zvýšen výtěžek proteinu AKR1C3 v eluční frakci E1. Množství takto uvolněného enzymu se z původních 37 % zvýšilo až na 79 % z celkového množství naneseného proteinu. Redukční aktivita vůči oracinu byla navíc u takto eluovaného enzymu pětkrát větší (37 % z aktivity původního vzorku OS) než tomu bylo v případě použití původního protokolu (7 % z aktivity původního vzorku OS). Jelikož ale eluční frakce E1 obsahovala 79 % z celkového množství proteinu, zachování pouhých 37 % z redukční aktivity původního vzorku OS znamenalo, že aktivita eluovaného enzymu byla snížena na poloviční hodnotu. Z toho důvodu byla snaha o vytvoření nové eluční strategie, která by umožnila efektivní eluci zachycených enzymů a zároveň umožnila lepší zachování jejich redukční aktivity (4.4.2.).



Obr. 24: SDS-PAGE analýza afinitních separací provedených za rozdílných vazebných a elučních podmínek. (A) Separace provedená dle původního protokolu. (B) Separace s 1,1 mM EDTA a 150 mM NH₄OH. (C) Separace s 1,1 mM EDTA a prodlouženou elucí z 1 na 10 minut pomocí 150 mM NH₄OH. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

4.4.2. Úprava eluční strategie

Nalezení optimální eluční strategie, která by umožnila efektivní ale zároveň šetrné uvolnění zachycené proteinu je mnohdy velmi složité, jelikož podmínky nutné k rozrušení interakce mezi proteinem a imobilizovaným ligandem mohou snadno narušit jeho strukturní stabilitu (Blumlein and McManus, 2013). Z toho důvodu byly testovány nejběžněji používané nedenaturující eluční strategie:

- (I) eluce ligandem oracinem

- (II) změna iontové síly
- (III) změna pH
- (IV) kombinace zmíněných přístupů

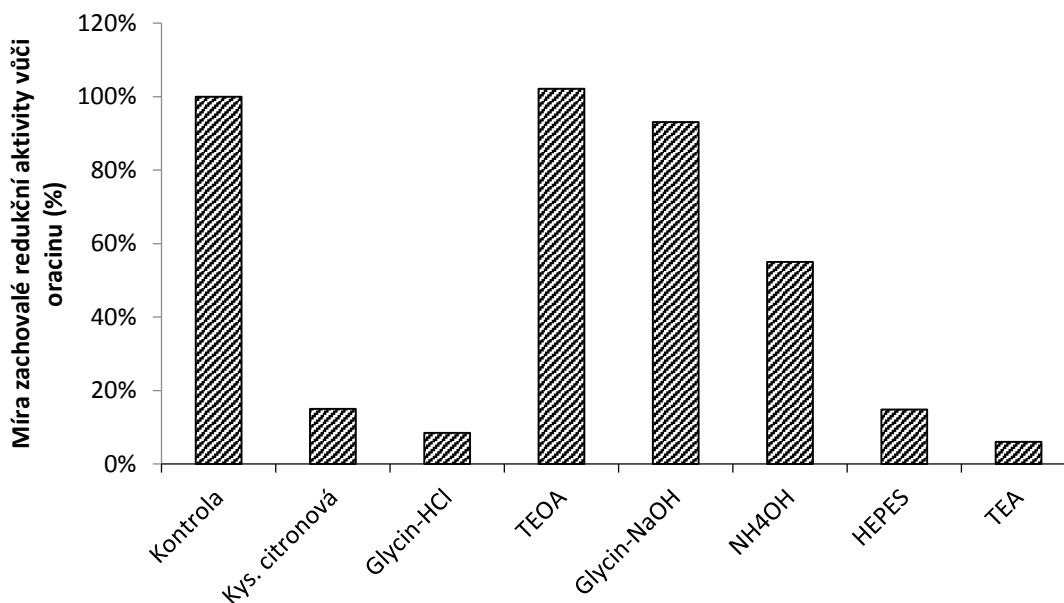
Eluce ligandem nebo látkou soutěžící o vazebné místo na povrchu afinitního nosiče představuje šetrnou metodu eluční strategie, jejíž hlavní předností jsou nedenedaturující podmínky, specifita interakce se zachycenými molekulami a možnost využití při studiu protein-protein interakcí (Firer, 2001; Hedhammar *et al.*, 2006). Metoda je hojně využívána například při purifikacích rekombinantně připravených proteinů pomocí afinitní chromatografie s imobilizovanými kovovými ionty (IMAC) (Block *et al.*, 2009) nebo při afinitních chromatografiích s imobilizovanými barvivou (např. Red-Sepharosa (Maser *et al.*, 2002), Blue-Sepharosa (Easterday and Easterday, 1974), Green-Sepharosa (Catimel *et al.*, 1996)). Eluce ligandem se ale v tomto případě ukázala jako neproveditelná z důvodu malé rozpustnosti oracinu (max. 8 mM v H₂O; prakticky nerozpustný v pufrch). Nebylo tak možné dosáhnout dostatečné koncentrace ligandu, která by efektivně uvolnila navázaný enzym.

Eluce pomocí změny iontové síly roztoku (1M NaCl, 3M MgCl₂), jako tomu bylo například v práci Pearse *et al.* (Pearse, 1988), sice byla účinnější ve smyslu uvolnění navázaného enzymu než eluce oracinem, získané frakce ovšem nebylo možné úspěšně analyzovat pomocí SDS-PAGE. Vysoká koncentrace solí ve vzorcích totiž znemožňuje kvalitní rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti a činí tak tuto eluční strategii nevhodnou pro předpokládané využití afinitního nosiče v izolaci karbonyl-redukujících enzymů z komplexních vzorků (See *et al.*, 1985). Nezbytné odsolení vzorků by následně mohlo způsobit ztrátu hledaných proteinů, zejména membránově vázaných zástupců. Z výše zmíněných důvodů se jako nejperspektivnější zdála být eluce na základě změny pH. Ačkoli se v principu nejedná o striktně denaturující metodu, některé proteiny mohou být výraznou změnou pH poškozeny (Blumlein and McManus, 2013). Pro zmírnění tohoto jevu je mnohdy nutné eluovat purifikovaný protein do roztoku neutralizačního pufru (Firer, 2001). Celkem bylo testováno 7 elučních činidel o různém pH (Tab. 12).

Tab. 12: Přehled elučních pufrů testovaných z hlediska schopnosti zachování aktivity enzymu AKR1C3 po 10 minutové inkubaci.

Eluční pufr	pH
100 mM glycin-HCl, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	3,0
100 mM kyselina citronová, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	3,0
100 mM glycin-NaOH, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	10,0
100 mM HEPES, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	10,0
100 mM triethylamin, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	11,5
100 mM triethanolamin, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	11,5
150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol	11,0

Vliv těchto pufrů na redukční aktivitu vůči oracinu byl ověřen 10 minutovou inkubací s enzymem AKR1C3 a následnou analýzou vzniklých metabolitů (Obr. 25). Oba kyselé pufrы významně snížili redukční aktivitu enzymu AKR1C3 vůči oracinu. Bazické pufrы se naproti tomu jeví jako značně šetrnější. Dva z nich (100 mM triethanolamin (TEAO) a 100 mM glycin-NaOH) dokonce zachovávaly více než 90 % redukční aktivity vůči oracinu v porovnání s kontrolním vzorkem (enzym AKR1C3 inkubovaný v Na-fosfátovém pufru, pH 7,4) a byly proto vybrány pro další experimenty.



Obr. 25: Redukční aktivita enzymu AKR1C3 vůči oracinu po 10 minutové inkubaci s testovanými kyselými a zásaditými elučními pufrů. Kontrolní vzorek představuje aktivitu enzymu v prostředí Na-fosfátového pufru, pH 7,4.

Vybrané pufrů (100 mM triethanolamin a 100 mM glycin-NaOH) byly testovány jako eluční činidla při afinitní chromatografii enzymu AKR1C3. Ačkoli byly oba pufrů schopné efektivně uvolnit zachycený enzym, ani u jednoho se nepotvrdil předpoklad šetrnějších elučních podmínek. V případě bazického glycinového pufru došlo k naměření podobných hodnot, jako tomu bylo v případě eluce pomocí 150 mM NH₄OH, pH 11 (4.4.1.). Redukční aktivita eluovaného enzymu byla v tomto případě rovněž snížena na poloviční hodnotu oproti předpokládanému výtěžku. Použitím triethanolaminového pufru dokonce došlo k úplné ztrátě redukční aktivity eluovaného enzymu. Příčina tohoto jevu zůstala nevysvětlena a mohla by být předmětem dalších studií.

Jelikož experimenty s výše zmíněnými elučními činidly nepřinesly požadované zlepšení, další modifikace byly provedeny s původním 150 mM NH₄OH, pH 11. Pro zvýšení stability eluovaných proteinů byl do pufru přidán 0,5mM dithiotreitol (DTT) nebo 25 % (v/v) ethylenglykol, jelikož se jedná o běžně používaná činidla zabraňující agregaci proteinů při purifikacích (Bondos and Bicknell, 2003; Dougan *et al.*, 2011). Na posílení eluční účinnosti byl testován thiokyanatan draselný (Fuchs *et al.*, 2001). Všechny testované kombinace takto připravených elučních činidel jsou shrnuty v Tabulce 13.

Tab. 13: Modifikace složení elučního pufru (150 mM NH₄OH, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, pH 11) ve snaze o zlepšení efektivity eluce a zvýšení stability eluovaných proteinů.

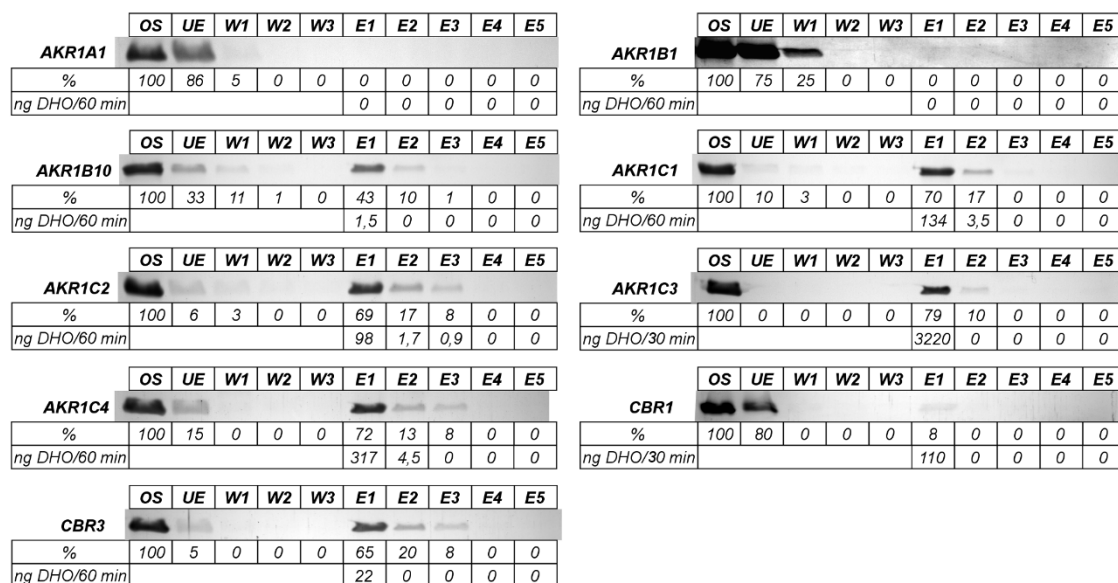
A	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT
B	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 100 mM KSCN
C	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 200 mM KSCN
D	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 500 mM KSCN
E	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 100 mM KSCN
F	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 200 mM KSCN
G	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 500 mM KSCN
H	150 mM NH ₄ OH, 1,1 mM EDTA, 25% (v/v) ethylenglykol

Žádný z testovaných přístupů nepřinesl zlepšení v porovnání s původním elučním pufrem (150 mM NH₄OH, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, pH 11). Redukční aktivita elučních frakcí vůči oracinu byla ve všech případech značně snížena a přídavek KSCN navíc rovněž ovlivňoval následnou SDS-PAGE analýzu získaných frakcí. Z těchto důvodů byl pro další experimenty zvolen původní pufr s hydroxidem amonným o vysokém pH, s kterým bylo dosaženo nejlepších výsledků ze všech testovaných možností.

4.5. Test univerzálnosti afinitního nosiče AN05 se známými cytosolickými enzymy

Potvrzením schopnosti afinitního nosiče zachytit a následně uvolnit enzymy AKR1C3 (4.2.2.) a CBR1 (4.2.2.1.) byl učiněn pouze první krok při vytvoření univerzální afinitní matrice pro karbonyl-redukující enzymy s afinitou vůči oracinu. Dalším parametrem, který bylo nutné potvrdit, byla jeho schopnost interakce se širší škálou karbonyl-redukujících enzymů s rozdílnými hodnotami *K_m* vůči oracinu. Afinitní nosič byl proto za použití modifikovaného separačního protokolu testován s devíti karbonyl-redukujícími enzymy z nadrodin aldo-ketoreduktas (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (CBR1, CBR3). S výjimkou enzymů AKR1A1 a AKR1B1 byla u všech zmíněných reduktas popsána schopnost metabolizovat oracin na 11-dihydrooracin (Martin *et al.*, 2006; Wsól *et al.*, 2007; Novotná *et al.*, 2008; Pilka

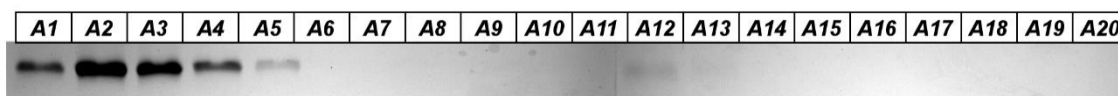
et al., 2009) a jejich úspěšná izolace tak byla očekávána. Afinitní separace se vzorky všech zmíněných enzymů potvrdily naše předpoklady. Enzymy bez afinity vůči oracinu (AKR1A1 a AKR1B1) nebyly schopné interagovat s imobilizovaným ligandem a nebyly proto detekovány v elučních frakcích. Enzymy s prokázanou afinitou vůči oracinu byly úspěšně zachyceny a následně eluovány v aktivním stavu (Obr. 26). Velmi patrná zde byla spojitost mezi afinitou vůči oracinu (hodnoty K_m jednotlivých enzymů) a výtěžností afinitních separací. Enzymy s nejnižšími hodnotami K_m (AKR1C1-4; $K_m = 90\text{-}160 \mu\text{M}$) (Wsól *et al.*, 2007; Novotná *et al.*, 2008) byly efektivně zachyceny a následně eluovány v největším množství (69 - 79 % z celkového množství naneseného enzymu). Enzymy s vyššími hodnotami K_m vůči oracinu (CBR3 = $200 \mu\text{M}$, AKR1B10 = $290 \mu\text{M}$, CBR1 > $300 \mu\text{M}$) (Martin *et al.*, 2006; Pilka *et al.*, 2009) byly zachyceny v menší míře (65 %, 43 % a 8 %). Experimenty tak potvrdily, že námi připravený afinitní nosič byl schopen interagovat s enzymy, které mají afinitu vůči ligandu oracinu.



Obr. 26: SDS-PAGE analýza afinitních separací na nosiči AN05 s čistými karbonyl-redukujícími enzymy AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 a CBR3. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

4.6. Nemagnetický afinitní nosič AN08

Magnetické vsádkové separační techniky s sebou přinášejí řadu výhod jako je nezávislost na přístrojovém vybavení nebo možnost práce s komplexními biologickými vzorky bez předchozího předčištění (Schuster *et al.*, 2000). Nevýhoda tohoto přístupu ovšem spočívá v jeho obtížné automatizaci, díky čemuž byl námi vytvořený separační protokol méně vhodný pro jeho případné využití jako standardního purifikačního postupu v ostatních vědeckých laboratořích. Ačkoli jsou v současné době dostupné i automatické magnetické separátory, netvoří na rozdíl od kapalinových chromatografů běžnou součást vědeckých laboratoří. Z toho důvodu byla snaha o vytvoření afinitního nosiče, který by mohl sloužit k vytvoření standardní chromatografické kolony. Při jeho syntéze se vycházelo ze struktury afinitního nosiče AN05, který již prokázal svou univerzálnost vůči karbonyl-redukujícím enzymům. Na místo mikropartikulí SiMAG-COOH byla ale jako stacionární fáze použita CM-Sepharosa. První pokusy o přípravu takového nemagnetického nosiče ovšem skončily nezdarem, jelikož se imobilizační strategie oracinu pomocí aminolýzy esteru v prostředí NaOH ukázala jako nedostatečně efektivní. Výsledný nosič byl následně schopen zachytit pouze minimální množství karbonyl-redukujícího enzymu AKR1C3, který byl eluován ve frakci A12 (Obr. 27). Zbytek proteinu prošel afinitní kolonou bez interakce a byl detekován v promývacích frakcích A1-A5. Imobilizaci oracinu proto bylo nutné modifikovat, aby došlo ke zvýšení vazebné kapacity připravovaného nosiče.

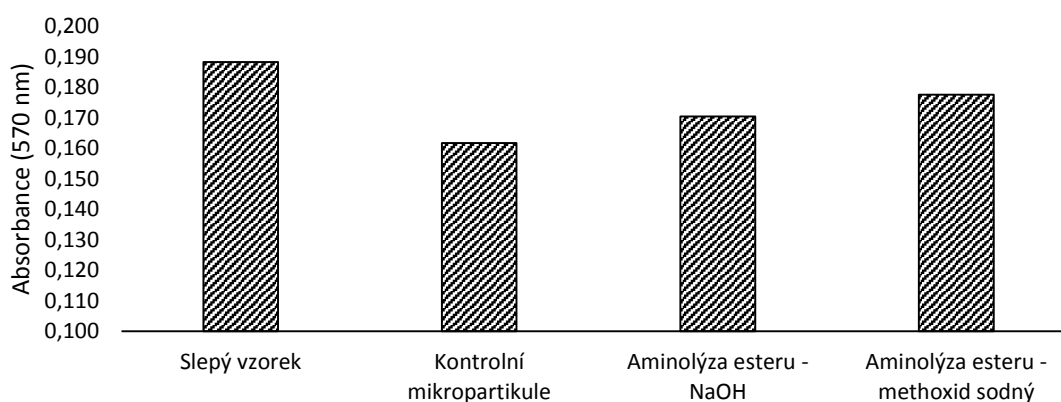


Obr. 27: SDS-PAGE analýza afinitní separace na nemagnetickém afinitním nosiči AN08 s oracinem imobilizovaným aminolýzou esteru v prostředí NaOH.

4.6.1. Modifikace imobilizační strategie oracinu

Ve snaze o zvýšení kapacity afinitního nosiče byla testována imobilizace oracinu aminolýzou esteru s methoxidem sodným jako katalyzátorem (Ohshima *et al.*, 2012). Účinnost této imobilizační strategie byla ověřena stejně jako v případě mikropartikulí SiMAG kompetitivní ninhydrinovou metodou (Obr. 28). Touto novou strategií bylo možné navázat větší množství oracinu než v případě reakce

v prostředí NaOH. Tento modifikovaný protokol byl proto použit při syntéze afinitního nosiče AN08.

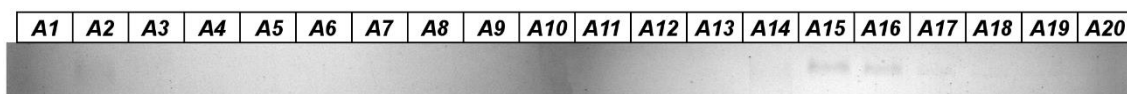


Obr. 28: Stanovení účinnosti imobilizačních strategií oracinu (aminolýza esteru v prostředí NaOH a aminolýza esteru katalyzovaná methoxidem sodným) pomocí kompetitivní ninhydrinové metody. Slepý vzorek představuje intenzitu Ruhemannova purpuru vzniklého bez přítomnosti jakékoli stacionární fáze.

4.6.2. Afinitní chromatografie

Nemagnetický nosič AN08, připravený modifikovanou metodu aminolýzy esteru, byl rovněž testován na schopnost zachytit karbonyl-redukující enzym AKR1C3 (Obr. 29). Nosič byl schopen zachytit mnohonásobně větší množství enzymu AKR1C3, než tomu bylo v případě nosiče připraveného aminolýzou esteru v prostředí NaOH. Ačkoli byla kapacita nově připraveného nosiče dostačující, aby zachytil téměř veškerý nanosený enzym (enzym detekován pouze v promývací frakci A2), z důvodu velkého objemu afinitní matrice docházelo během eluce k jeho naředění (detekce v elučních frakcích A14-A18) (de Dios Alché and Dickinson, 1998), stejně jako tomu bylo v případě afinitních nosičů AN03 a AN07. Ani tento nosič proto nebyl zcela vhodným pro jeho plánované využití při purifikaci neznámých karbonyl-redukujících enzymů z malých množství tkáňových vzorků, jelikož se tyto enzymy přirozeně vyskytují jen v nízkých koncentracích (Rosemond and Walsh, 2004). Vytvoření afinitní matrice ve formě chromatografické kolony s sebou ovšem přineslo potenciální výhodu v podobě automatizace separačního protokolu a možnosti programování průběhu afinitní separace, což je v případě metody vsádkové chromatografie přinejmenším složitě. Zapojení do průtokového chromatografického zařízení dále přináší možnost izolovat karbonyl-redukující enzymy s afinitou vůči oracinu z objemných vzorků. Afinitní nosič AN08 by tak mohl

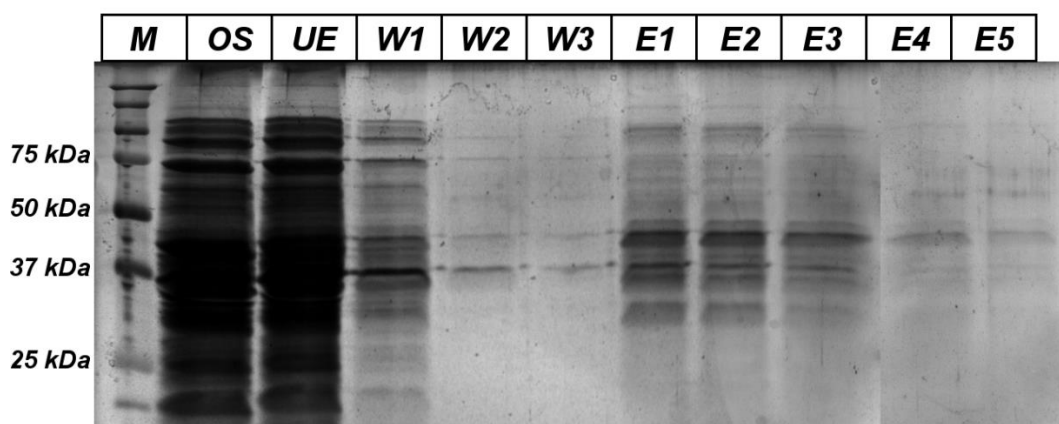
nalézt uplatnění například při rozsáhlejších analýzách exprese karbonyl-redukujících enzymů na úrovni proteinů z rozličných tkání.



Obr. 29: SDS-PAGE analýza afinitní separace na nemagnetickém afinitním nosiči AN08 s oracinem imobilizovaným aminolýzou esteru katalyzovanou methoxidem sodným.

4.7. Afinitní chromatografie modelového biologického vzorku s nosičem AN05

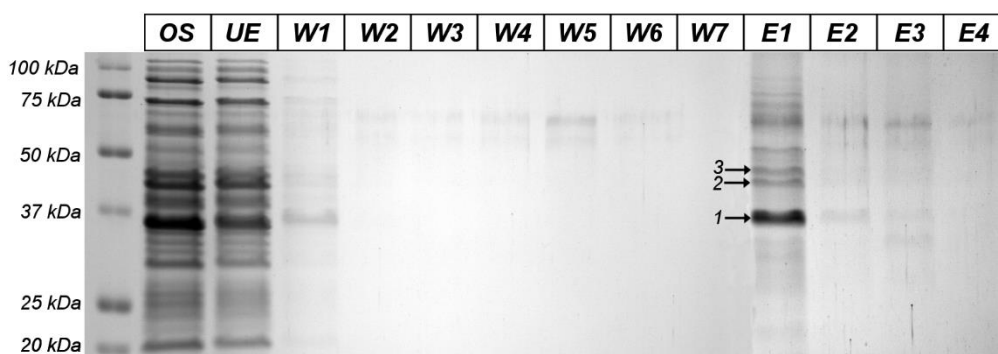
Karbonyl-redukující enzymy se ve tkáních nacházejí většinou ve velmi malém množství (Rosemond and Walsh, 2004) a jejich izolace je proto obvykle velmi obtížná. Schopnost zachytit takové enzymy z reálných biologických vzorků tedy byla stěžejním parametrem vyvinutého afinitního nosiče AN05. Dosud byl proveden pouze základní test se dvěma proteiny (AKR1C3 v přítomnosti BSA, kapitola 4.3.), který alespoň částečně prokázal selektivitu nosiče. Tento experiment nicméně nevyprávěl o schopnosti nosiče zachytit karbonyl-redukující enzymy z tak komplikované směsi jakým je biologický vzorek. Jako vhodný model byl pro takový experiment byl vybrán supernatant z geneticky modifikovaného organismu *E. coli* exprimující rekombinantní protein AKR1C3. Vzorek byl dostatečně komplexní a cílový enzym byl přítomen ve větších množstvích, než jaké se očekávají v lidských tkáních. Na rozdíl od lidské jaterní tkáně se rovněž jednalo o dobře dostupný typ biologického materiálu. V případě úspěšné izolace enzymu AKR1C3 by se jednalo o jednoznačné potvrzení funkčnosti námi připraveného afinitního nosiče. První pokusy ovšem odhalily potíže spojené s nesespecifickými interakcemi (Obr. 30). Ty byly pravděpodobně způsobeny velkým nesespecifickým povrchem magnetických mikroparticulí a následnou sorpcí proteinů na jejich povrch (Saghatelian and Cravatt, 2005; Miao *et al.*, 2012). Separační protokol tedy musel být modifikován z důvodu snížení těchto nesespecifických interakcí.



Obr. 30: SDS-PAGE analýza afinitní chromatografie supernatantu z geneticky modifikované *E. coli*. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

4.7.1. Modifikace protokolu afinitní chromatografie pro komplexní vzorky

K omezení nesespecifických interakcí mezi proteiny a stacionárními fázemi se běžně využívá několik přístupů, které mohou být aplikovány samostatně nebo v kombinaci (Ward and Swiatek, 2009; Liu and Guo, 2014). Nesespecifický povrch stacionární fáze může být blokován pomocí různých látek jako je například BSA (Stadtman, 1990), kasein (Arkin *et al.*, 2012) nebo ethanolamin (Duellman and Burgess, 2009). K omezení adhezivních vlastností lepivých proteinů, běžných zejména u membránových zástupců, se obvykle používá přídavku malých koncentrací detergentů (Arkin *et al.*, 2012) a promývací fáze separačního protokolu bývá výrazně prodloužena (Labrou, 2003; Ward and Swiatek, 2009; Liu and Guo, 2014). V našem experimentu byl testován efekt 1% (w/v) BSA jako blokačního činidla nesespecifického povrchu magnetických mikroparticulí. Do promývacího pufru byl dále přidán 0,01% (v/v) Triton X-100 z důvodu potlačení možných protein-protein interakcí (Arkin *et al.*, 2012) a promývací fáze afinitní chromatografie byla prodloužena ze tří na sedm kroků. Zařazením výše zmíněných modifikací došlo k výraznému snížení nesespecificky zachycených proteinů (Obr. 31). Téměř veškeré proteiny byly navíc efektivně eluovány již v první eluční frakci E1.



Obr. 31: SDS-PAGE analýza afinitní separace supernatantu geneticky modifikované *E. coli*. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Molekulová hmotnost enzymu AKR1C3 i ostatních karbonyl redukujících enzymů činí ~ 37 kDa. Proteinový proužek z této oblasti (1) byl proto vyříznut z SDS-polyakrylamidového gelu, štěpen pomocí trypsinu a obsažené proteiny byly následně analyzovány pomocí MS. Hlavním identifikovaným proteinem zde byl enzym AKR1C3, čímž došlo k potvrzení schopnosti afinitního nosiče zachytit karbonyl-redukující enzym s afinitou vůči oracinu z komplexních biologických vzorků. Dále zde byl identifikován vnější membránový protein (ompf) z geneticky modifikovaného organismu *E. coli*, který tomuto organismu slouží jako transmembránový transportér malých molekul jako jsou např. antibiotika (Ziervogel and Roux, 2013). Nebylo tedy vyloučeno, že protinádorové léčivo by mohlo být molekulárním cílem tohoto proteinu. Pravděpodobněji se ale jednalo o nescifickou interakci s povrchem nosiče. V eluční frakci E1 byly dále identifikovány další dva proteiny z geneticky modifikovaného organismu *E. coli*: elongační faktory Tu1 a Tu2 (EF-Tu1, EF-Tu2) (proteinové proužky 2 a 3) (Tab. 14). I tyto proteiny mohly představovat molekulární cíle oracinu. Bylo nicméně popsáno, že geneticky modifikované organismy *E. coli* mohou během exprese požadovaného proteinu syntetizovat ve větší míře i proteiny nutné k jeho transkripci a translaci, mezi něž patří i elongační faktory Tu (Miroux and Walker, 1996). Bylo tedy pravděpodobné, že se nejednalo o molekulární cíle oracinu, ale že jejich izolace byla způsobena jejich značným množstvím v testovaném supernatantu.

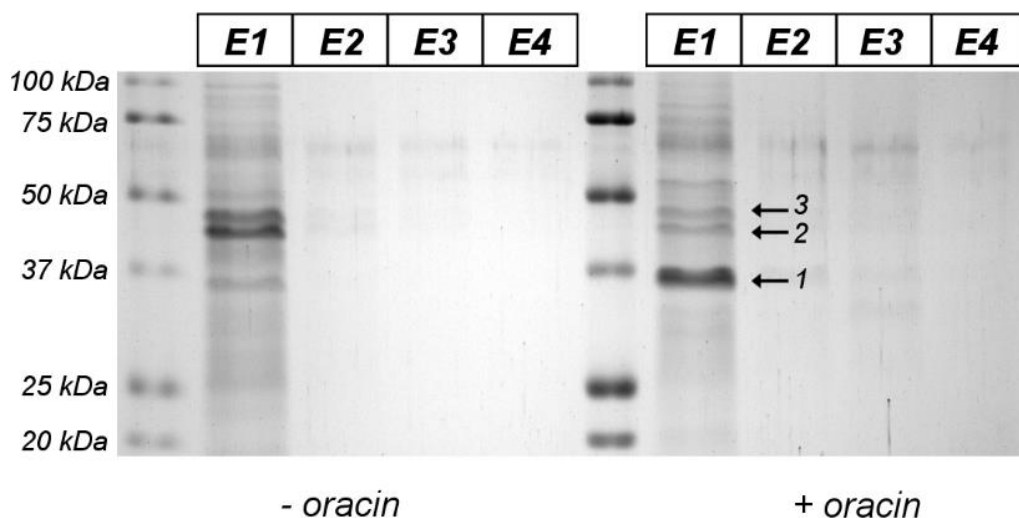
Tab. 14: Proteiny identifikované pomocí MS v příslušných proteinových proužcích po afinitní chromatografii supernatantu z geneticky modifikované *E. coli*.

Proteinový proužek	Identifikované proteiny
1 (~ 37 kDa)	AKR1C3 ompF
2, 3 (~ 43 kDa)	EF-Tu1, EF-Tu2

4.7.2. Stanovení nespecifických interakcí s povrchem afinitního nosiče

Při afinitních chromatografiích je obvykle nutné identifikovat proteiny, které nespecificky interagují s povrchem stacionární fáze a odlišit je tak od skutečných molekulárních cílů imobilizovaného ligandu (Zheng *et al.*, 2015). Odpověď na otázku, zda proteiny geneticky modifikovaného organismu *E. coli* ompf, EF-Tu1 a EF-Tu2 představují molekulární cíle oracinu nebo zda se jedná pouze o nespecificky interagující proteiny s povrchem afinitního nosiče, bylo teoreticky možné najít několika způsoby. K testovanému vzorku mohl být před vlastní separací přidán volný ligand, který by soutěžil o vazebné místo proteinů s imobilizovaným ligandem. Proteiny mající afinitu vůči ligandu by následně nebyly identifikovány v elučních frakcích (Zheng *et al.*, 2015). Vzhledem k výše zmíněné nízké rozpustnosti oracinu ovšem tento přístup nemohl být uplatněn. Další metodou je příprava nosiče se strukturním analogem používaného ligandu bez biologické aktivity (Sato *et al.*, 2010). Ani tato varianta ovšem nebyla v našem případě možná z důvodu absence strukturního analogu protinádorového léčiva oracinu bez biologické aktivity. K odhalení nespecifických interakcí tak byla použita třetí strategie, spočívající v inkubaci vzorku s nosičem bez imobilizovaného ligandu. Podobný přístup byl popsán Roop-ngamem *et al.* (2012) při identifikaci nespecifických interakcí afinitního nosiče s imobilizovaným oxalátem. Porovnání elučních frakcí ze separace na afinitním nosiči s imobilizovaným oracinem a separace s mikropartikulemi bez imobilizovaného oracinu (Obr. 32) jasně prokázalo, že elongační faktory Tu1 a Tu2 s velikostí okolo 45 kDa reagovaly s povrchem afinitního nosiče nespecificky. MS analýza proteinového proužku z oblasti 37 kDa, po separaci na mikropartikulích bez imobilizovaného oracinu, prokázala přítomnost pouze vnějšího membránového proteinu ompf z *E. coli* (Tab.

15). Tyto výsledky zcela jednoznačně potvrzují, že vnější membránový protein ompF i elongační faktory reagují s povrchem afinitního nosiče nespecificky, zatímco karbonyl-redukující enzym AKR1C3 byl zachycen díky specifické interakci s oracinem.



Obr. 32: SDS-PAGE gel znázorňující rozdíly v interakcích proteinů s nosičem bez (-) a s (+) imobilizovaným oracinem. OS-vzorek podrobený afinitní separaci; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Tab. 15: MS analýza proteinů obsažených v elučních frakci E1 znázorňující rozdíly v interakcích proteinů s magnetickými partikulami s (+) a bez (-) imobilizovaného oracinu.

Proteinový proužek	Identifikované proteiny	
	+ oracin	- oracin
1 (~ 37 kDa)	AKR1C3 ompF	ompF
2, 3 (~ 43 kDa)	EF-Tu1, EF-Tu2	EF-Tu1, EF-Tu2

4.8. Izolace karbonyl-redukujících enzymů z lidského jaterního cytosolu

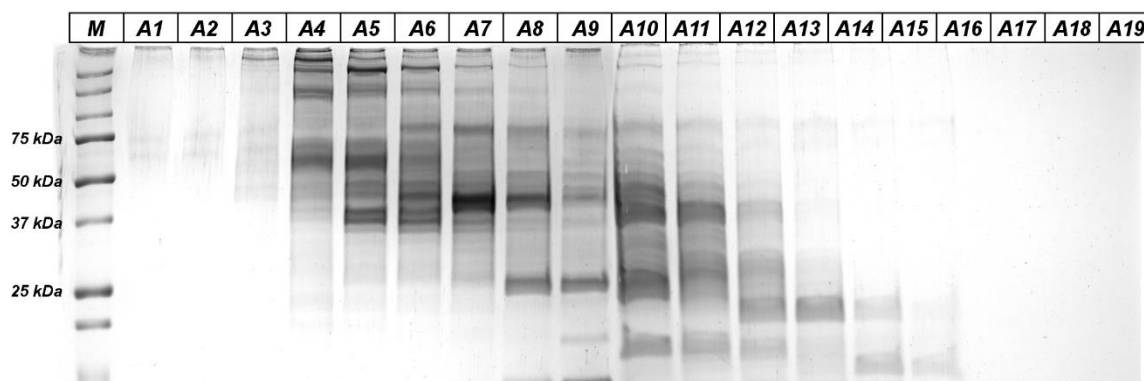
Úspěšná izolace enzymu AKR1C3 z homogenátu geneticky modifikovaného organismu *E. coli* potvrdila možnost zapojení afinitního nosiče AN05 do purifikačních protokolů karbonyl-redukujících enzymů z lidských tkáňových homogenátů. Ve vzorku z *E. coli* bylo cílového enzymu relativně velké množství a bylo tedy třeba ještě prokázat efektivitu afinitního nosiče AN05 na jiném vzorku,

kde by byl cílový enzym v takovém množství, které by odpovídalo skutečné situaci ve tkáních. Pro tento účel byla zvolena lidská jaterní cytosolická frakce, která by měla obsahovat několik karbonyl-redukujících enzymů (např. CBR1, CBR3, AKR1C1-C4 (Martin *et al.*, 2006; Wsól *et al.*, 2007; Novotná *et al.*, 2008; Pilka *et al.*, 2009)), u kterých byla schopnost interagovat s afinitním nosičem AN05 potvrzena již dříve (4.5.)

I když je použití afinitní separace jako jediného purifikačního kroku možné, upřednostňovaným způsobem je zařazení alespoň jednoho předčist'ovacího kroku, jelikož tkáňové homogenáty obsahují mnoho balastních proteinů, které by mohly nespecificky interagovat s afinitním nosičem a komplikovat tak identifikaci skutečných molekulárních cílů oracinu (Ziegler *et al.*, 2013). Podobný přístup použili ve své práci i Breyer-Pfaff & Nill (Breyer-Pfaff and Nill, 2000). Jejich purifikační protokol cytosolických karbonyl-redukujících enzymů využíval gelovou filtraci (GF) jako první purifikační krok, před vlastním využitím komerčně dostupných iontově-výměnných a afinitních technik (Red-Sepharosa). Námi vytvořený purifikační protokol karbonyl-redukujících enzymů z lidského jaterního cytosolu byl proto složen ze dvou purifikačních kroků; gelová filtrace a afinitní chromatografie.

4.8.1. Gelová filtrace

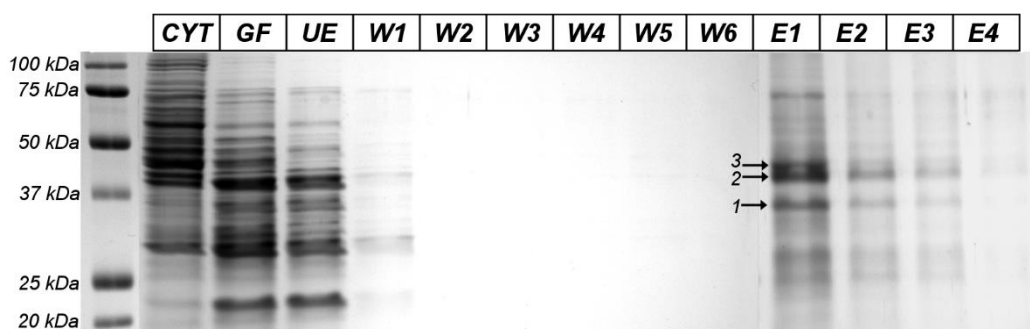
Gelová filtrace je široce používanou technikou, která umožňuje separaci proteinů na základě jejich velikosti. Hlavní předností metody je možnost provádět separaci za podmínek speciálně navržených pro daný protein (nebo skupinu proteinů) tak, aby byla zachována jeho maximální stabilita a aktivita bez rizika ovlivnění kvality separace (Hagel, 2001). Na druhou stranu má tato metoda relativně nízkou rozlišovací schopnost (molekulová hmotnost proteinů se musí lišit alespoň o 10 %) a kapacitu (Ó'Fágáin *et al.*, 2011). Rozdělením lidského jaterního cytosolu proto byla získána série frakcí, které obsahovaly určitou oblast proteinového spektra (Obr. 33). Převážná část proteinů o požadované velikosti ~37 kDa (obvyklá velikost karbonyl-redukujících enzymů) se nacházela ve frakci A10. Tato frakce bylo proto vybrána pro afinitní purifikační krok.



Obr. 33: SDS-PAGE analýza proteinových frakcí získaných po gelové filtraci lidského jaterního cytosolu. Požadované spektrum proteinů o molekulové hmotnosti ~37 kDa se nacházelo ve frakci A10.

4.8.2. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografií frakce A10 po gelové filtraci byla získána sada frakcí, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 34). Podobně jako v předchozím experimentu s geneticky modifikovaným organismem *E. coli* i zde bylo získáno několik výrazných proteinových proužků. Ačkoli je hlavní metabolickou přeměnou oracinu jeho redukce v poloze 11 indenoisochinolinového skeletu (Melka, 1993; Szotáková *et al.*, 1996), bylo pravděpodobné, že tyto proteinové proužky nebudou odpovídat pouze karbonyl-redukujícím enzymům, ale i jiným molekulárním nebo vedlejším cílům oracinu (Margarucci *et al.*, 2010; Lounkine *et al.*, 2012). K určení nespecificky interagujících proteinů by mohli být použity již dříve zmíněné přístupy (Sato *et al.*, 2010; Roop-ngam *et al.*, 2012). Jelikož ale cílem tohoto experimentu bylo potvrzení schopnosti afinitního nosiče zachytit cytosolické karbonyl-redukující enzymy, u nichž byla specifita interakce potvrzena, identifikace veškerých nespecificky interagujících proteinů nebyla provedena.



Obr. 34 SDS-PAGE analýza afinitní chromatografie lidské jaterní cytosolické frakce A11 po gelové filtraci. CYT-lidský jaterní cytosol; GF-vybraný vzorek A10 po gelové permeační chromatografii; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Výše zmíněné tři hlavní proteinové proužky (Obr. 34) byly analyzovány pomocí MS (Tab. 16). Proteinový proužek 1 byl identifikován jako směs karbonyl-redukujících enzymů CBR1, AKR1C2, AKR1C4, AKR1D1 (mimo enzym AKR1D1 byla u těchto enzymů afinita vůči ligandu oracinu prokázána; kapitola 4.5.) a dvou hydrolas (DDAH-1, esterhydrolasa C11orf54). Interakce těchto hydrolas s léčivem oracinem dosud nebyla popsána a mohla by být předmětem dalšího zkoumání. Izolace čtyř karbonyl-redukujících enzymů byla ovšem jasným důkazem funkčnosti námi připraveného afinitního nosiče s imobilizovaným léčivem oracinem.

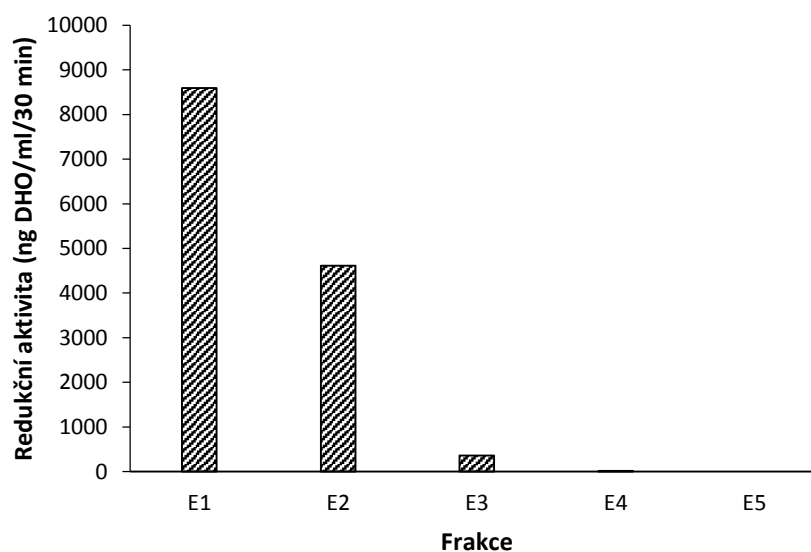
Tab. 16: Proteiny identifikované v proužcích z SDS-PAGE gelu afinitní chromatografie lidské jaterní cytosolické frakce A11 po gelové filtraci.

Proteinový proužek	Identifikované proteiny
1 (~ 37 kDa)	CBR1
	AKR1C2
	AKR1C4
	AKR1D1
	DDAH-1
	Ester hydrolasa C11orf54
2, 3 (~ 40 kDa)	ADH1 (A, B, C)
	ADH4

Isolace uvedených karbonyl-redukujících enzymů z lidské jaterní tkáně byla očekávána, ačkoli znalosti jejich exprese na úrovni proteinů nejsou dosud zcela ucelené a často se opírají pouze o znalosti na úrovni mRNA. Je známo, že hladiny mRNA a s tím i spojená pravděpodobnost exprese enzymu CBR1 jsou několikanásobně větší v porovnání s hladinami mRNA enzymů podrodiny AKR1C. V této podrodině byly největší hladiny mRNA popsány pro enzym AKR1C4, zatímco AKR1C3 je v játrech exprimován velmi málo (Steckelbroeck *et al.*, 2006; Kassner *et al.*, 2008). Enzym AKR1D1 je rovněž vysoce exprimovanou reduktasou v lidské jaterní tkáni (Charbonneau and The, 2001), nicméně metabolická aktivita vůči oracinu u tohoto enzymu dosud nebyla popsána. Je ale pravděpodobné, že i tento enzym by se mohl podílet na biotransformaci protinádorového léčiva oracinu. Proteinové proužky 2 a 3 byly identifikovány jako podjednotky enzymu

alkoholdehydrogenasa 1 (ADH1A, B, C) a alkoholdehydrogenasa 4 (ADH4). Jelikož tyto enzymy katalyzují NAD⁺-dependentní oxidační přeměnu alkoholů na příslušné aldehydy a ketony, mohly tak specificky interagovat s hydroxylovou nebo karbonylovou skupinou oracinu. Jelikož se ale tyto enzymy v jaterní tkáni vyskytují ve velkém množství (Estonius *et al.*, 1996), jejich přítomnost v elučních frakcích bylo rovněž možné vysvětlit mírnou nespecifickou sorpcí.

U elučních frakcí byla rovněž stanovena jejich redukční aktivita vůči oracinu (Obr. 35). Ačkoli bylo zjištěno, že výsledná hodnota aktivity eluční frakce E1 odpovídala „pouze“ necelým pěti procentům z původní aktivity frakce A11, izolované enzymy byly eluovány v aktivní formě. Velmi vysoká aktivita vůči oracinu pak byla naměřena v povazebné frakci UE (92 % z původní aktivity frakce A11). Tyto hodnoty redukčních aktivit nicméně korelují s výsledky SDS-PAGE analýzy, neboť bylo zřejmé, že vazebná kapacita pro karbonyl-redukující enzymy byla do značné míry ovlivněna vysoce exprimovanými alkoholdehydrogenasami.



Obr. 35: Grafické znázornění redukční aktivity vůči oracinu u elučních frakcí po afinitní separaci lidské jaterní cytosolické frakce A11 po gelové filtraci.

Ze získaných výsledků bylo zřejmé, že pomocí afinitního nosiče AN05, složeného z mikroparticulí SiMAG-COOH, spojovacího raménka BAPA a imobilizovaného bylo možné izolovat karbonyl-redukující enzymy z lidského jaterního cytosolu a tyto zachycené enzymy následně uvolnit v aktivní

nedenaturované formě. Úspěšným zakončením tohoto experimentu tak byly splněny úvodní cíle této práce o vytvoření afinitního nosiče, optimalizace separačních protokolů a ověření schopnosti afinitního nosiče izolovat karbonyl-redukující enzymy s komplexních biologických vzorků. Afinitní nosič byl nyní připraven pro zapojení do purifikačního protokolu lidských membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů (Škarydová *et al.*, 2009).

4.9. Izolace membránových karbonyl-redukujících enzymů z lidských jaterních mikrosomů

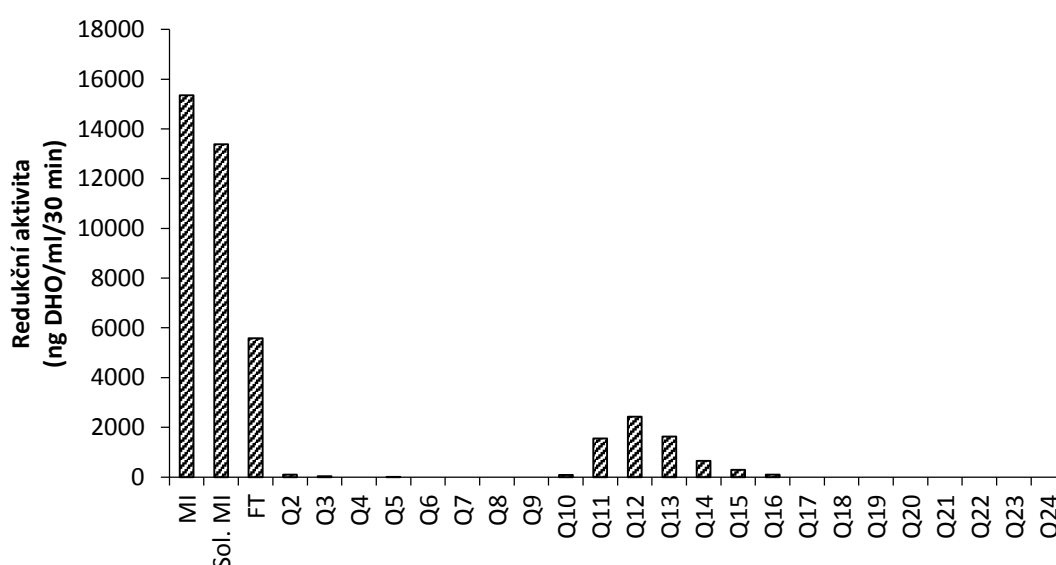
Membránové proteiny se v biologických membránách obvykle vyskytují v malém množství a jen velmi vzácně je hlavní peptidovou složkou membrány jen jedna skupina proteinů. Mnohé proteiny tudíž nemohou být izolovány z přirozených zdrojů v dostatečném množství (Seddon *et al.*, 2004). Purifikace membránových proteinů se v mnohém liší od purifikace cytosolických proteinů. Membránové proteiny jsou značně hydrofobní a z membrán mohou být uvolněny pouze solubilizací detergenty. Vyjmutím z přirozeného prostředí lipidové dvojvrstvy ovšem dochází k narušení jejich stability. Tyto proteiny jsou zároveň velmi adhezivní, následkem čehož dochází k jejich velkým ztrátám v průběhu purifikačního protokolu. Z těchto důvodů představuje jejich purifikace velmi obtížný úkol (Carpenter *et al.*, 2008).

K dnešnímu dni byl v aktivní formě úspěšně izolován pouze jeden lidský membránově vázaný karbonyl-redukující enzym; 11 β -HSD1 (Maser *et al.*, 2002). Purifikační protokol se skládal ze série komerčně dostupných iontově-výměnných (Mono Q-Sepharosa), hydrofobně-interakčních (Octyl-Sepharosa) a afinitních technik (Red-Sepharosa). Na základě této úspěšné izolace karbonyl-redukujícího enzymu z lidských jaterních mikrosomů byl vytvořen purifikační protokol prezentovaný Škarydovou *et al.* (2009), který se skládal z dvou hlavních purifikačních kroků (anion-výměnná chromatografie (Q-Sepharosa) a hydrofobně-interakční chromatografie (Phenyl-Sepharosa)). Autoři byly schopni získat proteinovou frakci se zachovalou metabolickou aktivitou vůči oracinu a s požadovanou preferencí tvorby (+)-DHO enantiomeru. Nevýhodou tohoto postupu byla nízká selektivita druhého purifikačního pomocí Phenyl-Sepharosy,

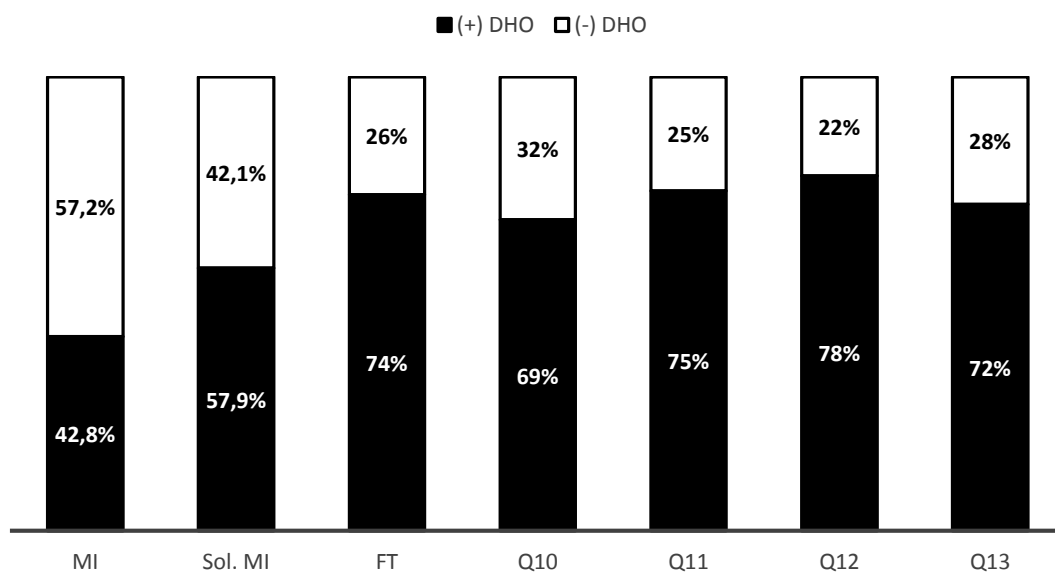
kteřá vedla k nežádoucímu naředění cílových proteinů do několika proteinových frakcí. Z důvodu velkého naředění vzorků následně nebylo možné provést vizuální detekci obsažených proteinů pomocí SDS-PAGE a i provedené pokusy o identifikaci obsažených proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie skončili nezdarem. Z těchto důvodů byl druhý purifikační krok pomocí hydrofobně-interakční chromatografie nahrazen afinitním purifikačním krokem na připraveném afinitním nosiči AN05, který byl primárně vytvořen za tímto účelem.

4.9.1. První purifikační krok na Q-Sepharose

Popsaný purifikační postup byl zopakován do fáze prvního purifikačního kroku na Q-Sepharose. Byla tak získána série frakcí, u kterých byla stanovena schopnost redukce oracinu (Obr. 36) a u vybraných frakcí byla dále hodnocena stereospecifita redukce (Obr. 37). Výsledky se shodovaly s dříve publikovanými hodnotami Škarydovou et al. (Škarydová *et al.*, 2009). Původní ideje o existenci enzymů se stereospecifitou výrazně posunutou ve prospěch (+)-DHO nejlépe vyhovovaly frakce FT a Q12. Zatímco ve studii Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2009) byla k dalšímu purifikačnímu kroku na hydrofobně-interakční chromatografii vybrána pouze frakce Q12, v této práci byly afinitnímu purifikačnímu kroku na námi vytvořeném afinitním nosiči AN05 podrobeny frakce FT i Q12.



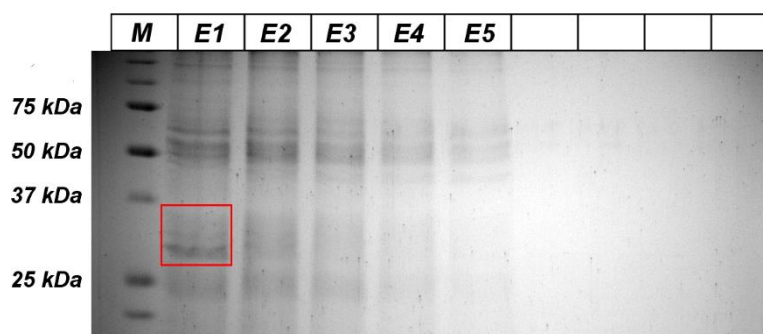
Obr. 36: Rozložení redukční aktivity vůči oracinu ve frakcích získaných po separaci solubilizovaných lidských mikrosomů na Q-Sepharose. MI-lidské jaterní mikrosomy; Sol. MI-solubilizované mikrosomy; FT-proteiny neinteragující s iontově-výměnným nosičem; Q-frakce získané separací na Q-Sepharose.



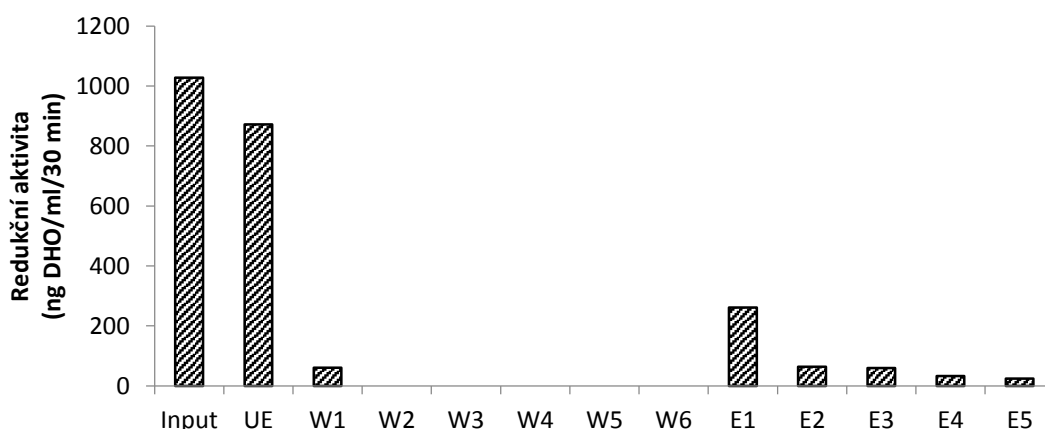
Obr. 37: Stereospecifita redukce oracinu lidskými jaterními mikrosomy (MI), solubilizovanými jaterními mikrosomy (Sol. MI) a vybranými frakcemi po prvním purifikačním kroku na Q-Sepharose.

4.9.2. Afinitní chromatografie frakce FT po Q-Sepharose

Afinitní chromatografie frakce FT (Obr. 38) byla provedena podle separačního protokolu komplexních biologických vzorků (3.5.5.3.), který byl úspěšně aplikován při izolaci karbonyl-redukujících enzymů z homogenátu geneticky modifikovaného organismu *E. coli* (4.7.) a lidské jaterní cytosolické frakce (4.8). MS analýzou proteinových proužků o velikosti kolem 37 kDa (předpokládaná oblast výskytu karbonyl-redukujících enzymů) byl s jistotou identifikován jediný enzym; 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 6 (17 β -HSD6). U enzymu byla dosud popsána schopnost *in vivo* oxidace 3 α -androstendiolu na dihydrotestosteron. V *in vitro* pokusech byla nicméně potvrzena i reduktasová aktivita vůči endogenním steroidům (Chetyrkin *et al.*, 2001). Dosud ovšem nebyly dostupné žádné informace o roli tohoto enzymu v biotransformaci xenobiotik.



Obr. 38: SDS-PAGE analýza elučních frakcí z afinitní separace frakce FT získané frakce po separaci solubilizovaných mikrosomů na Q-Sepharose.

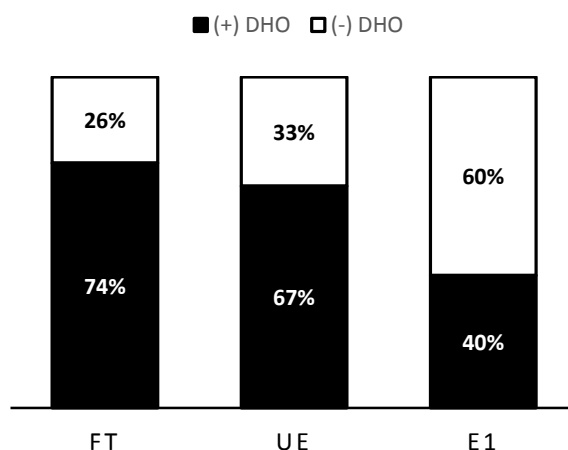


Obr. 39: Rozložení redukční aktivity vůči oracinu u frakcí po afinitním purifikačním kroku frakce FT na nosiči AN05. UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

Ve frakcích po afinitní chromatografii byla rovněž stanovena redukční aktivita vůči oracinu (Obr. 39). Podobně jako v případě afinitní chromatografie cytosolické proteinové frakce (4.8.2.) i zde byla naměřena dominantní část redukční aktivity v povazebné frakci UE, což naznačuje, že převážné množství karbonyl-redukujících enzymů nebylo zachyceno afinitním nosičem. I v tomto případě mohl být tento jev způsoben nespecifickou sorpcí hojně se vyskytujících proteinů, následkem čehož došlo k blokaci vazebných míst afinitního nosiče pro specificky interagujících proteinů (Ong *et al.*, 2009). Další možností mohl být potenciálně negativní vliv neionického detergentu Tritonu X-100 na průběh afinitní chromatografie. Bylo dokázáno, že neionické detergenty mohou v nadkritické micelární koncentraci bránit interakci mezi ligandem a cílovým proteinem u tzv. dye-ligand afinitních chromatografiích (Robinson *et al.*, 1980). Ligand byl v tomto případě uzavřen v micelách neionického detergentu. K jeho zpřístupnění autoři použili přídavek

anionického detergentu (SDS, deoxycholát sodný), čímž vytvořili směsné micely, které již nebránily interakci mezi ligandem a cílovým proteinem. Přídavek deoxycholátu sodného do testované frakce nicméně působil ztrátu redukční aktivity vůči oracinu což naznačovalo, že vytvořené směsné micely velmi negativně ovlivňovaly stabilitu solubilizovaných karbonyl-redukujících enzymů. Stejný jev byl popsán i při purifikaci enzymu 11 β -HSD1 (Maser *et al.*, 2002). Deoxycholát sodný byl v tomto případě použit před separací pomocí hydrofobně-interakční chromatografie. Ačkoli byla i v tomto případě snížena aktivita purifikovaného vzorku, bez přídavku deoxycholátu sodného nebylo možné úspěšně separovat solubilizované jaterní mikrosomy, jelikož neionické detergenty (v tomto případě Emulgen 913) negativně ovlivňují i hydrofobně-interakční chromatografii (Cummins and O'Connor, 2011). Průběh afinitního purifikačního kroku na nosiči AN05 ovšem přídavkem deoxycholátu ovlivněn nebyl. Z těchto důvodů nedošlo k implementaci anionických detergentů do protokolu afinitní chromatografie.

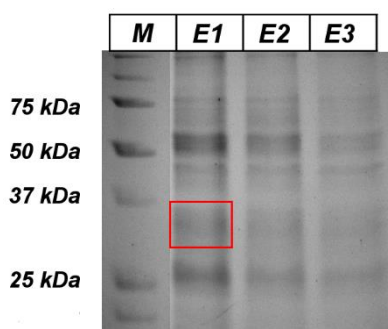
U eluční frakce E1 získané po afinitní chromatografii frakce FT byla dále stanovena stereospecifita tvorby (+)/(-)-DHO enantiomerů (Obr. 40). Ačkoli byla stereospecifita tvorby DHO enantiomerů původní frakce FT výrazně posunuta ve prospěch (+)-DHO (74 % (+)-DHO/26 % (-)-DHO), eluční frakce E1 se vyznačovala převážnou tvorbou (-)-DHO (40 % (+)-DHO/60 % (-)-DHO). Získaný poměr DHO enantiomerů byl nicméně odlišný od toho, který by byl vytvořen působením enzymu 11 β -HSD1 (24 % (+)-DHO/76 % (-)-DHO). Zmíněný enzym navíc nebyl v eluční frakci identifikován. Získané výsledky tedy naznačovaly, že by enzym 17 β -HSD6 mohl být dalším membránově vázaným karbonyl-redukujícím enzymem, který je schopen biotransformace modelového substrátu oracinu. Bylo ale ještě nutné potvrdit specifitu interakce mezi tímto enzymem a ligandem oracinem.



Obr. 40: Stereospecifita redukce oracinu proteinovou frakcí FT, povazebnou frakcí UE a eluční frakcí E1 po afinitním purifikačním kroku na nosiči AN05.

4.9.2.1. Stanovení nespécifických interakcí s povrchem afinitního nosiče

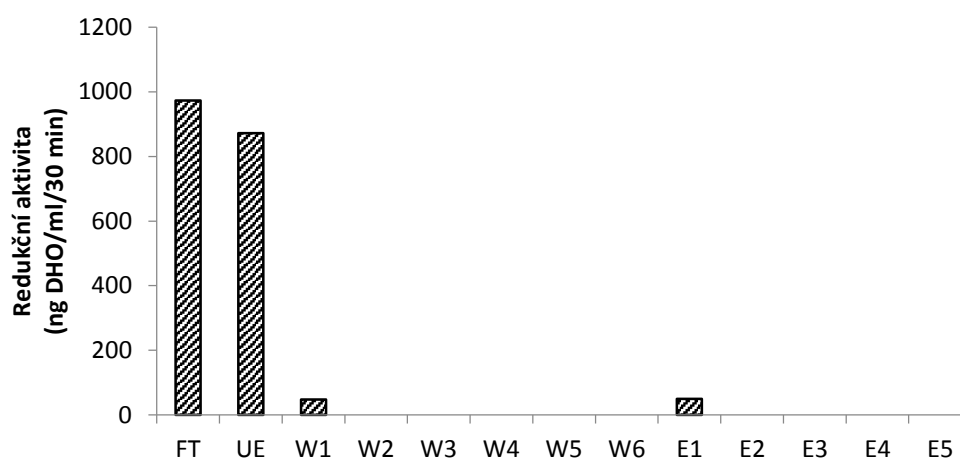
Stejně jako v případě stanovení nespécificky interagujících proteinů supernatantu z geneticky modifikovaného organismu *E. coli* (4.7.2.) byla i FT frakce inkubována s kontrolními partikulemi bez imobilizovaného oracinu (Obr. 41). Na rozdíl afinitní separace na nosiči AN05, v tomto případě nebyla potvrzena přítomnost žádného karbonyl-redukujícího enzymu. V eluční frakci E1 byly identifikovány pouze strukturální proteiny a keratiny, které byly identifikovány i v případě afinitní separace.



Obr. 41: SDS-PAGE analýza elučních frakcí po inkubaci frakce FT po prvním purifikačním kroku na Q-Sepharose s kontrolními partikulemi bez imobilizovaného oracinu.

V získaných frakcích byla rovněž stanovena redukční aktivita vůči oracinu (Obr. 42). Z grafu je patrné, že došlo pouze k minimálnímu zachytu redukčních enzymů (aktivita eluční frakce E1 byla 10x menší oproti eluční frakci získané po afinitní chromatografii (Obr. 39), což odpovídá výsledkům MS analýzy, kdy nebylo možné úspěšně identifikovat žádný metabolický aktivní enzym. Naměřená hodnota

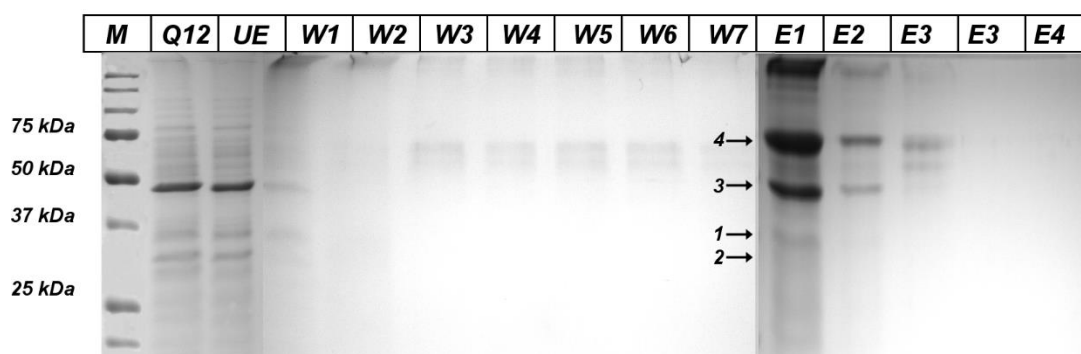
redukční aktivity tak zřejmě nebyla způsobena jediným enzymem, ale s největší pravděpodobností se jednalo o nespecifický záchyt vícero zástupců karbonyl-redukujících enzymů, jejichž množství bylo pod detekčním limitem použité MS analýzy. Výsledky tedy potvrdily specifitu interakce mezi enzymem 17 β -HSD6 a ligandem oracinem. Jednoznačné popsání jeho role v biotransformaci oracinu by ale vyžadovalo další experimenty s čistým nativním enzymem nebo jeho rekombinantní formou.



Obr. 42: Rozložení redukční aktivity vůči oracinu ve frakcích po inkubaci frakce FT s kontrolními partikulami bez imobilizovaného oracinu. UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

4.9.3. Afinitní chromatografie frakce Q12

Proteinová frakce Q12 byla v popředí zájmu předchozí práce Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2009). Následnou separací této frakce pomocí hydrofobně-interakční chromatografie ale nebylo možné získat vzorek, ve kterém by se podařilo identifikovat karbonyl-redukující enzymy s aktivitou vůči oracinu. Druhý purifikační krok pomocí hydrofobně-interakční chromatografie byl proto nahrazen afinitním purifikačním krokem (Obr. 43).



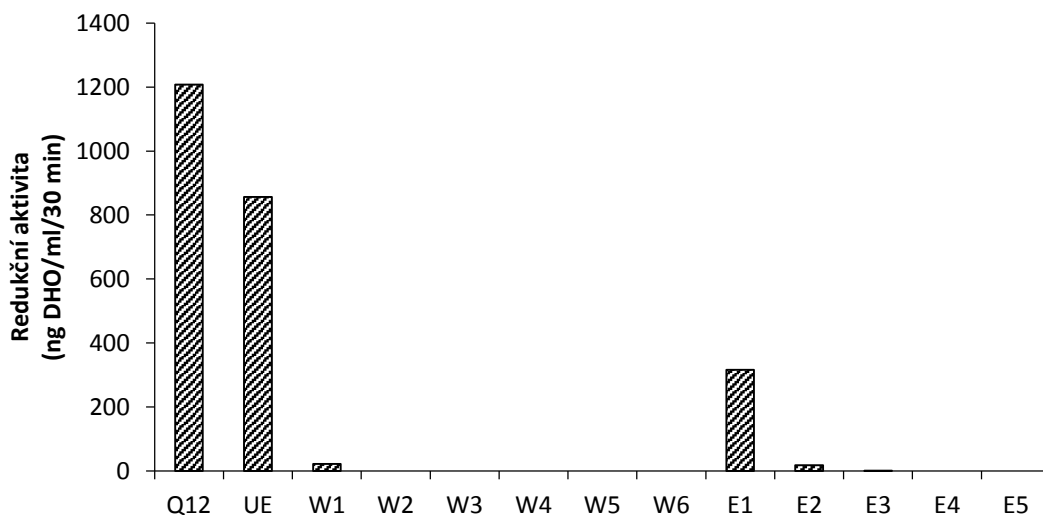
Obr. 43: SDS-PAGE analýza afinitní chromatografie vybrané frakce Q12. MI-lidské jaterní mikrosomy; Sol. MI-solubilizované jaterní mikrosomy; UE-proteiny nezachycené afinitním nosičem; W-promývací frakce; E-eluční frakce.

V eluční frakci E1 byly analyzovány čtyři proteinové proužky. Proužek (4) z oblasti ~ 70 kDa představoval BSA, které se na povrch afinitního nosiče adsorbovalo v průběhu blokačního kroku (3.5.5.3.). Proteinový proužek (3) byl identifikován jako epoxidhydrolasa 1 (EPHX1). Je známo, že epoxidhydrolasy hrají klíčovou roli v biotransformaci epoxidů, vzniklých během metabolismu hydrofobních aromatických sloučenin, na příslušné dihydrodioly, které mohou být následně konjugovány a vyloučeny z organismu (Arand *et al.*, 2005). Oracin proto s největší pravděpodobností nemohl být specifickým substrátem EPHX1. Interakce mezi tímto enzymem a oracinem byla pravděpodobněji způsobena vysokou lipofilitou oracinu, jelikož EPHX1 přednostně interaguje s lipofilními substráty a rovněž velmi vysokou expresí tohoto enzymu v játrech (Argiriadi *et al.*, 2000). Proteinový proužek (2) byl identifikován jako směs SDR enzymů RDH16 a 11β -HSD1. Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, enzym 11β -HSD1 je dosud jediným dobře charakterizovaným mikrosomálním karbonyl-redukujícím enzymem, u kterého byla popsána metabolická aktivita vůči xenobiotikům, včetně oracinu (Wsól *et al.*, 2004). Její izolace z lidských jaterních mikrosomů tak byla přímým důkazem funkčnosti afinitního nosiče. V proteinovém proužku (1) byl dominantním proteinem SDR enzym DHRS1 (Tab. 17). Účast enzymů DHRS1 a RDH16 v metabolismu xenobiotik dosud nebyla popsána. Úspěšná izolace a následná identifikace těchto enzymů, jako možných molekulárních cílů modelového substrátu oracinu, tak mohla být první popsanou informací o jejich možné roli v biotransformaci léčiv.

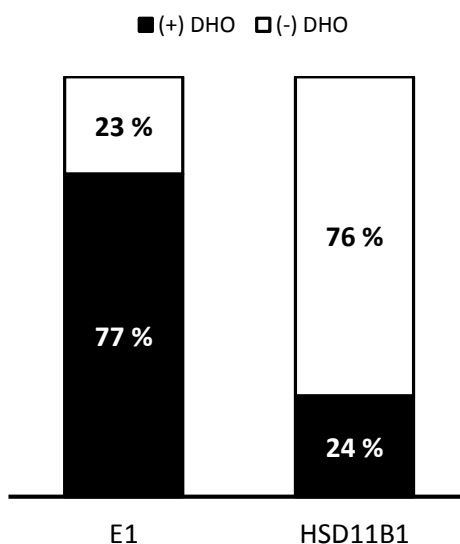
Tab. 17: Proteiny identifikované pomocí MS v příslušných proteinových proužcích eluční frakce E1 po afinitní chromatografii vybrané frakce Q12 po prvním purifikačním kroku na Q-Sepharose.

Proteinový proužek	Identifikované proteiny
1	DHRS1
2	RDH16 11 β -HSD1
3	EPHX1
4	BSA

U všech získaných frakcí po afinitním purifikačním kroku byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu (Obr. 44). Získaná eluční frakce E1, která obsahovala výše zmíněné enzymy, byla metabolicky aktivní. Tato aktivita ovšem mohla být způsobena pouze úspěšnou izolací enzymu 11 β -HSD1, který je vůči oracinu aktivní (Wsól *et al.*, 1999a). U eluční frakce byla proto stanovena stereospecifita tvorby DHO enantiomerů (Obr. 45). Pokud by byl enzym 11 β -HSD1 jediným metabolicky aktivním proteinem, odpovídal by tomu i poměr vzniklých DHO enantiomerů (24 % (+)-DHO/76 % (-)-DHO) (Wsól *et al.*, 2004). Inkubací eluční frakce E1 s oracinem byl nicméně získán zcela opačný poměr DHO enantiomerů (77 % (+)-DHO/23 % (-)-DHO). Naměřené hodnoty tak jednoznačně potvrdili přítomnost alespoň jednoho jiného karbonyl-redukujícího enzymu, jenž preferenčně katalyzuje přeměnu oracinu na (+)-DHO enantiomer.



Obr. 44: Rozložení redukční aktivity vůči oracinu u frakcí získaných po afinitní chromatografii frakce Q12.



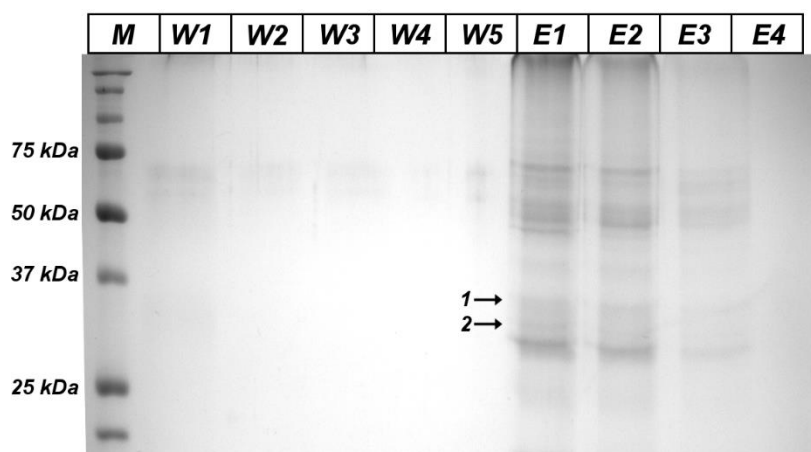
Obr. 45: Grafické znázornění stereospecifity redukce oracinu eluční frakcí E1 po afinitním purifikačním kroku a enzymem 11 β -HSD1.

Tyto výsledky byly v souladu s předchozí prací Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2009), ačkoli jejich částečně purifikovaná frakce vykazovala o něco vyšší stereospecifitu pro (+)-DHO enantiomer (86 % (+)-DHO). Na rozdíl od zmíněné práce Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2009), se ale v této studii nepodařilo dosáhnout tak výrazného zvýšení specifické aktivity finální proteinové frakce, vyjádřené jako látkové množství oracinu vzniklé působením 1 mg proteinu za 30 minut. Využitím původního purifikačního protokolu byly autoři schopni získat

velmi aktivní frakci, leč s velmi nízkou koncentrací proteinu. Zařazením afinitního purifikačního kroku byla získána obdobě aktivní finální frakce, která nicméně obsahovala 52x větší množství proteinu, což vedlo k teoretickému snížení specifické aktivity. Zvýšený obsah proteinu v eluční frakci E1 byl zapříčiněn především nespecifickou sorpcí blokačního činidla BSA a epoxidhydrolasy 1 na povrch afinitního nosiče AN05. V předchozí části práce bylo navíc prokázáno, že redukční aktivita vůči oracinu byla u enzymů eluovaných z afinitního nosiče snížena na poloviční hodnotu (4.4.2.). Díky těmto dvěma faktům (snížení metabolické aktivity eluovaných enzymů a uměle zvýšené množství proteinu v elučních frakcích) byly výsledné hodnoty specifické aktivity výrazně zkresleny a jejich přímé porovnání s hodnotami získanými Škarydovou et al. (Škarydová *et al.*, 2009) bylo irelevantní. Využitím afinitního purifikačního protokolu bylo nicméně možné identifikovat známý karbonyl-redukující enzym 11 β -HSD1 a dále další potenciální biotransformační enzymy RDH16 a DHRS1.

4.9.3.1. Stanovení nespecificky interagujících proteinů

Ke stanovení nespecificky interagujících proteinů se stacionární fází afinitního nosiče byly využity kontrolní mikropartikule bez imobilizovaného oracinu (Obr. 46). Podobně jako tomu bylo v případě analýzy frakce FT i zde byla odhalena poměrně značná míra nespecifických interakcí s povrchem magnetických mikropartikulí. Tento výsledek byl celkem očekávaný, jelikož vysoká míra adsorpce je běžně pozorovaným jevem při purifikaci membránových proteinů (Seddon *et al.*, 2004). Další možnost, jak mohlo potenciálně dojít k navýšení nespecifické sorpce, spočívala v přítomnosti BSA, které bylo použito jako blokační činidlo. Bylo popsáno, že se neionické detergenty mohou hydrofobními interakcemi vázat na hydrofobní části jinak hydrofilních proteinů, jako je BSA. Následným kontaktem s hydrofobní molekulou, jakou jsou i membránové proteiny, může dojít ke vzniku agregátů BSA-membránový protein (Nishikido *et al.*, 1982).



Obr. 46: SDS-PAGE analýza frakcí získaných inkubací kontrolních mikroparticulí bez imobilizovaného oracinu s proteinovou frakcí Q12.

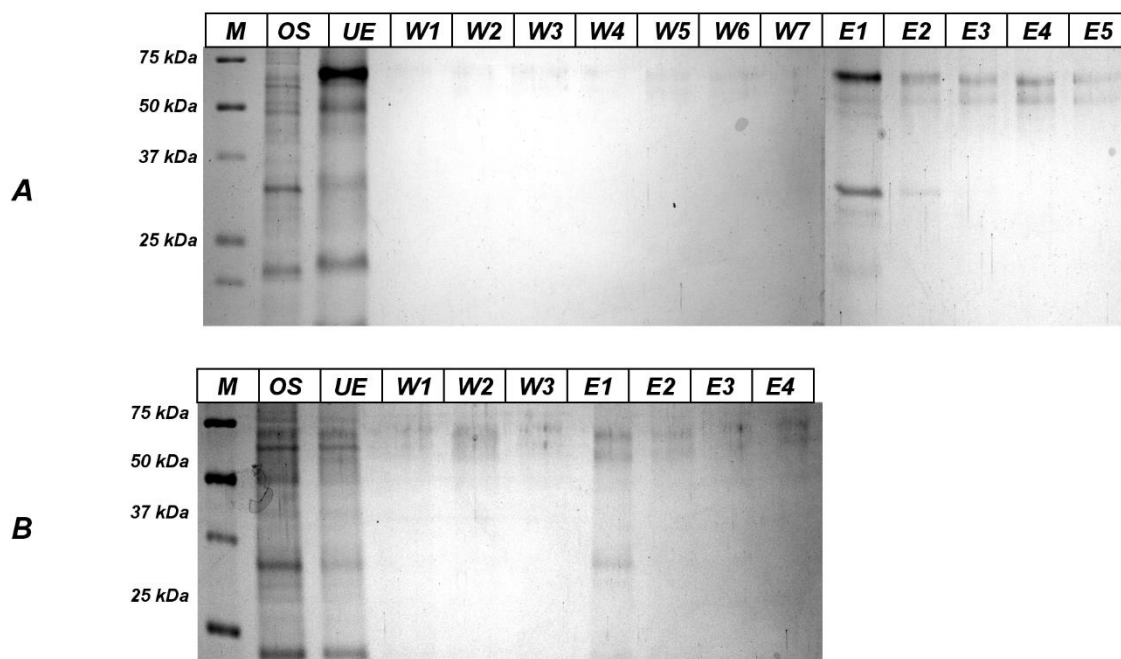
Vybrané proteinové proužky z oblasti ~37 kDa byly analyzovány pomocí MS. Analýza bohužel ukázala, že všechny identifikované enzymy z předešlého pokusu (DHRS1, RHD16 a 11 β -HSD1) vykazovaly i jistou míru nespecifické sorpce na magnetický nosič bez imobilizovaného oracinu a byly identifikovány i během tohoto experimentu (Tab. 18). Podobný výsledek popsal i Margarucci *et al.* (Margarucci *et al.*, 2010), během stanovení nespecificky interagujících proteinů s afinitním nosičem s imobilizovaným petrosaspongiolidem M. Z bezmála 400 identifikovaných proteinů bylo celkem 325 proteinů potvrzeno jak po afinitním kroku, tak i po inkubaci s kontrolními partikulami bez imobilizovaného ligandu. Ačkoli většina z oněch 325 identifikovaných proteinů odpovídala nespecifickým interakcím, některé proteiny byly zachyceny ve větším množství za pomoci afinitního nosiče. Toto jev byl popsán zejména u adhezivních proteinů (např. membránové proteiny), které se v biologických materiálech vyskytují v malých koncentracích a mají nízkou afinitu vůči imobilizovanému ligandu (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008). Identifikace proteinů DHRS1, RDH16 a 11 β -HSD1 tak nemusela být definitivním potvrzením nespecifity interakce s ligandem oracinem. Analýza redukční aktivity elučních frakcí po separaci na kontrolních mikroparticulích bez imobilizovaného oracinu navíc odhalila, že tyto frakce nevykazovaly žádnou redukční aktivitu. To naznačovalo, že tyto frakce obsahovaly pouze minimální množství karbonyl-redukujících enzymů. V dalších experimentech proto byly charakterizovány vlastnosti rekombinantně připravených forem enzymů RDH16 a DHRS1 vůči oracinu.

Tab. 18: MS analýza proteinů obsažených v elučních frakcích E1 znázorňující rozdíly v interakcích proteinů s magnetickými partikulami s (+) a bez (-) imobilizovaného oracinu.

Proteinový proužek	Identifikované proteiny	
	+ oracin	- oracin
1	DHRS1	DHRS1
2	RDH16	RDH16
	11 β -HSD1	11 β -HSD1

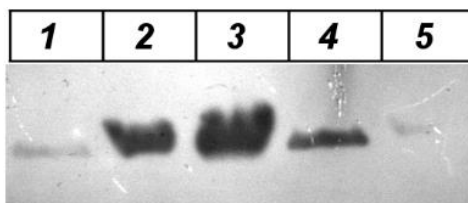
4.9.3.2. Charakterizace rekombinantního enzymu RDH16

RDH16 (SDR9C8) byl dosud popsán jako NAD⁺ dependentní enzym, jehož pravděpodobnou rolí v organismu je přeměna retinolu a 13-cis-retinolu na příslušné aldehydy. Rovněž se může podílet na metabolické přeměně 3 α -androstendiolu a androsteronu na dihydrotestosteron a androstendion (Karlsson *et al.*, 2003). S největší pravděpodobností se ovšem nejednalo o námi hledaný karbonyl-redukující enzym, jelikož RDH16 katalyzuje především oxidační reakce (Kedishvili *et al.*, 2001). Pokusy provedené Škarydovou *et al.* (2009) navíc dále potvrdili, že jejich částečně purifikovaný enzym byl NADPH-dependentní. Schopnost afinitního nosiče AN05 zachytit enzym RDH16 byla přesto ověřena na vzorku solubilizované mikrosomální frakce z *Sf9* hmyzí buněčné linie obohacené o cílový enzym (3.5.4.1.). Na stejném vzorku byly rovněž určeny možné nespecifické interakce s kontrolními partikulami bez imobilizovaného ligandu oracinu (Obr. 47).



Obr. 47: SDS-PAGE analýza afinitní separace solubilizované mikrosomální frakce z Sf9 hmyzí buněčné linie obohacené o cílový enzym RDH16 na nosiči AN05 (A); určení nespecifických interakcí enzymu RDH16 s kontrolními mikroparticulami bez imobilizovaného orcinu (B).

Na základě SDS-gelů bylo možné předpokládat, že interakce mezi enzymem RDH16 a ligandem orcinem byla specifická, jelikož k výraznému zachytu enzymu došlo pouze v případě použití afinitního nosiče AN05. Tento výsledek byl potvrzen následnou western blot analýzou (Obr. 48). Zatímco při použití afinitního nosiče AN05 byla dominantní přítomnost enzymu prokázána v eluční frakci, v případě kontrolních mikroparticul byl enzym detekován zejména v povazebné frakci UE. Specifita interakce mezi enzymem RDH16 a orcinem tak byla jasně prokázána.



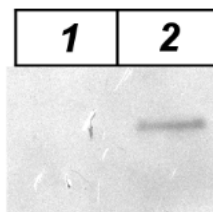
Obr. 48: Western blot analýza separací solubilizované mikrosomální frakce z Sf9 hmyzí buněčné linie obohacené o cílový enzym RDH16 na afinitním nosiči AN05 a kontrolních mikroparticulách. 1-povazebná frakce UE z afinitní separace na nosiči AN05 představující nezachycený enzym RDH16; 2-eluční frakce E1 z afinitní separace na nosiči AN05 představující specificky zachycený enzym RDH16; 3-vzorek podrobený separacím představující výchozí množství enzymu; 4- povazebná frakce UE ze separace na kontrolních mikroparticulách představující neinteragující enzym RDH16; 5- eluční frakce E1 ze separace na kontrolních mikroparticulách představující nespecificky interagující protein RDH16 s povrchem mikroparticul.

Možná metabolická aktivita rekombinantní formy proteinu RDH16 vůči oracinu byla ověřena na úrovni solubilizované mikrosomální frakce. Za takovýchto podmínek byla naměřena pouze minoritní redukce oracinu na 11-dihydrooracin. Neschopnost výrazně katalyzovat redukční směr biotransformace oracinu nicméně neznamenal, že by s ním enzym RDH16 nemohl specificky interagovat. Již od prvních experimentů, provedených Škarydovou et al. (Škarydová *et al.*, 2009), totiž bylo velmi pravděpodobné, že se při biotransformaci oracinu bude uplatňovat polyfarmakologie. Výsledná hodnota redukční aktivity, naměřená v mikrosomálních frakcích, tak byla pravděpodobně způsobena řadou enzymů s relativně nízkou afinitou vůči oracinu než jedním proteinem s vysokou afinitou (Sato *et al.*, 2010).

4.9.3.3. Charakterizace rekombinantní formy enzymu DHRS1

Poslední izolovanou a identifikovanou dehydrogenasou/reduktasou s potenciální metabolickou aktivitou vůči oracinu byla DHRS1. Jedná se o dosud kompletně neprozkoumaný enzym z nadrodiny SDR, který byl na genomové úrovni poprvé identifikován počátkem 21. století v lidském fetálním mozku (Wu *et al.*, 2002). Na našem pracovišti byla jeho exprese na úrovni mRNA dále pozorována v játrech, srdci, kosterním svalstvu, ledvinách, pokožce a slinivce. Na proteinové úrovni byla exprese tohoto proteinu pozorována jen v jaterní tkáni (dosud nepublikovaná data). Předpokládá se, že se jedná o NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasu s pravděpodobnou peroxisomální (Pilka *et al.*, 2015) nebo mikrosomální (LIFEdb, 2015) subcelulární lokalizací. Dosud ovšem u tohoto enzymu nebyla popsána žádná metabolická aktivita.

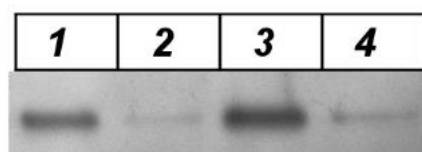
Podobně jako v případě enzymu RDH16 byla i na rekombinantně připravené formě proteinu DHRS1 testována schopnost interagovat s afinitním nosičem AN05 a kontrolními mikropartikulemi bez imobilizovaného ligandu. Imunodetekční analýza afinitní chromatografie solubilizované mikrosomální frakce z *Sf9* hmyzí buněčné linie obohacené o cílový enzym potvrdila specifitu interakce, jelikož k záchytu proteinu DHRS1 došlo pouze v případě použití afinitního nosiče AN05. V případě inkubace solubilizované mikrosomální frakce s kontrolními mikropartikulemi nedošlo k identifikovatelnému záchytu enzymu DHRS1, jelikož v elučních frakcích tento enzym nebyl detekován (Obr. 49).



Obr. 49: Western blot analýza elučních frakcí E1 ze separací solubilizované mikrosomální frakce z Sf9 hmyzí buněčné linie obohacené o cílový enzym DHRS1 na afinitním nosiči AN05 a kontrolních mikropartikulích. 1-eluční frakce E1 ze separace na kontrolních mikropartikulích představující nespecifický záchyt enzymu DHRS1 na povrch kontrolních mikropartikulí bez imobilizovaného oracinu; 2- eluční frakce E1 z afinitní separace na nosiči AN05 představující specificky zachycený enzym DHRS1.

Jelikož enzym RDH16 nebyl schopen redukční přeměny oracinu na dihydrooracin, bylo zřejmé, že za aktivitu eluční frakce E1 po afinitní chromatografii lidské mikrosomální frakce Q12 byly zodpovědné jiné enzymy. Rekombinantně připravená forma enzymu DHRS1 byla proto rovněž inkubována s oracinem. Analýzou vzniklých metabolitů bylo nicméně zjištěno, že ani tento enzym nebyl schopen signifikantní přeměny oracinu na 11-dihydrooracin. Tato inaktivita mohla být ale způsobena různými faktory jako je např. nesprávné složení rekombinantně připraveného proteinu. Byly popsány desítky případů, kdy takto připravený protein postrádal svou metabolickou aktivitu (Blackwell and Horgan, 1991; Baneyx, 1999; Rosano and Ceccarelli, 2014). Vzhledem k absenci jakýchkoli informací o možném substrátu daného enzymu nebylo ani možné ověřit, zda byl enzym připraven v odpovídající aktivní formě.

Ačkoli rekombinantní forma enzymu DHRS1 jasně prokázala specifitu interakce s afinitním nosičem, absence redukční aktivity a identifikace tohoto enzymu během stanovení nespecificky interagujících proteinů frakce Q12 vyvolaly pochybnosti o správnosti jeho izolace pomocí afinitního nosiče AN05. Vzhledem k nemožnosti provedení kvantitativní analýzy obsažených proteinů v jednotlivých experimentech pomocí MALDI-TOF/TOF nebylo touto metodou možné stanovit míru nespecifické sorpce tohoto proteinu na afinitní nosič. Kvantifikace proto byla provedena pomocí western blot analýzy (Obr. 50). Ačkoli přirozeně se vyskytující forma enzymu DHRS1 z lidských jater vykazovala oproti rekombinantně připravenému enzymu větší míru nespecifické sorpce, větší množství enzymu bylo zachyceno pomocí afinitního nosiče AN05. Vysoká míra nespecifické sorpce mohla být v tomto případě způsobena mnoha faktory, které byly diskutovány výše (4.9.3.1.).



Obr. 50: Western blot analýza elučních frakcí E1 a E2 ze separací vybrané proteinové frakce Q12 po prvním purifikačním kroku na Q-Sepharose na afinitním nosiči AN05 a kontrolních mikropartikulích. 1-eluční frakce E1 ze separace na kontrolních mikropartikulích představující nespecifický záchyt enzymu DHRS1 na povrch kontrolních mikropartikulí bez imobilizovaného oracinu; 2- eluční frakce E2 ze separace na kontrolních mikropartikulích představující nespecifický záchyt enzymu DHRS1 na povrch kontrolních mikropartikulí bez imobilizovaného oracinu; 3- eluční frakce E1 z afinitní separace na nosiči AN05 představující specificky zachycený enzym DHRS1; 4- eluční frakce E2 z afinitní separace na nosiči AN05 představující specificky zachycený enzym DHRS1.

I tímto pokusem tedy byla potvrzena specifita interakce mezi enzymem DHRS1 a ligandem oracinem. Bohužel se ovšem nepodařilo prokázat, zda se jednalo o biotransformační enzym předpovězený Škarydovou et al. (Škarydová *et al.*, 2009) nebo pouze o protein s nízkou afinitou i metabolickou aktivitou vůči oracinu. Bylo ovšem velmi pravděpodobné, že ani v případě Škarydové et al. (Škarydová *et al.*, 2009) neobsahovala částečně purifikovaná frakce pouze jediný enzym s vysokou redukční aktivitou vůči oracinu, ale že se na výsledné redukční aktivitě podílela řada enzymů. I tak se ovšem jednalo o první popsany případ možné metabolické aktivity enzymu DHRS1. Izolace tohoto enzymu pomocí afinitního nosiče s imobilizovaným oracinem tak naznačovala jeho potenciálně možnou roli v biotransformaci xenobiotik.

5. ZÁVĚR

Izolace a identifikace proteinů z tkáňových homogenátů představuje obtížný úkol, který vyžaduje vynaložení velkého úsilí a času. Nejvíce je to patrné zejména v oblasti membránových proteinů, vzhledem k jejich specifickým vlastnostem. Není proto překvapivé, že ve skupině membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů byl dosud úspěšně purifikován a dobře charakterizován pouze jediný lidský zástupce; 11 β -HSD1. Cílem této práce bylo vytvoření univerzálního afinitního nosiče, který by umožňoval izolaci rozličných karbonyl-redukujících enzymů z komplexních biologických vzorků. Takový afinitní nosič, s imobilizovaným léčivem oracinem, byl připraven a úspěšně testován se širokým spektrem cytosolických karbonyl-redukujících enzymů. Po prokázání jeho funkčnosti byl tento nosič následně zařazen do purifikačního protokolu lidských membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů s afinitou vůči oracinu. Byly tak získány proteinové frakce se zachovalou karbonyl-redukující aktivitou a požadovanou stereospecifitou redukce oracinu. Následnou MS/MS analýzou byly v těchto frakcích identifikovány proteiny DHRS1, RDH16, 11 β -HSD1 a 17 β -HSD6. Proteiny DHRS1, RDH16 a 17 β -HSD6 byly vůbec poprvé identifikovány jako možné molekulární cíle modelového léčiva oracinu. Charakterizace rekombinantně připravených enzymů DHRS1 a RDH16 nicméně zatím nepotvrdila jejich možnou roli jako významných biotransformační proteinu při redukci oracinu. Purifikační protokol membránových proteinů ovšem nabízí další možnosti modifikací, díky nimž by mohli být izolovány a charakterizovány další karbonyl-redukující enzymy, které se podílejí na redukci oracinu.

6. SEZNAM ZKRATEK

11 β -HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy
17 β -HSD	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy
ABP	aktivitní sonda
ABPP	profilování proteinů na základě aktivity
ADH	alkoholdehydrogenasy
Ahx	kyselina 6-aminohexanová
AKR	aldo-ketoreduktasy
ALDH	aldehyddehydrogenasy
APS	persíran amonný
BAPA	bis-3-aminopopylamin
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G-250
CBR	karbonylreduktasy
CCCP	chemická proteomika založená na afinitní chromatografii
CMC	kritická micelární koncentrace
CYP450	cytochrom P450
DD	dihydrodioldehydrogenasy
DHO	dihydrooracin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GF	gelová filtrace
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEX	iontově výměnná chromatografie
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NNK	4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon

QR	chinonreduktasy
RDH	retinoldehydrogenasy
RNA	ribonukleová kyselina
RNH	dihydronikotionamidribosa
RPC	chromatografie na reverzní fázi
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
S-NHS	N-hydroxysulfosukcinimid
TEA	triethylamin
TEOA	triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethyldiamin

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AKR SUPERFAMILY (2015). AKR Superfamily.
- ARAND, M., CRONIN, A., ADAMSKA, M. AND OESCH, F. (2005). Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism, and Assay. In *Phase II Conjugation Enzymes and Transport Systems* (ed. Helmut Sies, and L. P. B. T.-M. in E.), pp. 569–588. Academic Press ISBN 0076-6879.
- ARGIRIADI, M. A., MORISSEAU, C., GOODROW, M. H., DOWDY, D. L., HAMMOCK, B. D. AND CHRISTIANSON, D. W. (2000). Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 15265–15270. ISSN 00219258 ISBN 2155732201.
- ARKIN, M. R., GLICKSMAN, M. A., FU, H., HAVEL, J. J. AND DU, Y. (2012). Inhibition of Protein-Protein Interactions : Non-Cellular Assay Formats. *Assay Guidance Manual*.
- BACH, S., KNOCKAERT, M., REINHARDT, J., LOZACH, O., SCHMITT, S., BARATTE, B., KOKEN, M., COBURN, S. P., TANG, L., JIANG, T., LIANG, D.-C., GALONS, H., DIERICK, J.-F., PINNA, L. A., MEGGIO, F., TOTZKE, F., SCHÄCHTELE, C., LERMAN, A. S., CARNERO, A., WAN, Y., GRAY, N. AND MEIJER, L. (2005). Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 31208–31219. ISSN 0021-9258.
- BALENDIRAN, G. K., MARTIN, H. J., EL-HAWARI, Y. AND MASER, E. (2009). Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. *Chemico-Biological Interactions* **178**, 134–137. ISSN 00092797 ISBN 1872-7786 (Electronic)r0009-2797 (Linking).
- BANEYX, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 411–421. ISSN 09581669 ISBN 0958-1669 (Print)n0958-1669.
- BANTSCHIEFF, M., EBERHARD, D., ABRAHAM, Y., BASTUCK, S., BOESCHE, M., HOBSON, S., MATHIESON, T., PERRIN, J., RAIDA, M., RAU, C., READER, V., SWEETMAN, G., BAUER, A., BOUWMEESTER, T., HOPF, C., KRUSE, U., NEUBAUER, G., RAMSDEN, N., RICK, J., KUSTER, B. AND DREWES, G. (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nature biotechnology* **25**, 1035–1044. ISSN 1087-0156.
- BANTSCHIEFF, M., SCHOLTEN, A. AND HECK, A. J. R. (2009). Revealing promiscuous drug-target interactions by chemical proteomics. *Drug discovery today* **14**, 1021–1029. ISSN 1878-5832.
- BARSKI, O. A., TIPPARAJU, S. M. AND BHATNAGAR, A. (2008). *The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification*. ISSN 1097-9883 ISBN 0360253080243.
- BARSKI, O. A., MINDNICH, R. AND PENNING, T. M. (2013). Alternative splicing in the aldo-keto reductase superfamily: Implications for protein nomenclature. *Chemico-Biological Interactions* **202**, 153–158. ISSN 00092797.
- BERGER, A. B., VITORINO, P. M. AND BOGYO, M. (2004). Activity-Based Protein Profiling. *American Journal of Pharmacogenomics* **4**, 371–381. ISSN 1175-2203 ISBN 978-3-642-28378-9.
- BERKOVSKY, B. M., MEDVEDEV, V. F. AND KRAKOV, M. S. (1993). *Magnetic fluids*. Oxford Univ. Press ISBN 0198563884.
- BISEN, P. S. AND SHARMA, A. (2012). *Introduction to instrumentation in life sciences*. Crc Press ISBN 1466512407.
- BLACKBURN, G. M. AND JENCKS, W. P. (1968). The mechanism of the aminolysis of methyl

- formate. *Journal of the American Chemical Society* **90**, 2638–2645. ISSN 0002-7863 ISBN 9788578110796.
- BLACKWELL, J. R. AND HORGAN, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. **295**, 10–12.
- BLOCK, H., MAERTENS, B., SPRIESTERSBACH, A., BRINKER, N., KUBICEK, J., FABIS, R., LABAHN, J. AND SCHÄFER, F. (2009). Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. In *Guide to Protein Purification, 2nd Edition* (ed. Enzymology, R. R. B. and M. P. D. B. T.-M. in), pp. 439–473. Academic Press ISBN 0076-6879.
- BLUMLEIN, A. AND MCMANUS, J. J. (2013). Reversible and non-reversible thermal denaturation of lysozyme with varying pH at low ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 2064–2070. ISSN 15709639 ISBN 1570-9639.
- BONDOS, S. E. AND BICKNELL, A. (2003). Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry* **316**, 223–231. ISSN 00032697 ISBN 0003-2697 (Print)r0003-2697 (Linking).
- BREHMER, D., GREFF, Z., GODL, K., BLENCHE, S., KURTENBACH, A., WEBER, M., MU, S., KLEBL, B., COTTEN, M. AND DAUB, H. (2005). Cellular Targets of Gefitinib. *Cancer Research* **65**, 379–382.
- BREYER-PFAFF, U. AND NILL, K. (2000). High-affinity stereoselective reduction of the enantiomers of ketotifen and of ketonic nortriptyline metabolites by aldo-keto reductases from human liver. *Biochemical pharmacology* **59**, 249–260. ISSN 0006-2952 ISBN 4970712972.
- CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERI, G. M., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA, P., ZARDI, L. AND RIGHETTI, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–1333. ISSN 0173-0835 ISBN 3945802792.
- CARPENTER, E. P., BEIS, K., CAMERON, A. D. AND IWATA, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 581–586. ISSN 0959-440X.
- CATIMEL, B., RITTER, G., WELT, S., OLD, L. J., COHEN, L., NERRIE, M. A, WHITE, S. J., HEATH, J. K., DEMEDIUK, B., DOMAGALA, T., LEE, F. T., SCOTT, A M., TU, G. F., JI, H., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J., BURGESS, A W. AND NICE, E. C. (1996). Purification and characterization of a novel restricted antigen expressed by normal and transformed human colonic epithelium. *The Journal of biological chemistry* **271**, 25664–70. ISSN 0021-9258 ISBN 0021-9258 (Print)r0021-9258 (Linking).
- CLAMP, M., FRY, B., KAMAL, M., XIE, X., CUFF, J., LIN, M. F., KELLIS, M., LINDBLAD-TOH, K. AND LANDER, E. S. (2007). Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19428–19433. ISSN 0027-8424 ISBN 1091-6490 (Electronic).
- CRAVATT, B. F., WRIGHT, A. T. AND KOZARICH, J. W. (2008). Activity-Based Protein Profiling: From Enzyme Chemistry to Proteomic Chemistry. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 383–414. ISSN 0066-4154.
- CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. AND ANFINSEN, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Biochemistry* **61**, 636–643.
- CUMMINS, P. M. AND O'CONNOR, B. F. (2011). Hydrophobic interaction chromatography. In *Protein Chromatography*, pp. 431–437. Springer ISBN 1607619121.
- DANGERFIELD, J. A., WINDBICHLER, N., SALMONS, B., GÜNZBURG, W. H. AND SCHRÖDER, R. (2006). Enhancement of the StreptoTag method for isolation of endogenously

- expressed proteins with complex RNA binding targets. *Electrophoresis* **27**, 1874–1877. ISSN 0173-0835.
- DAUB, H., OLSEN, J. V., BAIRLEIN, M., GNAD, F., OPPERMAN, F. S., KÖRNER, R., GREFF, Z., KÉRI, G., STEMMANN, O. AND MANN, M. (2008). Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Molecular cell* **31**, 438–448. ISSN 1097-4164.
- DE DIOS ALCHÉ, J. AND DICKINSON, H. (1998). Affinity Chromatographic Purification of Antibodies to a Biotinylated Fusion Protein Expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **12**, 138–143. ISSN 1046-5928.
- DIXON, S. J. AND STOCKWELL, B. R. (2009). Identifying druggable disease-modifying gene products. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 549–555. ISSN 13675931 ISBN 1879-0402 (Electronic)r1367-5931 (Linking).
- DOUGAN, L., GENCHEV, G. Z., LU, H. AND FERNANDEZ, J. M. (2011). Probing osmolyte participation in the unfolding transition state of a protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 9759–9764. ISSN 0027-8424.
- DUELLMAN, S. J. AND BURGESS, R. R. (2009). Antigen-binding properties of monoclonal antibodies reactive with EBNA1 and use in immunoaffinity chromatography. *PloS one* **4**, e4614. ISSN 1932-6203.
- DUNNILL, P. AND LILLY, M. D. (1974). Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. *Biotechnology and Bioengineering* **16**, 987–990. ISSN 1097-0290.
- E&K SCIENTIFIC (2016).
- EASTERDAY, R. L. AND EASTERDAY, I. M. (1974). Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on Sephadex® and Sepharose® dye derivatives. In *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, pp. 123–133. Springer ISBN 1468469843.
- EISELT, P., YEH, J., LATVALA, R. K., SHEA, L. D. AND MOONEY, D. J. (2000). Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials* **21**, 1921–1927. ISSN 0142-9612.
- ELLIS, E. M., JUDAH, D. J., NEAL, G. E. AND HAYES, J. D. (1993). An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10350–10354. ISSN 0027-8424.
- ENDO, S., MAEDA, S., MATSUNAGA, T., DHAGAT, U., EL-KABBANI, O., TANAKA, N., NAKAMURA, K. T., TAJIMA, K. AND HARA, A. (2009). Molecular determinants for the stereospecific reduction of 3-ketosteroids and reactivity towards all-trans-retinal of a short-chain dehydrogenase/reductase (DHRS4). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **481**, 183–190. ISSN 00039861 ISBN 0003-9861.
- ESTONIUS, M., SVENSSON, S. AND HÖÖG, J.-O. (1996). Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme. *FEBS Letters* **397**, 338–342. ISSN 00145793.
- ETZION, Y. AND MUSLIN, A. J. (2009). The application of phenotypic high-throughput screening techniques to cardiovascular research. *Trends in cardiovascular medicine* **19**, 207–12. ISSN 1873-2615 ISBN 2122633255.
- FIRER, M. A. (2001). Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **49**, 433–442. ISSN 0165022X ISBN 0165-022X.
- FUCHS, H., TAUBER, R. AND GESSNER, R. (2001). Determination of optimal non-denaturing elution conditions from affinity columns by a solid-phase screen.

- BioTechniques* **31**, 584, 586, 588–90, passim. ISSN 0736-6205.
- GABRIELLI, F. AND TOFANELLI, S. (2012). Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. *Gene* **511**, 461–9. ISSN 1879-0038.
- GALA, M. A (2002). Effect of the Spacer Arm in Affinity Chromatography: Determination of Adsorption Characteristics and Flow Rate Effect. *Society* 2296–2304. ISSN 0888-5885.
- GUIFFANT, D., TRIBOUILLARD, D., GUG, F., GALONS, H., MEIJER, L., BLONDEL, M. AND BACH, S. (2007). Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnology journal* **2**, 68–75. ISSN 1860-7314.
- HAECKEL, R., HESS, B., LAUTERBORN, W. AND WÜSTER, K.-H. (1968). Purification and Allosteric Properties of Yeast Pyruvate Kinase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **349**, 699–714. ISSN 1437-4315.
- HAESELEER, F., HUANG, J., LEBIODA, L., SAARI, J. C. AND PALCZEWSKI, K. (1998). Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* **271**, 21790–21799. ISSN 00219258 ISBN 0021-9258 (Print).
- HAESELEER, F., JANG, G., IMANISHI, Y., DRIESSEN, C. A. G. G., MATSUMURA, M., NELSON, P. S., PALCZEWSKI, K. S. AND OPHTHALMOLOGY, D. (2002). Dual-substrate specificity short-chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *Journal of Biological Chemistry* 206–221. ISSN 0021-9258.
- HAGEL, L. (2001). Gel-Filtration Chromatography. In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. ISBN 9780471142720.
- HEDHAMMAR, M., KARLSTROM, A. AND HOBER, S. (2006). Chromatographic methods for protein purification. *Stockholm: Royal Institute of Technology* 1–31.
- HEDLUND, J., JÖRNVALL, H. AND PERSSON, B. (2010). Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC bioinformatics* **11**, 534. ISSN 1471-2105.
- HERMANSON, G. T. (2013). *Bioconjugate techniques*. 2nd ed. Academic press ISBN 0123822408.
- HIRAMOTO, M., MAEKAWA, N., KUGE, T., AYABE, F., WATANABE, A., MASAIKE, Y., HATAKEYAMA, M., HANDA, H. AND IMAI, T. (2010). High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads. *Biomedical chromatography: BMC* **24**, 606–612. ISSN 1099-0801.
- HOFFMANN, F. AND MASER, E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug metabolism reviews* **39**, 87–144. ISSN 0360-2532 ISBN 0360-2532.
- HOFMANN, I., SCHNÖLZER, M., KAUFMANN, I. AND FRANKE, W. W. (2002). Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular biology of the cell* **13**, 1665–1676. ISSN 1059-1524.
- HUMAN PROTEOME MAP (2015). Human Proteome Map.
- HWANG, M.-N. AND EDERER, G. M. (1975). A rapid hippurate hydrolysis test for the presumptive identification of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* **1**, 114–115. ISSN 1465-3931.
- CHARBONNEAU, A. AND THE, V. L. (2001). Genomic organization of a human 5beta-reductase and its pseudogene and substrate selectivity of the expressed enzyme. *Biochimica et biophysica acta* **1517**, 228–235. ISSN 0006-3002 (Print).

- CHEN, C. H. AND LEE, W. C. (2001). Affinity chromatography of proteins on non-porous copolymerized particles of styrene, methyl methacrylate and glycidyl methacrylate. *Journal of chromatography. A* **921**, 31–7. ISSN 0021-9673 ISBN 8865272120.
- CHETYRKIN, S. V., HU, J., GOUGH, W. H., DUMAUAL, N. AND KEDISHVILI, N. Y. (2001). Further Characterization of Human Microsomal 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **386**, 1–10. ISSN 00039861.
- INAGAKI, M., WATANABE, M., HIDAKAS, H. AND HIDAKA, H. (1985). N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a newly synthesized protein kinase inhibitor, functions as a ligand in affinity chromatography. Purification of Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent and other protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 2922–2925. ISSN 0021-9258.
- IWATA, N., INAZU, N., TAKEO, S. AND SATOH, T. (1990). Carbonyl reductases from rat testis and vas deferens. Purification, properties and localization. *European journal of biochemistry / FEBS* **193**, 75–81. ISSN 0014-2956.
- JEZ, J. M. AND PENNING, T. M. (2001). The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-biological interactions* **130**, 499–525. ISSN 0009-2797.
- JEZ, J. M., BENNETT, M. J., SCHLEGEL, B. P., LEWIS, M. AND PENNING, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical journal* **326 (Pt 3)**, 625–636. ISSN 0264-6021 ISBN 0264-6021 (Print)r0264-6021 (Linking).
- JÖRNVALL, H., HÖÖG, J. O. AND PERSSON, B. (1999). SDR and MDR: Completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Letters* **445**, 261–264. ISSN 00145793 ISBN 0014-5793 (Print)r0014-5793 (Linking).
- JÖRNVALL, H., LANDREH, M. AND ÖSTBERG, L. J. (2015). Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chemico-Biological Interactions* **234**, 75–9. ISSN 00092797.
- JUNGBAUER, A. (2005). Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A* **1065**, 3–12. ISSN 00219673.
- KARLSSON, T., VAHLQUIST, A., KEDISHVILI, N. AND TÖRMÄ, H. (2003). 13-cis-retinoic acid competitively inhibits 3 α -hydroxysteroid oxidation by retinol dehydrogenase RoDH-4: A mechanism for its anti-androgenic effects in sebaceous glands? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 273–278. ISSN 0006291X.
- KASSNER, N., HUSE, K., MARTIN, H.-J., GÖDTEL-ARMBRUST, U., METZGER, A., MEINEKE, I., BROCKMÖLLER, J., KLEIN, K., ZANGER, U. M., MASER, E. AND WOJNOWSKI, L. (2008). Carbonyl Reductase 1 Is a Predominant Doxorubicin Reductase in the Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 2113–2120.
- KATAYAMA, H. AND ODA, Y. (2007). Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography. *Journal of Chromatography B* **855**, 21–27. ISSN 15700232.
- KAVANAGH, K. L., JÖRNVALL, H., PERSSON, B. AND OPPERMAN, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 3895–3906. ISSN 1420-9071.
- KEDISHVILI, N. Y., BELYAEVA, O. V AND GOUGH, W. H. (2001). Cloning of the human RoDH-related short chain dehydrogenase gene and analysis of its structure. *Chemico-*

- Biological Interactions* **130-132**, 457–467. ISSN 00092797.
- KELLER, B., VOLKMANN, A., WILCKENS, T., MOELLER, G. AND ADAMSKI, J. (2006). Bioinformatic identification and characterization of new members of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology* **248**, 56–60. ISSN 03037207.
- KNOLL, M. (2008). The Medium-Chain Dehydrogenase / Reductase Engineering Database: A systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence – structure – function relationship. *Database* **17**, 1689–1697.
- KORECKÁ, L., JEŽOVÁ, J., BÍLKOVÁ, Z., BENEŠ, M., HORÁK, D., HRADCOVÁ, O., SLOVÁKOVÁ, M. AND VIOVY, J. L. (2005). Magnetic enzyme reactors for isolation and study of heterogeneous glycoproteins. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 349–357. ISSN 03048853 ISBN 0304-8853.
- LABROU, N. E. (2003). Design and selection of ligands for affinity chromatography. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **790**, 67–78. ISSN 1570-0232.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680–685. ISSN 0028-0836.
- LANDRY, Y. AND GIES, J. P. (2008). Drugs and their molecular targets: An updated overview. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **22**, 1–18. ISSN 07673981 ISBN 1472-8206 (Electronic)n0767-3981 (Linking).
- LETELIER, M. E., SÁNCHEZ-JOFRE, S., PEREDO-SILVA, L., CORTÉS-TRONCOSO, J. AND ARACENA-PARKS, P. (2010). Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chemico-Biological Interactions* **188**, 220–227. ISSN 00092797.
- LI, W. C. (1997). Protein separation using non-porous sorbents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **699**, 29–45. ISSN 15726495 ISBN 0378-4347.
- LIAO, Y., CHENG, Y. AND LI, Q. (2007). Preparation of nitrilotriacetic acid/Co²⁺-linked, silica/boron-coated magnetite nanoparticles for purification of 6 x histidine-tagged proteins. *Journal of chromatography. A* **1143**, 65–71. ISSN 0021-9673.
- LIDÉN, M. AND ERIKSSON, U. (2006). Understanding retinol metabolism: Structure and function of retinol dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 13001–13004. ISSN 00219258 ISBN 0021-9258 (Print)r0021-9258 (Linking).
- LIFEDB (2015). LIFEdb.
- LIU, Y. AND GUO, M. (2014). Chemical proteomic strategies for the discovery and development of anticancer drugs. *Proteomics* **14**, 399–411. ISSN 1615-9861.
- LÓPEZ-RAYO, S., LUCENA, J. J., LAGHI, L. AND CREMONINI, M. A. (2011). Demetalation of Fe, Mn, and Cu Chelates and Complexes: Application to the NMR Analysis of Micronutrient Fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 13110–13116. ISSN 0021-8561.
- LOUNKINE, E., KEISER, M. J., WHITEBREAD, S., MIKHAILOV, D., HAMON, J., JENKINS, J. L., LAVAN, P., WEBER, E., DOAK, A. K. AND CÔTÉ, S. (2012). Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets. *Nature* **486**, 361–367. ISSN 0028-0836.
- LUNDOVÁ, T., ZEMANOVÁ, L., MALČEKOVÁ, B., SKARKA, A., ŠTAMBERGOVÁ, H., HAVRÁNKOVÁ, J., ŠAFR, M. AND WSÓL, V. (2014). Molecular and biochemical characterisation of human short-chain dehydrogenase/reductase member 3 (DHRS3). *Chemico-Biological Interactions* **234**, 178–187. ISSN 00092797.
- MAEKAWA, N., HIRAMOTO, M., SAKAMOTO, S., AZUMA, M., ITO, T., IKEDA, M., NAITOU, M., ACHARYA, H. P., KOBAYASHI, Y., SUEMATSU, M., HANDA, H. AND IMAI, T. (2011). High-

- performance affinity purification for identification of 15-deoxy- Δ 12,14 -PGJ₂ interacting factors using magnetic nanobeads. *Biomedical chromatography: BMC* **25**, 466–471. ISSN 1099-0801.
- MAGDELDIN, S. AND MOSER, A. (1996). Affinity Chromatography: Principles and Applications. 3–29.
- MALÁTKOVÁ, P., MASER, E. AND WSÓL, V. (2010). Human carbonyl reductases. *Current drug metabolism* **11**, 639–658. ISSN 1875-5453 ISBN 4204950671.
- MARGARUCCI, L., MONTI, M. C., TOSCO, A., RICCIO, R. AND CASAPULLO, A. (2010). Chemical proteomics discloses petrosapongiolide M, an antiinflammatory marine sesterterpene, as a proteasome inhibitor. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **49**, 3960–3963. ISSN 1521-3773.
- MARTIN, H.-J., BREYER-PFAFF, U., WSÓL, V., VENZ, S., BLOCK, S. AND MASER, E. (2006). Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **34**, 464–70. ISSN 0090-9556.
- MASER, E., VÖLKER, B. AND FRIEBERTSHÄUSER, J. (2002). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* **41**, 2459–2465. ISSN 0006-2960.
- MASER, E., WSÓL, V. AND MARTIN, H.-J. (2006). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: purification from human liver and characterization as carbonyl reductase of xenobiotics. *Molecular and cellular endocrinology* **248**, 34–37. ISSN 0303-7207.
- MATSUNAGA, T., HINTANI, S. S. AND ARA, A. H. (2006). Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **21**, 1–18.
- MATSUNAGA, T., ENDO, S., MAEDA, S., ISHIKURA, S., TAJIMA, K., TANAKA, N., NAKAMURA, K. T., IMAMURA, Y. AND HARA, A. (2008). Characterization of human DHRS4: An inducible short-chain dehydrogenase/reductase enzyme with 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **477**, 339–347. ISSN 00039861 ISBN 1096-0384 (Electronic).
- MELKA, M. (1993). Oracin-Antineoplastic agent preclinical summary report 09/92.
- MIAO, Q., ZHANG, C.-C. AND KAST, J. (2012). Chemical proteomics and its impact on the drug discovery process. *Expert review of proteomics* **9**, 281–291. ISSN 1744-8387.
- MIROUX, B. AND WALKER, J. E. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* **260**, 289–298. ISSN 0022-2836 ISBN 0022-2836 (Print).
- MOHR, P. (1985). *Affinity chromatography: practical and theoretical aspects*. CRC Press ISBN 082477468X.
- MOSER, A. AND HAGE, D. (2010). Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* **2**, 769–790. ISSN 1757-6199 ISBN 1757-6180.
- MOUMMOU, H., KALLBERG, Y., TONFACK, L. B., PERSSON, B. AND VAN DER REST, B. (2012). The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC plant biology* **12**, 219. ISSN 1471-2229.
- MURRAY, R., BENDER, D., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J., RODWELL, V. AND WEIL, P. A. (2012). *Harpers Illustrated Biochemistry 29/E*. McGraw Hill Professional ISBN

- 0071809694.
- NISHIKIDO, N., TAKAHARA, T., KOBAYASHI, H. AND TANAKA, M. (1982). Interaction between Hydrophilic Proteins and Nonionic Detergents Studied by Surface Tension Measurements. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **55**, 3085–3088.
- NISHIO, K., MASAIKE, Y., IKEDA, M., NARIMATSU, H., GOKON, N., TSUBOUCHI, S., HATAKEYAMA, M., SAKAMOTO, S., HANYU, N., SANDHU, A., KAWAGUCHI, H., ABE, M. AND HANDA, H. (2008). Development of novel magnetic nano-carriers for high-performance affinity purification. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **64**, 162–169. ISSN 0927-7765.
- NOVOTNÁ, R., WSÓL, V., XIONG, G. AND MASER, E. (2008). Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology letters* **181**, 1–6. ISSN 0378-4274.
- Ó'FÁGÁIN, C., CUMMINS, P. AND O'CONNOR, B. (2011). Gel-Filtration Chromatography. In *Protein Chromatography SE - 2* (ed. Walls, D.) and Loughran, S. T.), pp. 25–33. Humana Press ISBN 978-1-60761-912-3.
- ODERMATT, A. AND NASHEV, L. G. (2010). The glucocorticoid-activating enzyme 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **119**, 1–13. ISSN 1879-1220.
- OHNO, S., NAKAGAWARA, S., HONDA, Y. AND NAKAJIN, S. (2013). Evidence for expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type3 (HSD11B3/HSD11B1L) in neonatal pig testis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **381**, 145–156. ISSN 03008177 ISBN 1101001316974.
- OHSHIMA, T., HAYASHI, Y., AGURA, K., FUJII, Y., YOSHIYAMA, A. AND MASHIMA, K. (2012). Sodium methoxide: a simple but highly efficient catalyst for the direct amidation of esters. *Chemical Communications* **48**, 5434. ISSN 1359-7345 ISBN 1359-7345.
- ONG, S.-E., SCHENONE, M., MARGOLIN, A. A, LI, X., DO, K., DOUD, M. K., MANI, D. R., KUAI, L., WANG, X., WOOD, J. L., TOLLIDAY, N. J., KOEHLER, A. N., MARCAURELLE, L. A, GOLUB, T. R., GOULD, R. J., SCHREIBER, S. L. AND CARR, S. A (2009). Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4617–22. ISSN 1091-6490 ISBN 1091-6490 (Electronic)n0027-8424 (Linking).
- 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. ISSN 0362-1642.
- OSORIO-YÁÑEZ, C., GARCÍA-TAVERA, J. L., PÉREZ-NÚÑEZ, M. T., POBLETE-NAREDO, I., MUÑOZ, B., BARRON-VIVANCO, B. S., ROTHENBERG, S. J., ZAPATA-PÉREZ, O. AND ALBORES, A. (2012). Benzo(a)pyrene induces hepatic AKR1A1 mRNA expression in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology mechanisms and methods* **22**, 438–44. ISSN 1537-6524 ISBN 1537-6516.
- OSTBERG, L. J., PERSSON, B. AND HÖÖG, J.-O. (2014). The mammalian alcohol dehydrogenase genome shows several gene duplications and gene losses resulting in a large set of different enzymes including pseudoenzymes. *Chemico-biological interactions* **234**, 1–5. ISSN 1872-7786.
- PAUL, K., NATHAN, L. C., DANIEL, C., CLARISSA, D. AND PATRICE, H. (2008). Global proteomics: pharmacodynamic decision making via geometric interpretations of proteomic analyses. *J Proteomics Bioinform* **1**, 315–328.
- PEARSE, B. M. (1988). Receptors compete for adaptors found in plasma membrane

- coated pits. *The EMBO journal* **7**, 3331–3336. ISSN 0261-4189 ISBN 0261-4189 (Print)r0261-4189 (Linking).
- PENNING, T. M. (2005). AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 1687–90. ISSN 1078-0432.
- PENNING, T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions* **234**, 236–246. ISSN 00092797.
- PENNING, T. M. AND DRURY, J. E. (2007). Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **464**, 241–250. ISSN 00039861 ISBN 0003-9861.
- PENNING, T. M., JIN, Y., STECKELBROECK, S., RIŽNER, T. L. AND LEWIS, M. (2004). Structure–function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular and cellular endocrinology* **215**, 63–72. ISSN 0303-7207.
- PERSSON, B. AND KALLBERG, Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions* **202**, 111–115. ISSN 00092797.
- PERSSON, B., HEDLUND, J. AND JÖRNVALL, H. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the MDR superfamily. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **65**, 3879–3894. ISSN 1420-9071.
- PERSSON, B., KALLBERG, Y., BRAY, J. E., BRUFORD, E., DELLAPORTA, S. L., FAVIA, A. D., DUARTE, R. G., JÖRNVALL, H., KAVANAGH, K. L., KEDISHVILI, N., KISIELA, M., MASER, E., MINDNICH, R., ORCHARD, S., PENNING, T. M., THORNTON, J. M., ADAMSKI, J. AND OPPERMAN, U. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-biological interactions* **178**, 94–98. ISSN 1872-7786.
- PILKA, E. S., NIESEN, F. H., LEE, W. H., EL-HAWARI, Y., DUNFORD, J. E., KOCHAN, G., WSÓL, V., MARTIN, H.-J., MASER, E. AND OPPERMAN, U. (2009). Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PloS one* **4**, e7113. ISSN 1932-6203.
- PILKA, E. S., HOJZAN, V., UGOCHUKWU, E., SUNDSTROM, M., GILEADI, O., VON DELFT, F., LEE, W. H., MULLER, S., MARSDEN, B. D., BOUNTRA, C. AND OPPERMAN, U. (2015). DHRS1: Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1.
- PRASATH, R. A., GOKMEN, M. T., ESPEEL, P. AND DU PREZ, F. E. (2010). Thiol-ene and thiol-yne chemistry in microfluidics: a straightforward method towards macroporous and nonporous functional polymer beads. *Polymer Chemistry* **1**, 685. ISSN 1759-9954 ISBN 1759995417599.
- RIX, U. AND SUPERTI-FURGA, G. (2009). Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nature chemical biology* **5**, 616–624. ISSN 1552-4469.
- ROBINSON, J. B., STROTTMANN, J. M., WICK, D. G. AND STELLWAGEN, E. (1980). Affinity chromatography in nonionic detergent solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 5847–5851. ISSN 0027-8424.
- ROOP-NGAM, P. AND THONGBOONKERD, V. (2010). Development of an oxalate-affinity chromatographic column to isolate oxalate-binding proteins. *Analytical Methods* **2**, 1051–1055. ISSN 1759-9660.
- ROOP-NGAM, P., CHAIYARIT, S., PONGSAKUL, N. AND THONGBOONKERD, V. (2012). Isolation and characterizations of oxalate-binding proteins in the kidney. *Biochemical and biophysical research communications* **424**, 629–634. ISSN 1090-2104.
- ROSANO, G. L. AND CECCARELLI, E. A. (2014). Recombinant protein expression in

- Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* **5**, 1–17. ISSN 1664302X ISBN 1664-302X.
- ROSEMOND, J. C. M. AND WALSH, J. (2004). Human Carbonyl Reduction Pathways and a Strategy for Their Study In Vitro. *Drug Metabolism Reviews* **36**, 335–361. ISSN 0360-2532.
- SAGHATELIAN, A. AND CRAVATT, B. F. (2005). Assignment of protein function in the postgenomic era. *Nature chemical biology* **1**, 130–142. ISSN 1552-4450.
- SATO, S., MURATA, A., SHIRAKAWA, T. AND UESUGI, M. (2010). Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies. *Chemistry & biology* **17**, 616–623. ISSN 1879-1301.
- SEDDON, A. M., CURNOW, P. AND BOOTH, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1666**, 105–117. ISSN 00052736 ISBN 0006-3002 (Print).
- SEE, Y. P., OLLEY, P. M. AND JACKOWSKI, G. (1985). The effects of high salt concentrations in the samples on molecular weight determination in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **382–387**. ISSN 0173-0835.
- SHIMIZU, N., SUGIMOTO, K., TANG, J., NISHI, T., SATO, I., HIRAMOTO, M., AIZAWA, S., HATAKEYAMA, M., OHBA, R., HATORI, H., YOSHIKAWA, T., SUZUKI, F., OOMORI, A., TANAKA, H., KAWAGUCHI, H., WATANABE, H. AND HANDA, H. (2000). High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nature biotechnology* **18**, 877–881. ISSN 1087-0156.
- SCHNIER, J. B., KAUR, G., KAISER, A., STINSON, S. F., SAUSVILLE, E. A., GARDNER, J., NISHI, K., BRADBURY, E. M. AND SENDEROWICZ, A. M. (1999). Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a flavopiridol-binding protein. *FEBS Letters* **454**, 100–104. ISSN 00145793.
- SCHOLTEN, A., POH, M. K., VAN VEEN, T. A. B., VAN BREUKELEN, B., VOS, M. A. AND HECK, A. J. R. (2006). Analysis of the cGMP/cAMP interactome using a chemical proteomics approach in mammalian heart tissue validates sphingosine kinase type 1-interacting protein as a genuine and highly abundant AKAP. *Journal of Proteome Research* **5**, 1435–1447. ISSN 15353893 ISBN 1535-3893 (Print)n1535-3893 (Linking).
- SCHUSTER, M., WASSERBAUER, E., ORTNER, C., GRAUMANN, K., JUNGBAUER, A., HAMMERSCHMID, F. AND WERNER, G. (2000). Short cut of protein purification by integration of cell-disruption and affinity extraction. *Bioseparation* **9**, 59–67. ISSN 0923-179X.
- SINGARAVELU, R., BLAIS, D. R., MCKAY, C. S. AND PEZACKI, J. P. (2010). Activity-based protein profiling of the hepatitis C virus replication in Huh-7 hepatoma cells using a non-directed active site probe. *Proteome science* **8**, 1–5. ISSN 1477-5956 ISBN 1477-5956 (Electronic)n1477-5956 (Linking).
- STADTMAN, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* **9**, 315–325. ISSN 08915849.
- STAROS, J. V., WRIGHT, R. W. AND SWINGLE, D. M. (1986). Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical biochemistry* **156**, 220–222. ISSN 0003-2697.
- STECKELBROECK, S., OYESANMI, B., JIN, Y., LEE, S.-H., KLOOSTERBOER, H. J. AND PENNING, T. M. (2006). Tibolone Metabolism in Human Liver Is Catalyzed by $3\alpha/3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities of the Four Isoforms of the Aldo-Keto Reductase (AKR)1C Subfamily. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **316**, 1300–1309.

- SZOTÁKOVÁ, B., WSÓL, V., TREJTNAR, F., SKÁLOVÁ, L. AND KVASNIČKOVÁ, E. (1996). Studies on the metabolism of the potential cytostatic drug oracin. Species differences. *EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY* **48**, 377–379. ISSN 0940-2993.
- ŠAFARÍK, I. AND ŠAFARÍKOVÁ, M. (2000). Biologically active compounds and xenobiotics: magnetic affinity separations. *Encyclopedia of Separation Science* 2163–2170.
- ŠAFARÍK, I. AND ŠAFARÍKOVÁ, M. (2004). Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic research and technology* **2**, 1–17. ISSN 1477-044X.
- ŠKARYDOVÁ, L. AND WSÓL, V. (2012). Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug metabolism reviews* **44**, 173–191. ISSN 1097-9883.
- ŠKARYDOVÁ, L., SKARKA, A., NOVOTNÁ, R., ŽIVNÁ, L., MARTIN, H.-J., WSÓL, V. AND 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**, 52–60. ISSN 1879-3185.
- ŠKARYDOVÁ, L., TOMANOVÁ, R., HAVLÍKOVÁ, L., ŠTAMBERGOVÁ, H., SOLICH, P. AND WSÓL, V. (2014). Deeper Insight into the Reducing Biotransformation of Bupropion in the Human Liver. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **29**, 177–184. ISSN 1347-4367.
- ŠTAMBERGOVÁ, H., ŠKARYDOVÁ, L., DUNFORD, J. E. AND WSÓL, V. (2014). Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chemico-biological interactions* **207**, 52–7. ISSN 1872-7786.
- ŠTAMBERGOVÁ, H., ZEMANOVÁ, L., LUNDOVÁ, T., MALČEKOVÁ, B., SKARKA, A., ŠAFR, M. AND WSÓL, V. (2015). Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **155**, 112–119. ISSN 1879-1220.
- TANG, N. T. N. AND LE, L. (2014). Comparative Study on Sequence–Structure–Function Relationship of the Human Short-chain Dehydrogenases/Reductases Protein Family. *Evolutionary Bioinformatics Online* **10**, 165–176. ISSN 1176-9343.
- TANYOLAÇ, D. AND ÖZDURAL, A. R. (2000). New low cost magnetic material: Magnetic polyvinylbutyral microbeads. *Reactive and Functional Polymers* **43**, 279–286. ISSN 13815148 ISBN 3122992124.
- TRINKLE-MULCAHY, L., BOULON, S., LAM, Y. W., URCA, R., BOISVERT, F.-M., VANDERMOERE, F., MORRICE, N. A., SWIFT, S., ROTHBAUER, U., LEONHARDT, H. AND LAMOND, A. (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *The Journal Of Cell Biology* **183**, 223–239. ISSN 1540-8140.
- UNIProt (2015). UniProt.
- VANDERJAGT, D. L., HUNSAKER, L. A., ROBINSON, B., STANGEBYE, L. A. AND DECK, L. M. (1990). Aldehyde and aldose reductases from human placenta. Heterogeneous expression of multiple enzyme forms. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 10912–10918. ISSN 0021-9258.
- VON RECHENBERG, M., BLAKE, B. K., HO, Y.-S. J., ZHEN, Y., CHEPANOSKE, C. LOU, RICHARDSON, B. E., XU, N. AND KERY, V. (2005). Ampicillin/penicillin-binding protein interactions as a model drug-target system to optimize affinity pull-down and mass spectrometric strategies for target and pathway identification. *Proteomics* **5**, 1764–1773. ISSN 1615-9853.
- WARD, W. AND SWIATEK, G. (2009). Protein Purification. *Current Analytical Chemistry* **5**, 85–105. ISSN 15734110.

- WIRTH, H. AND WERMUTH, B. (1992). Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **40**, 1857–1863. ISSN 0022-1554.
- WORRALL, D. M. (1996). Dye-ligand affinity chromatography. In *Protein Purification Protocols*, pp. 169–176. Springer ISBN 0896033368.
- WSÓL, V., KVASNIČKOVÁ, E., SZOTÁKOVÁ, B. AND HAIS, I. M. (1996). High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of metabolites of the potential cytostatic drug oracine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **681**, 169–175. ISSN 0378-4347.
- WSÓL, V., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L., CEPKOVÁ, H. AND KVASNIČKOVÁ, E. (1999a). The main metabolic pathway of oracin, a new potential cytostatic drug, in human liver microsomes and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin. *Enantiomer* **5**, 263–270. ISSN 1024-2430.
- WSÓL, V., SKÁLOVÁ, L., SZOTÁKOVÁ, B., TREJTAR, F. AND KVASNIČKOVÁ, E. (1999b). Sex differences in stereospecificity of oracin reductases in rat in vitro and in vivo. *Chirality* **11**, 505–509.
- WSÓL, V., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. AND MASER, E. (2003). Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chemico-Biological Interactions* **143-144**, 459–468. ISSN 00092797.
- WSÓL, V., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. AND 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**, 253–261. ISSN 0300-483X.
- WSÓL, V., SZOTÁKOVÁ, B., MARTIN, H.-J. AND MASER, E. (2007). Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology* **238**, 111–118. ISSN 0300-483X.
- WU, C.-W., LEE, J.-G. AND LEE, W.-C. (1998). Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **27**, 225–230. ISSN 08854513 ISBN 1470-8744.
- WU, Q., XU, M., CHENG, C., ZHOU, Z., HUANG, Y., ZHAO, W., ZENG, L., XU, J., FU, X., YING, K., XIE, Y. AND MAO, Y. (2002). Molecular cloning and characterization of a novel Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 genea from human fetal brain. *Molecular Biology Reports* **28**, 193–198. ISSN 03014851.
- YANG, P. Y., LIU, K., NGAI, M. H., LEAR, M. J., WENK, M. R. AND YAO, S. Q. (2010). Activity-based proteome profiling of potential cellular targets of orlistat - An FDA-approved drug with anti-tumor activities. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 656–666. ISSN 00027863 ISBN 0002-7863.
- ZHENG, W., LI, G. AND LI, X. (2015). Affinity purification in target identification: the specificity challenge. *Archives of Pharmacal Research*. ISSN 0253-6269.
- ZIEGLER, S., PRIES, V., HEDBERG, C. AND WALDMANN, H. (2013). Target identification for small bioactive molecules: Finding the needle in the haystack. *Angewandte Chemie - International Edition* **52**, 2744–2792. ISSN 14337851 ISBN 1521-3773.
- ZIERVOGEL, B. K. AND ROUX, B. (2013). The Binding of Antibiotics in OmpF Porin. *Structure* **21**, 76–87. ISSN 0969-2126.

8. PŘÍLOHY

8.1. Publikace vztahující se k tématu disertační práce

- I. ŠKARYDOVÁ, L., ANDRÝS, R., HOLUBOVÁ, L., ŠTAMBERGOVÁ, H., KŇAVOVÁ, J., WSÓL, V. AND BÍLKOVÁ, Z. (2013). Efficient isolation of carbonyl-reducing enzymes using affinity approach with anticancer drug oracin as a specific ligand. *Journal of separation science* 36, 1176–1184. ISSN 1615-9314, IF₂₀₁₃ = 2,74.
- II. ANDRÝS, R., ZEMANOVÁ, L., LENČO, J., BÍLKOVÁ, Z. AND WSÓL, V. (2015B). Carbonyl-reducing enzymes as targets of a drug-immobilised affinity carrier. *Chemico-Biological Interactions* 234, 169–177. ISSN 00092797, IF₂₀₁₅ = 2,38.

8.1.1. Publikace I

ŠKARYDOVÁ, L., ANDRÝS, R., HOLUBOVÁ, L., ŠTAMBERGOVÁ, H., KŇAVOVÁ, J., WSÓL, V. AND BÍLKOVÁ, Z. (2013). Efficient isolation of carbonyl-reducing enzymes using affinity approach with anticancer drug oracin as a specific ligand. *Journal of separation science* 36, 1176–1184. ISSN 1615-9314, IF₂₀₁₃ = 2,74.

8.1.2. Publikace II

ANDRÝS, R., ZEMANOVÁ, L., LENČO, J., BÍLKOVÁ, Z. AND WSÓL, V. (2015B). Carbonyl-reducing enzymes as targets of a drug-immobilised affinity carrier. *Chemico-Biological Interactions* 234, 169–177. ISSN 00092797, IF₂₀₁₅ = 2,38.

8.2. Ostatní publikace v časopisech s impaktním faktorem

ANDRÝS, R., ZURITA, J., ZGUNA, N., VERSCHUEREN, K., DE BORGGRAEVE, W. M. AND ILAG, L. L. (2015A). Improved detection of β -N-methylamino-l-alanine using N-hydroxysuccinimide ester of N-butylnicotinic acid for the localization of BMAA in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 3743–3750. ISSN 1618-2642 ISBN 0021601585, IF₂₀₁₅ = 3,44.