

## 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  $17\beta$ -HSD6 bez známé afinity a metabolické aktivity vůči oracinu. Dále byl identifikován enzym  $11\beta$ -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.