Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biologie

Charakterizace mutantních forem 17β-HSD10 proteinu

Diplomová práce

Autor: Bc. Kateřina Vašová

Studijní program: Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie - spec. experimentální biologie

Vedoucí práce: Mgr. Monika Schmidt, Ph.D.

Hradec Králové prosinec 2022

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2019/2020

Studijní program: Biologie a ekologie
Forma studia: Prezenční
Specializace/kombinace: Biologie a ekologie – spec. experimentální biologie (NMBEEB)

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení:	**Kateřina Vašová**
Osobní číslo:	**S19BI020NP**
Adresa:	Rozsochy Nádraží 90, Rozsochy, 59257 Rozsochy, Česká republika
Téma práce:	Charakterizace mutantních forem 17beta-HSD10 proteinu.
Téma práce anglicky:	Characterisation of 17beta-HSD10 protein mutant forms.
Vedoucí práce:	Mgr. Monika Schmidt, Ph.D. Katedra chemie

Zásady pro vypracování:

Vypracujte literární přehled k dané problematice. V praktické části proveďte expresi a purifikaci enzymu 17beta-HSD10 a jeho mutantních forem, stanovte jejich enzymovou aktivitu a porovnejte změnu teploty denaturace mutantních forem enzymu ve srovnání s nemutovaným enzymem.
Při zpracování tématu student vychází z dostupné, ideálně recentní vědecké literatury a každý použitý zdroj informací řádně ocituje a uvede v seznamu použité literatury. Student se při zpracování řídí Metodickými pokyny pro vedení, vypracování a obhajoby vysokoškolských kvalifikačních prací Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové (rozhodnutí děkana č. 4 /2020) a svou práci v průběhu sepisování konzultuje se svým vedoucím práce.

Seznam doporučené literatury:

Yan, S. D. *et al.* Role of ERAB/L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase type II activity in Abeta-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* **274**, 2145-2156 (1999).

Podpis studenta: Datum:

Podpis vedoucího práce: Datum:

© IS/STAG, Portál – Podklad kvalifikační práce , vasovka1, 21. prosince 2022 15:19

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.“

V Hradci Králové dne Bc. Kateřina Vašová

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce paní Mgr. Monice Schmidt, Ph.D., RNDr. Lucii Vinklářové Ph.D., Mgr. Michaele Vaškové a Ireně Pavlíkové za jejich vstřícnost, trpělivost a cenné rady při práci v laboratoři.

Anotace česky

VAŠOVÁ, K. *Charakterizace mutantních forem 17beta-HSD10 proteinu*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí práce Monika Schmidt. 85 s.

Mitochondriální enzym 17β-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 10 (17β-HSD10), jehož kofaktorem je NAD^+/NADH (nikotinamidadenindinukleotid, resp. jeho redukovaná forma), je lokalizován uvnitř mitochondriální matrix. 17β-HSD10 je multifunkčním katalyzátorem redukcí aldehydů a ketonů a oxidací alkoholů. Jeho enzymatická aktivita je důležitá pro správné fungování neuronů. Enzym má široké spektrum substrátů, nejdůležitějšími substráty jsou androgeny a estrogeny, kofaktorem při enzymových reakcích je NAD^+. 17β-HSD10 je vazebným partnerem pro peptid amyloid-beta. Patologie spojená s amyloidem-beta je následkem jeho akumulace, tvorby fibril a amyloidních plaků. Právě tyto procesy v mozku úzce souvisí se vznikem Alzheimerovy choroby.

Experimentální část této diplomové práce byla zaměřena na přípravu enzymu 17β-HSD10 a jeho dvou mutantních forem 17β-HSD10 (Y168G, K172G) a 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A). Exprese proteinu probíhala v bakteriálním expresním systému *E. coli* BL21 (DE3) nesoucím plazmid pET28b s rekombinantně vloženými geny. Z buněk expresního systému byl enzym purifikován, pomocí SDS-PAGE byla ověřena velikost a čistota purifikovaného proteinu, Bradfordovou linearizovanou metodou byla stanovena koncentrace proteinu. Byla změřena enzymatická aktivita proteinu 17β-HSD10 a jeho dvou mutantních forem, jako substrát byl použit 17β-estradiol, kofaktorem této reakce byl NAD^+. Pro aktivní formu enzymu byly experimentálně stanoveny parametry a K_M a V_{max}.

Klíčová slova

17β-HSD10, Alzheimerova choroba, amyloid – beta, purifikace proteinu, enzymatická aktivita

Anotace anglicky

VAŠOVÁ, K. *Characterization of mutant forms of 17beta-HSD10 protein.* Hradec Králové, 2022. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Monika Schmidt. 85 s.

The mitochondrial enzyme 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (17β-HSD10), with the cofactor NAD^+ / NADH (nicotinamide adenine dinucleotide or its reduced form) located inside the mitochondrial matrix. 17β-HSD10 is a multifunctional catalyst for the reduction of aldehydes and ketones and also the oxidation of alcohols. Its enzymatic activity is important for the proper functioning of neurons. The enzyme has a wide range of substrates, the most important substrates are androgens and estrogens. The cofactor in enzymatic reactions is NAD +. 17β-HSD10 and it is able to bind amyloid-beta peptide. The accumulation of amyloid-beta and the formation of fibrils and amyloid plaques in the brain are closely related to the development of Alzheimer's disease.

The experimental part of this diploma thesis is focused on the preparation of the enzyme 17β-HSD10 and its two mutant forms 17β-HSD10 (Y168G, K172G) and 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A). The protein is expressed in the bacterial expression system *E. coli* BL21 (DE3) carrying the plasmid pET28b with recombinantly inserted genes. The enzyme is purified from the expression system. The size of the purified protein was verified by SDS-PAGE electrophoresis, and the protein concentration was determined by the Bradford linearized method. The enzymatic activity of the 17β-HSD10 protein and its two mutant forms was measured, 17β-estradiol was used as a substrate, and NAD^+ was the cofactor of this reaction. The parameters and K_M and V_{max} were experimentally determined for the active form of the enzyme.

Keywords

17β-HSD10, Alzheimer's disease, amyloid – beta, protein purification, enzymatic activity

Obsah

1 Úvod práce 10

2 Teoretická část 12

2.1 Enzym 17β-HSD10 12

2.1.1 Genová struktura 12

2.1.2 Struktura proteinu 13

2.1.3 Enzymatická aktivita 17β-HSD10 a jeho funkce v organismu 14

2.2 Role 17β-HSD10 při některých onemocněních 18

2.2.1 HSD10 18

2.2.2 Rakovina 20

2.2.3 Neurodegenerativní poruchy 21

2.3 Alzheimerova choroba 22

2.3.1 Amyloidová kaskádová hypotéza 23

2.3.2 Tau hypotéza 24

2.3.3 Cholinergní hypotéza 24

2.3.4 Hypotéza oxidačního stresu 25

2.3.5 Hypotéza zánětu 25

2.3.6 Amyloidový prekurzorový protein (APP) 26

2.3.7 Amyloid-beta peptid 28

2.3.8 Alzheimerova choroba a akumulace amyloid-beta peptidu 30

2.3.9 Vazba 17β – HSD10 na amyloid-beta 31

3. Cíl práce 34

4 Experimentální část 35

4.1 Použitý materiál 35

4.1.1 Chemikálie 35

4.1.2 Biologický materiál 36

4.1.3 Přístroje 36

4.1.4 Pufry 36
4.2 Rozmražení bakteriálních štoků a exprese 17β-HSD10 a jeho mutantních variant 38
4.3 Purifikace 17β-HSD10 a jeho mutantních variant 39
4.4 Bradfordova linearizovaná metoda 40
4.5 SDS-PAGE 41
4.6 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant – reakční kinetika podle Michaelis – Mentenové 44
4.6.1 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant 44
4.6.2 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (K_M) 46
4.7 Statistické vyhodnocení 47
5 Výsledky 48
5.1 Výsledky purifikace 17β-HSD10 a jeho mutantních variant – SDS-PAGE elektroforéza 48
5.2 Bradfordova linearizovaná metoda pro měření koncentrace proteinu ve vzorku 52
5.2.1 Sestavení kalibrační řady 52
5.3 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant – reakční kinetika podle Michaelis – Mentenové 55
5.3.1 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantní variant 55
5.3.2 Statistické porovnání hodnot fluorescence u enzymů 17β-HSD10, 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) a 17β-HSD10 (Y168G, K172G) 56
5.3.3 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (K_M) pro 17β-estradiol 60
5.3.4 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (K_M) pro NAD^+ 61
6 Diskuse 63
7 Závěr 67
8 Literatura 68

Seznam zkratek

17β-HSD10	17β-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 10
3α-HSD	3α-hydroxysteroid dehydrogenáza
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
5α-DHP	5α-dihydroprogesteron
ALLO	Alopregnanolon
APP	Amyloidový prekurzorový protein
APS	Peroxodisíran amonný
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DMSO	Dimethylsulfoxid
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
GABA A	Receptor kyseliny gama-aminomáselné typu A
kb	Kilobáze
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelisova konstanta
LD	Smyčka D (loop D)
MRXS10	Mentální retardace vázaná na chromozom X
NAD+	β-Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	β-Nikotinamidadenindinukleotid hydrid
$NADP^+$	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát hydrid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ROS	Reaktivní formy kyslíku

SDR	Rodina dehydrogenáz reduktáz s krátkým řetězcem
SDS	Dodecylsíran sodný
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembránový helix
V_{max}	Maximální rychlost reakce
Xa	Aktivní chromozom X
Xi	neaktivní chromozom X

1 Úvod práce

17β-hydroxysteroiddehydrogenáza typu 10 (17β-HSD10) je multifunkční mitochondriální enzym katalyzující redukci aldehydů a ketonů a oxidaci alkoholů. Jeho hlavními a nejdůležitějšími substráty jsou estrogeny a androgeny. Katalytická aktivita 17β-HSD10 je nezbytná pro udržení normálních funkcí GABAergních neuronů. V organismu je zapojen do mnoha fyziologických funkcí a jeho katalytická aktivita hraje zásadní roli v přežití buněk především v embryonálním stádiu vývoje. Mutace genu HSD17B10 se nejčastěji projevuje jako mitochondriální onemocnění HSD10, což je X-vázaná mentální retardace neboli neurodegenerativní porucha vázaná na X chromozom. Také byl prokázán vliv enzymu 17β-HSD10 na odolnost buněk vůči oxidačnímu stresu a následná souvislost s rakovinou prostaty a kostí.

Další důležitou roli hraje 17β-HSD10 v neurodegenerativních poruchách. Zvýšená hladina enzymu má dva různorodé dopady, prospěšný pro vývoj léčby Parkinsonovy choroby a škodlivý při Alzheimerově chorobě. V případě Alzheimerovy choroby to souvisí s tím, že enzym 17β-HSD10 je schopen vázat peptid amyloid-beta. Akumulace amyloidu-beta v mozku a tvorba fibril a amyloidních plaků velice úzce souvisí s patogenezí této choroby. Právě Alzheimerova choroba je jednou z nejčastějších forem demence, jejíž přesná příčina není dosud známá, i když jednoznačně souvisí s akumulací aberantně sbalených proteinů tvořících komplexy. Stávající léky na Alzheimerovu chorobu se snaží léčit pouze příznaky této závažné choroby, proto je velmi důležitý jakýkoliv výzkum a pokrok v cestě k nalezení příčiny a cílené léčby onemocnění. V případě Parkinsonovy choroby souvisí pozitivní efekt s protektivními účinky zvýšené exprese proteinu, který moduluje neurotoxicitu 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu (neurotoxin poškozující dopaminergní neurony) (Tieu et al., 2004).

Praktická část této diplomové práce pojednává o charakterizaci enzymu17β-HSD10 a jeho dvou mutantních forem 17β-HSD10 (Y168G, K172G), 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A). Enzymy byly purifikovány z bakteriálního expresního systému *E. coli* BL21 (DE3) nesoucího plazmid pET28b s vloženými geny. Sekvenční záměny u mutantních forem změnily složení aminokyselin v primární bílkovinné struktuře, a to v aktivním místě enzymu 17β-HSD10 (Y168G, K172G) a v místě

vazby na amyloid beta 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A). Pomocí Bradfordovy metody byla stanovena koncentrace purifikovaných enzymů, SDS-PAGE elektroforézou byla ověřena velikost a čistota purifikovaných proteinů. Také bylo provedeno ověření enzymatické aktivity enzymů. Pro aktivní formu enzymu 17β-HSD10 byla stanovena K_M a V_{max}.

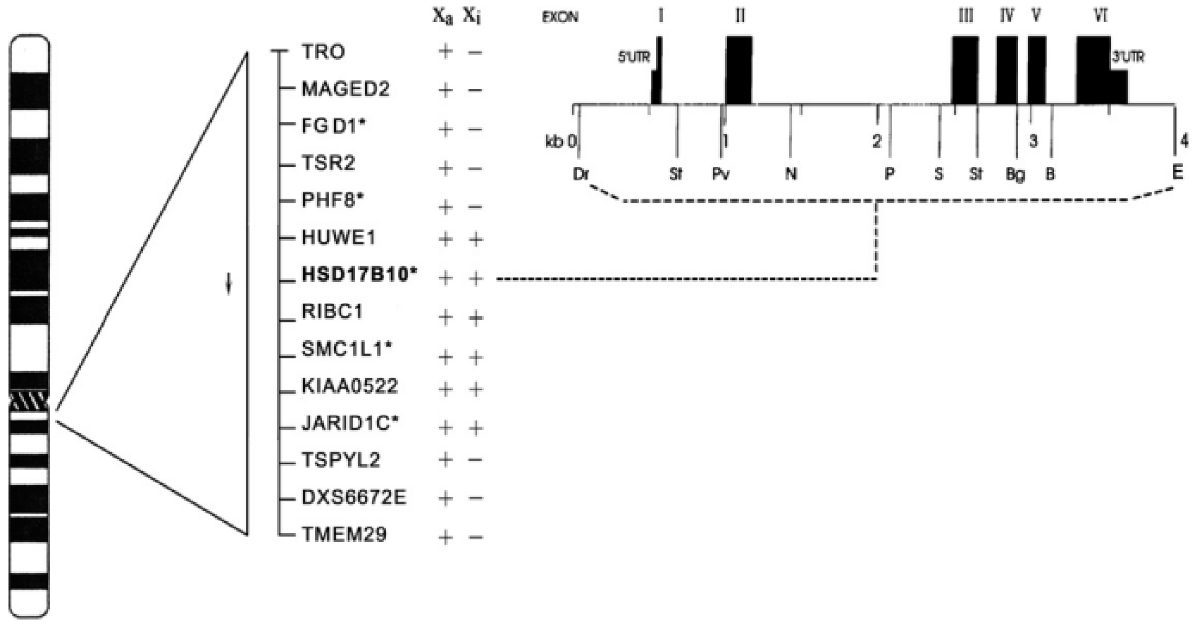
2 Teoretická část

2.1 Enzym 17β-HSD10

Enzym 17β-hydroxysteroiddehydrogenáza typu 10 (17β-HSD10) je lokalizovaný uvnitř mitochondriální matrix a má důležitou roli v beta-oxidaci mastných kyselin (He et al., 1999). 17β-HSD10 je NAD-dependentní oxidoreduktáza, která je členem rodiny dehydrogenáz reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) (Jörnvall et al., 1995). V této rodině enzymů je 17β-HSD10 jediným enzymem, na který je schopen se navázat amyloid-beta, což je toxický peptid vyskytující se v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou. Schopnost vázat amyloid-beta je dána jedinečnou aminokyselinovou oblastí označovanou jako smyčka D (loop D, LD), přičemž tento strukturní motiv chybí u ostatních zástupců rodiny SDR (Jörnvall et al., 1995; Lustbader et al., 2004; Shafqat et al., 2003). Srovnání struktury komplexu 17β-HSD10 s amyloidem-beta se strukturou lidského 17β-HSD10 v komplexu s NAD ukazuje, že u proteinu 17β-HSD10 v komplexu s amyloidem-beta dochází k podstatné deformaci aktivního místa, která brání navázání nikotinamidadenindinukleotidu (NAD+). Největší konformační rozdíl je pozorován v oblasti LD. Tato studie předpokládá, že smyčka D může být rozpoznávacím místem pro amyloid beta (Lustbader et al., 2004).

2.1.1 Genová struktura

Enzym 17β-HSD10 je kódován genem HSD17B10 lokalizovaným na chromozomu Xp11.2. (Obr. 1) Gen je rozdělen na 6 exonů a 5 intronů s celkovou velikostí asi 4 kilobáze (kb)(He et al., 2011; Rauschenberger et al., 2010). Exon 5 může být alternativně sestřižen, to znamená, že může existovat několik různých transkriptů vytvářejících několik izoforem tohoto enzymu (Yang et al., 2007). Gen HSD17B10 může pravděpodobně uniknout inaktivaci chromozomu X, u žen tak exprese probíhá jak z aktivního (X_a) tak i z neaktivního (X_i) chromozomu X (He et al., 2011; Yang et al., 2013; Yang et al., 2007).



Obrázek č. 1: Strukturální organizace genu HSD17B10 a jeho exprese z aktivního (X_a) a neaktivního (X_i) chromozomu X. Římské číslice nad rámečky označují polohy exonů; UTR představuje netranskribovanou oblast. Čísla pod vodorovnou čarou označují délku genu v kb. Místa, která jsou rozpoznávána restrikčními endonukleázami, jsou označena následovně: Dr – *Drd*II; St – *Stu*I; Pv – *Pvu*II; N – *Nsi*I; P – *Pst*I; S – *Sph*I; Bg – *Bgl*I; B – *Bam*HI; E – *Eco*RI. Vzdálenosti mezi sousedícími geny nejsou úměrné. Geny s mutací způsobující mentální retardaci jsou označeny ∗. Použité symboly: +, transkripčně aktivní; -, transkripčně neaktivní; →, směr transkripce HSD17B10 (převzato a upraveno z Yang et al., 2007).

2.1.2 Struktura proteinu

V monomerním stavu má enzym 17β-HSD10 velikost 27 kDa a skládá se z 261 aminokyselin. Enzym tvoří homotetramer o velikosti 108 kDa (Obr. 2)(He et al., 1999). Každý monomer obsahuje aktivní místo zahrnující triádu aminokyselin (Ser155, Tyr168, Lys172) a tzv. Rossmannův záhyb (Kissinger et al., 2004) (složený z centrálního β-skládaného listu, skládajícího se ze sedmi vláken a tří α-helixů na obou jeho stranách (Powell et al., 2000)), který je typický pro enzymy z rodiny SDR. Nikotinamidový kofaktor (NAD^+/NADH) je vázán na enzym v blízkosti aminokyselin katalytické triády a vytváří zde s nimi nevazebné interakce (Kissinger et al., 2004; Oppermann et al., 2003; Powell et al., 2000).

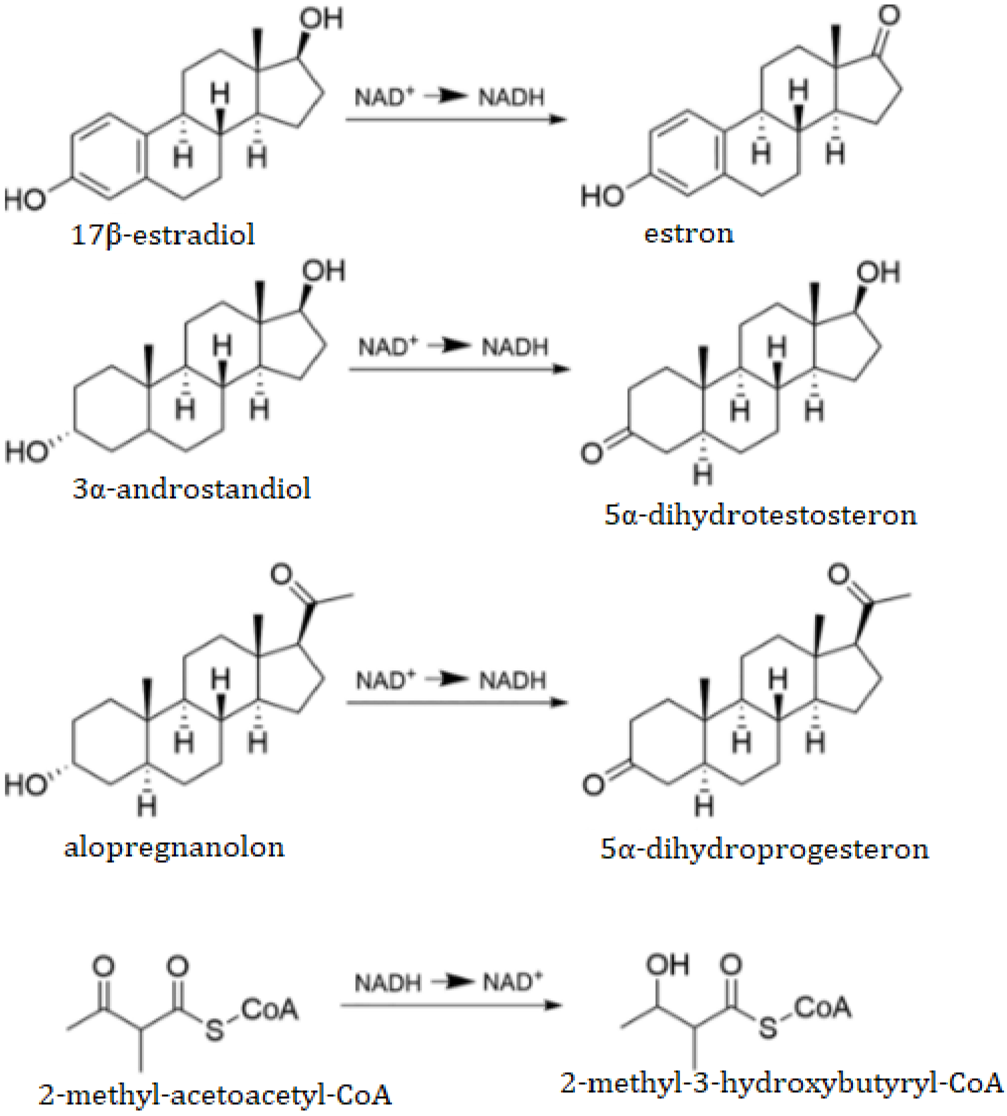
Obrázek č. 2: Kvartérní struktura 17β-HSD10 homotetrameru (identifikovaná pomocí x-ray krystalografie), každá ze čtyř podjednotek zobrazena jinou barvou (převzato a upraveno z Kissinger et al., 2004)

2.1.3 Enzymatická aktivita 17β-HSD10 a jeho funkce v organismu

Pro průběh enzymové reakce jsou důležité aminokyseliny katalytické triády (Ser155, Tyr168 a Lys172). Substrát je vázán na katalytické místo pomocí vodíkových vazeb mezi kyslíkem tyrosinu 168 a vodíkem serinu 155, zatímco kofaktor NAD^+ interaguje s enzymem prostřednictvím vodíkových vazeb s celou katalytickou triádou (Ser155, Tyr168 a Lys172)(Kissinger et al., 2004; Y. Yan et al., 2007).

Aktivní místo enzymu je velmi flexibilní a umožňuje zpracování široké škály různých substrátů (He et al., 2019). Pokud jde o potenciální fyziologické substráty, 17β-HSD10 může katalyzovat dehydrogenaci 17β-estradiolu na estron, 3α-androstandiolu na 5α-dihydrotestosteron (He et al., 1999; S. Du Yan et al., 1999) a 2-methyl-acetoacetyl-CoA na 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA (Shafqat et al., 2003).

Mimo jiné katalyzuje také oxidaci alopregnanolonu na 5α-dihydroprogesteron (Obr. 3) a 3α, 5α-3,21-dihydroxypregnan-20-onu na 5α-dihydrodeoxykortikosteron (Belelli & Lambert, 2005). Schopnost oxidovat jednoduché alkoholy byla popsána také, ale celková aktivita 17β-HSD10 jako alkoholdehydrogenázy byla shledána zanedbatelnou (Yang et al., 2014). Bylo zjištěno, že 17β-HSD10 má schopnost degradovat aldehydy, například vysoce neurotoxický 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), který je produktem metabolismu lipidových peroxidů (Kruman & Mattson, 1999).



Obrázek č. 3: Schématické znázornění reakcí katalyzovaných 17β-HSD10, katalytické dehydrogenace 17β-estradiolu na estron, dehydrogenace 3α-androstandiol na 5α-dihydrotestosteron, dehydrogenace alopregnanolonu na 5α-

dihydroprogesteron a dehydrogenace 2-methyl-acetoacetyl-CoA na 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA (převzato a upraveno z Vinklářová et al., 2020).

Hlavními a nejdůležitějšími substráty zpracovávanými 17β-HSD10 jsou androgeny a estrogeny. Jedna z reakcí, kterou 17β-HSD10 katalyzuje, je dehydrogenace 17β-estradiolu na estron. 17β-estradiol reguluje zánětlivou reakci v mozku blokováním genové exprese prozánětlivých genů prostřednictvím estrogenových receptorů na astrocytech. Dalším neuroprotektivním účinkem 17β-estradiolu je regulace přenosu amyloidového prekurzorového proteinu (APP) z Golgiho aparátu do plazmatické membrány a regulování akumulace amyloidu-beta (Manthey & Behl, 2006; Porcu et al., 2016; Pozzi et al., 2006).

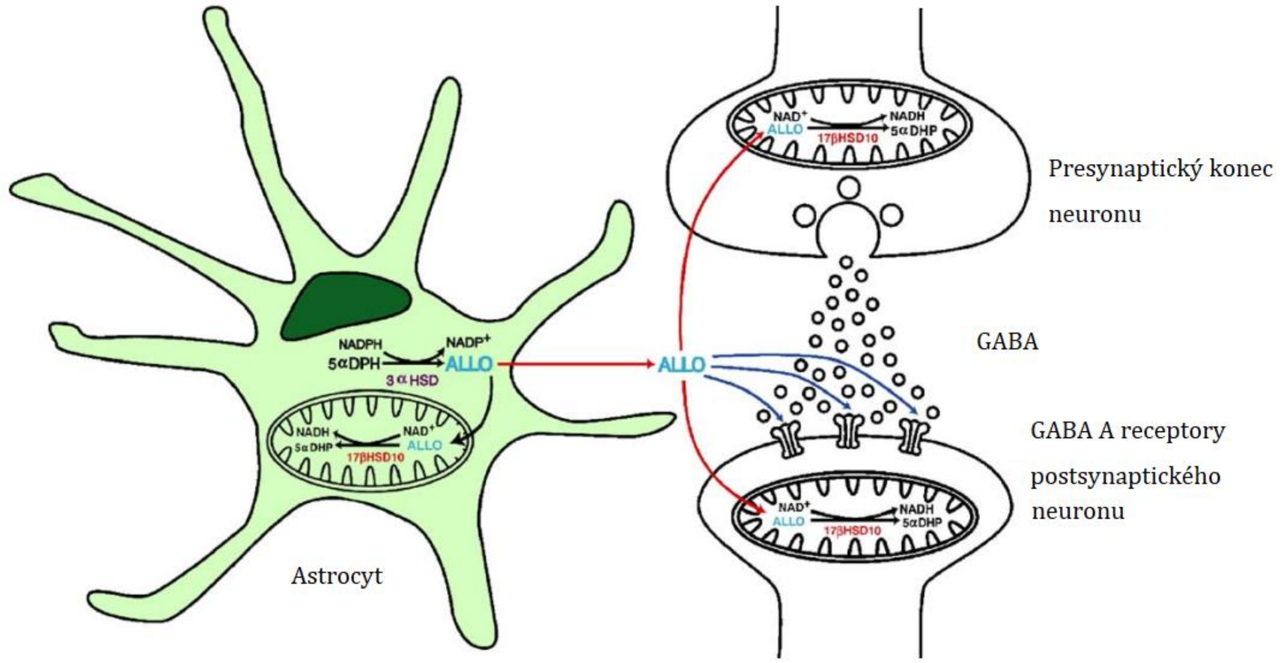
Enzym 17β-HSD10 je zapojen do mnoha dalších fyziologických funkcí. Zásadní je především pro fungování mitochondrií (Yang et al., 2009). Normální hladina enzymu 17β-HSD10 je nezbytná pro vývoj mozku a kognitivních funkcí (Yang et al., 2014). Nadměrná exprese 17β-HSD10 vede ke kondenzaci mitochondriální matrix a částečné ztrátě struktury krist (Shafqat et al., 2003). Poruchy exprese nebo funkce enzymu 17β-HSD10 vedou k narušení mitochondriální homeostázy (Yang et al., 2009). Buňky dětských pacientů s deficitem 17β-HSD10 vykazují rysy mitochondriálního onemocnění (García-Villoria et al., 2005) a vykazují anomální mitochondriální morfologii, - většina mitochondrií je zaoblená se zbytnělými kristami (Rauschenberger et al., 2010). Vyřazení (knockout) genu HSD17B10 v myším modelu vede k mitochondriální dysfunkci, apoptóze a úmrtí plodu v raných stádiích embryogeneze (Rauschenberger et al., 2010).

17β-HSD10 je konstitutivně exprimován v mozku plodu i dospělého jedince. Studie využívající western blotting na mozkovém homogenátu ze 63 spontánně potracených plodů odhalila, že lidský fetální mozek má přibližně čtyřikrát vyšší hladinu proteinu 17β-HSD10 ve srovnání s mozkem dospělého jedince (He et al., 2001). Enzym 17β-HSD10 je rozdílně distribuován v různých oblastech mozku. Hippokampus, hypotalamus a amygdala vykazují vyšší hladiny 17β-HSD10 než mícha a mozková kůra, které mají zároveň nejnižší hladinu tohoto enzymu.

Hladiny 17β-HSD10 v lidském mozku se tedy zdají být regionálně specifické, hojně se také 17β-HSD10 vyskytuje v aktivovaných astrocytech mozků pacientů s patologií Alzheimerova typu (He et al., 2005). Koncentrace 17β-HSD10 v mozkomíšním moku může odrážet jeho množství v mozku (Yang et al., 2014). Bylo publikováno, že koncentrace 17β-HSD10 v mozkomíšním moku klesá s věkem, přesto je v mozkomíšním moku pacientů s Alzheimerovou chorobou 5,7 krát více 17β-HSD10 než v kontrolní skupině odpovídajícího věku (Krištofiková et al., 2009).

Alopregnanolon (ALLO) je pozitivní alosterický modulátor receptorů kyseliny gama-aminomáselné typu A (GABA A) a má významný vliv na plasticitu receptoru GABA A (Hosie et al., 2006). ALLO je generován především z astrocytů (He et al., 2005). V metabolizmu ALLO hrají důležitou roli dva odlišné enzymy 3α-hydroxysteroiddehydrogenáza (3α-HSD) a 17β-HSD10 ve dvou různých buněčných kompartmentech (Obr. 4) (He et al., 2005). ALLO může být *de novo* syntetizován v centrálním nervovém systému redukcí progesteronu na 5α-dihydroprogesteron (5α-DHP) za katalýzy 5α-reduktázy. 5α-DHP nemá žádný účinek na receptory GABA A, ale může být dále redukován na ALLO oxidací NADPH za katalýzy 3α-HSD (Trauger et al., 2002) .

Bylo publikováno, že oxidace ALLO v mitochondriích probíhá za katalýzy 17β-HSD10, a ne 3α-HSD (He et al., 2005). ALLO je v mitochondriích oxidován na 5α-DHP pomocí enzymu 17β-HSD10. V mitochondriích také probíhá současně redukce kofaktoru NAD^+ na NADH (He et al., 2005). Katalytická aktivita 17β-HSD10 je tedy nezbytná pro udržení normálních funkcí GABAergních neuronů (He et al., 2000).



Obrázek č. 4: Úloha 17β-HSD10 v metabolismu alopregnanolonu (ALLO). ALLO je pozitivní steroidní modulátor receptorů GABA A, který potencuje GABA a zvyšuje otevírání Cl^- kanálů. ALLO je v cytosolu katalyticky generován z 5α-dihydroprogesteronu (5α-DHP) pomocí enzymu 3α-hydroxysteroiddehydrogenáza (3α-HSD). Kofaktorem reakce je NADPH/$NADP^+$. Následně je ALLO oxidován v mitochondriích na 5α-dihydroprogesteron (5α-DHP) pomocí enzymu 17β-HSD10. V mitochondriích také probíhá současně redukce kofaktoru NAD^+ na NADH (převzato a upraveno z He et al., 2005).

2.2 Role 17β-HSD10 při některých onemocněních

2.2.1 HSD10

S deficitem funkce 17β-HSD10 souvisí mitochondriální onemocnění označované jako HSD10 (17β-hydroxysteroiddehydrogenase deficiency type 10) nebo také X-vázaná mentální retardace (MRXS10) (Lenski et al., 2007). HSD10 představuje vrozené genetické onemocnění, které představuje multifaktoriální poruchu způsobenou mutacemi v genu HSD17B10 (viz dále). Ty vedou k narušení mnoha metabolických drah katalyzovaných enzymem 17β-HSD10 (Lenski et al., 2007; Zschocke, 2012; Zschocke et al., 2000). V literatuře bylo popsáno několik mutací tohoto genu (Akagawa et al., 2017; Cazorla et al., 2007; Ensenauer et al., 2002; Falk et al., 2016; Fukao et al., 2014; García-Villoria et al., 2010; Lenski et al., 2007; Olpin

et al., 2002; Perez-Cerda & Ribes, 2006; Poll-The et al., 2004; Rauschenberger et al., 2010; Richardson et al., 2017; Sass et al., 2004; Seaver et al., 2011; Sutton et al.,2003; Waters et al., 2019; Zschocke, 2012; Zschocke et al., 2000). Přibližně polovina případů je způsobena mutací, c.388C>T (p.R130C) (Yang et al., 2014). Mezi další mutace patří c.745G>C (p.E249Q)(Olpin et al., 2002), c.364C>G (p.L122V) (Poll-The et al., 2004), c.740A>G (p.K247R)(Perez-Cerda & Ribes, 2006), c.470C>T (p.A157V)(Akagawa et al., 2017), c. 388C>T (p.R130W)(Cazorla et al., 2007), c.574C>A (p.Q192T)(Lenski et al., 2007), c.740A>G (p.N247S)(García-Villoria et al., 2010), c.495A>C (p.Q165H), c.257A>G (p.D86G)(Rauschenberger et al., 2010), c.194T>C (p.V65A)(Seaver et al., 2011), c.460G>A (p.A154T)(Fukao et al., 2014), c.634A>G (p.K212E)(Falk et al., 2016), c.194T>C (p.V65A)(Richardson et al., 2017) a c.364C>G (p.L122V)(Waters et al., 2019).

HSD10 onemocnění se nejčastěji projevuje jako neurodegenerativní porucha vázaná na X chromozom, závažnost onemocnění bývá často proměnlivá. Diagnostikování nemoci probíhá nejčastěji v době od počátku novorozeneckého období do raného dětství postiženého jedince. Mezi typické příznaky náleží mentální retardace vázaná na chromozom X, kardiomyopatie (postižení srdečního svalu), choreoatetóza (občasné, mimovolné, nekontrolovatelné záškuby svalů), abnormální chování a neurodegenerace (Lenski et al., 2007; Rauschenberger et al., 2010; Zschocke, 2012; Zschocke et al., 2000). Pacienti trpící deficitem 17β-HSD10 mají blokovanou degradaci isoleucinu, proto jsou zvýšené hladiny metabolitů isoleucinu v krvi a jejich vylučování močí klinickým znakem onemocněním HSD10 (Yang et al., 2009). Dalším znakem onemocnění HSD10 jsou také zvýšené hladiny 2-methyl-3-hydroxybutyrátu a tiglylglycinu v moči (Korman, 2006), ovšem akumulace tiglylglycinu a 2-methyl-3-hydroxybutyrátu v moči je pouze patofyziologickým pozadím tohoto onemocnění (Yang et al., 2009).

Pacienti s tímto onemocněním jsou obvykle rozděleni do čtyř skupin: novorozenecká forma, infantilní forma, juvenilní forma a atypická prezentace (Zschocke, 2012). Klinický fenotyp pacientů s onemocněním HSD10 je variabilní a závisí na přesné genové mutaci. Některé mutace tak ovlivňují pouze enzymatickou aktivitu, zatímco jiné způsobují nestabilitu proteinové struktury, obojí má za následek široké spektrum příznaků (Vilardo & Rossmanith, 2015). Někteří

postižení chlapci mají těžkou infantilní formu spojenou s kardiomyopatií, která může vést k úmrtí v raném dětství, zatímco jiní vzácní pacienti mohou mít juvenilní nástup nebo dokonce atypické projevy s normálním neurologickým vývojem. U těžce postižených chlapců se v raném až pozdějším dětství projevuje vývojová regrese, která je často spojena s neléčitelnými záchvaty s časným nástupem, progresivní choreoatetózou a spastickou tetraplegií (křečovité postižení všech čtyř končetin), atrofií zrakového nervu, nebo degenerací sítnice vedoucí ke ztrátě zraku a mentální retardací. Heterozygotní ženy mohou vykazovat nepostupující vývojové zpoždění a mentální postižení, ale mohou být také klinicky normální (Lenski et al., 2007; Rauschenberger et al., 2010; Zschocke, 2012; Zschocke et al., 2000). Doposud neexistuje účinná léčba tohoto onemocnění (Zschocke, 2012). Vzhledem k tomu, že se patogeneze onemocnění jeví jako nezávislá na úloze enzymu v metabolismu isoleucinu, není překvapivé, že dietní omezení nezlepšuje progresi symptomů (Ofman et al., 2003).

2.2.2 Rakovina

Enzym 17β-HSD10 hraje ochrannou roli v buňkách vystavených stresovým faktorům. Nadměrná exprese 17β-HSD10 v rakovinných buňkách přispívá k udržení homeostázy za nepříznivých podmínek, a tak chrání buňky před buněčnou smrtí (He et al., 2003). Nadměrná exprese 17β-HSD10 je například pozorována u některých typů rakoviny kostí (Carlson et al., 2015). Také epiteliální buňky prostaty pacientů trpících některými typy rakoviny prostaty vykazují větší množství 17β-HSD10 oproti normálním prostatickým epiteliálním buňkám (He et al., 2003). V buňkách feochromocytomu (vzácný neuroendokrinní nádor) vede nadměrná exprese 17β-HSD10 ke zvýšené buněčné proliferaci jak *in vitro*, tak *in vivo*. Vyšší exprese 17β-HSD10 také ovlivňuje aktivitu dýchacího řetězce a syntézu ATP, čímž podporuje dělení buněk a činí buňky odolnější vůči oxidativnímu stresu. Podpora dýchacího řetězce, syntézy ATP a buněčného dělení napomáhá agresivitě rakovinných buněk a procesu tumorigeneze. Nadměrná exprese 17β-HSD10 má negativní vliv na vývoj onemocnění a vysoké hladiny 17β-HSD10 jsou spojovány se špatnou prognózou těchto pacientů (Carlson et al., 2015).

U rakoviny prostaty umožňuje 17β-HSD10 syntézu steroidů a katalyzuje alternativní cestu syntézy androgenu generováním dihydrotestosteronu v nepřítomnosti testosteronu (Ayan et al., 2012). Hladina exprese 17β-HSD10 je možným prediktivním markerem odpovědi na chemoterapii u pacientů trpících osteosarkomem. Podobně je tomu i u kolorektálního karcinomu, kdy je vysoká exprese 17β-HSD10 spojena s lepším celkovým přežitím. Na základě těchto zjištění je 17β-HSD10 považován za potenciální terapeutický cíl pro určité typy rakoviny. Úloha 17β-HSD10 u nádorových onemocnění je však ještě nedostatečně prozkoumána a je třeba provést další studie, aby bylo možné lépe pochopit jeho role v nádorové transformaci (Amberger et al., 2016; Ayan et al., 2012; He et al., 2001).

2.2.3 Neurodegenerativní poruchy

Úloha neurosteroidů při neurodegenerativních poruchách je zásadní. Neuroaktivní steroidy jako jsou například estrogeny, pregnany a androstany jsou molekuly produkované endogenně v těle, a to především v mozku a vykazují celou řadu fyziologických funkcí. Tyto molekuly jsou schopné mimo jiné modulovat funkce centrálního nervového systému, a i periferního nervstva prostřednictvím interakce s receptory GABA A, přičemž mohou vykazovat neuroprotektivní a antiapoptotické účinky. Hladiny neuroaktivních steroidů se mění během života v závislosti na mnoha fyziologických podmínkách, jako například menstruační cyklus, těhotenství nebo stres (Porcu et al., 2016).

Napříč chorobnými stavy mohou mít zvýšené hladiny 17β-HSD10 hluboký a různorodý dopad (Carlson et al., 2015). Existují studie popisující významně zvýšené množství enzymu 17β-HSD10 v mozcích jedinců trpících Alzheimerovou chorobou, které je věnována samostatná kapitola (He et al., 2005) a na myším modelu Alzheimerovy choroby (He et al., 2002). Bylo také popsáno, že hladiny 17β-HSD10 jsou zvýšené v mozcích jedinců s roztroušenou sklerózou (Krištofiková et al., 2009) a jsou sníženy v mozcích myšího modelu Parkinsonovy choroby (Tieu et al., 2004). Terapeutické zvýšení hladiny enzymu17β-HSD10 muže tedy být prospěšné při Parkinsonově chorobě, u Alzheimerovy choroby se naopak nabízí jeho snížení (Carlson et al., 2015; Silbernagl & Lang, 2001).

2.3 Alzheimerova choroba

V roce 1907 Alois Alzheimer popsal v článku „Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde“ („O neobvyklé nemoci mozkové kůry“) neobvyklý případ 51 letého pacienta, který trpěl ztrátou paměti, dezorientací, halucinacemi a kognitivními poruchami. Po smrti pacienta jeho pitva prokázala atrofický mozek s „nápadnými změnami neurofibril“ způsobenými „ukládáním speciální látky do kůry“ (Stelzmann et al., 1995). O století později se tato „neobvyklá nemoc“ s názvem Alzheimerova choroba stala nejrozšířenějším neurodegenerativním onemocněním, jehož etiologie je stále neznámá (Goedert & Spillantini, 2006).

Alzheimerova choroba je nevratná neurodegenerativní, progresivní porucha, při které mozkové buňky postupně odumírají, což vede zvláště ke ztrátě kognitivních funkcí (Prince et al., 2015). Právě zhoršování kognitivních funkcí může být spojeno s významným snížením objemu mozku u pacientů s Alzheimerovou chorobou ve srovnání se zdravými pacienty (Mattson, 2004). Kromě snížení objemu mozku je jedním z charakteristických znaků Alzheimerovy choroby přítomnost amyloidních plaků v mozku, způsobených „ukládáním speciální látky v kůře“, jak poprvé popsal Alois Alzheimer. Tyto amyloidní (senilní) plaky se nacházejí v extracelulárním prostoru mozku pacienta trpícího Alzheimerovou chorobou, a zvláště jsou přítomny v oblasti hippocampu. Jsou složeny hlavně z peptidu s názvem amyloid-beta, který je agregovaný a tvoří většinou fibrily (Glenner & Wong, 1984). Dalším charakteristickým znakem onemocnění je přítomnost intracelulárních neurofibrilárních klubek v mozku (Minati et al., 2009), pozorovaných také u Parkinsonovy choroby (Goedert, 2015), složených z hyperfosforylovaného proteinu Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986). Všechny tyto patologické projevy souvisí s hypotézami příčin vzniku Alzheimerovy choroby a jsou detailně popsány v následujících kapitolách.

S patogenezí Alzheimerovy choroby souvisí i enviromentální rizikové faktory, mezi které patří věk, kognitivní rezerva (schopnost mozku vyrovnat se s poškozením způsobeným některými druhy onemocnění nebo normálním stárnutím), fyzická aktivita, kouření, obezita, diabetes a intrakraniální ateroskleróza (Taipa et al., 2012). Věk je nejvyšším rizikovým faktorem pro Alzheimerovu chorobu, riziko rozvoje onemocnění dosahuje 50 % u jedinců starších 85 let

(Duthey, 2013). Ženy jsou náchylnější k Alzheimerově chorobě než muži, protože mají vyšší očekávanou délku života, a protože pokles hladin estrogenu v důsledku menopauzy by mohl zvýšit riziko rozvoje Alzheimerovy choroby (Janicki & Schupf, 2010).

Mezi projevy Alzheimerovy choroby patří výpadky paměti, zúžení slovní zásoby a výpadky slov, poruchy koordinace, poruchy orientace v prostoru a časová dezorientace (Edell & Tunis, 2001). Dalšími nekognitivními symptomy jsou bludy (Flynn et al., 1991) a halucinace (Gilley et al., 1991). Pokročilá stádia nemoci jsou spojená s neadekvátním jednáním, až agresivitou, poruchami nálad a poškozením kognitivních funkcí (Loreck et al., 1994). V posledním stádiu nemoci může být pacient upoután na lůžko a závislý na péči ošetřovatelů a zdravotního personálu. Pacienti nebývají schopni komunikace, a také potřebují inkontinenční pomůcky. Tyto patologické jevy vedou k smrti pacienta (McKhann et al., 1984).

2.3.1 Amyloidová kaskádová hypotéza

Podrobnosti o této hypotéze budou podrobněji popsány v dalších kapitolách této diplomové práce. Ve stručnosti tato hypotéza říká, že mezi hlavní patologické rysy Alzheimerovy choroby patří akumulace amyloid-beta peptidů v různých částech mozku pacienta. Tato akumulace je spouštěčem patologické kaskády, která vede k následné tvorbě amyloidních plaků a intraneuronálních neurofibrilárních klubek. Tato kaskáda má za důsledek neurodegeneraci a demenci (Hardy & Higgins, 1992). Následné výzkumy podporují roli amyloid-beta peptidu jako primárního iniciátoru komplexní patogenní kaskády u Alzheimerovy choroby a stále více důkazů ukazuje, že amyloid-beta působí jako spouštěč v časném procesu onemocnění (Musiek & Holtzman, 2015). O tvorbě amyloidu-beta, jeho interakci a akumulaci a souvislosti s Alzheimerovou chorobou bude více psáno v kapitolách 2.3.6 Amyloidový prekurzorový protein (APP), 2.3.7 Amyloid-beta peptid a 2.3.8 Alzheimerova choroba a akumulace amyloid-beta peptidu.

2.3.2 Tau hypotéza

Neurofibrilární klubka jsou dalším intracelulárním charakteristickým znakem Alzheimerovy choroby, a právě tato klubka se skládají z proteinu tau (Trojanowski & Mattson, 2003). Tau je protein nacházející se především v mozku, a je členem skupiny proteinů asociovaných s mikrotubuly (Tucker, 1990). Tau funguje jako lešení pro proteiny při tvorbě stabilizační sítě mikrotubulů v neuronech (Lee et al., 1989).

V dospělém lidském mozku je exprimováno šest izoforem proteinu tau jako výsledek alternativního sestřihu mRNA, a to v závislosti na tom zda obsahují nebo neobsahují exony 2, 3 a 10 (Goedert et al., 1989). Exon 10 obsahuje oblast vázající mikrotubuly. Inzerce exonu 10 poskytuje čtyři opakující se (4R) izoformy proteinu tau, zatímco tři opakující se (3R) izoformy proteinu tau jsou produkovány bez exonu 10. Mozek dospělého člověka exprimuje izoformy 3R i 4R proteinu tau, které se za normálních fyziologických podmínek nacházejí hlavně v axonech dospělých neuronů (Connell et al., 2005). V mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou se 3R a 4R tau protein akumuluje v hyperfosforylovaném stavu v patologických inkluzích (Goedert, 1993). Hyperfosforylovaný protein tau je náchylnější k agregaci a je snížena jeho afinita k mikrotubulům (Mazanetz & Fischer, 2007). Za patologických stavů agregace tau poškodí axony neuronů, způsobí synaptickou dysfunkci a neurodegeneraci (Roy et al., 2005).

2.3.3 Cholinergní hypotéza

Acetylcholin je důležitý neurotransmiter používaný cholinergními neurony, který se účastní zásadních fyziologických procesů, jako je pozornost, učení (Fine et al., 1997), paměť (Haam & Yakel, 2017; Hasselmo et al., 1992), reakce na stres, bdění a spánek a senzorické informace (Sarter & Bruno, 1997). Poškození cholinergních neuronů a ztráta cholinergní aktivity byly považovány za kritickou patologickou změnu, která korelovala s kognitivní poruchou pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (Martin et al., 2013).

Cholinergní hypotéza byla při léčbě Alzheimerovy choroby nejprve testována s inhibitory cholinesterázy (Summers et al., 1981). Takrin, (9-amino-1,2,3,4-

tetrahydro akridin) inhibitor cholinesterázy, byl prvním klinicky dostupným lékem proti Alzheimerově chorobě (Brinkman & Gershon, 1983) jehož užívání bylo zastaveno v roce 1996 a následovalo jeho stažení z trhu, kvůli závažným vedlejším hepatotoxickým účinkům (Balson et al., 1995). I když je inhibice cholinesterázy symptomatickou úlevovou léčbou s marginálními přínosy, je v současnosti nejdostupnější klinickou léčbou, která dává zoufalým pacientům s Alzheimerovou chorobou záblesk naděje (Du et al., 2018).

2.3.4 Hypotéza oxidačního stresu

Oxidační stres je považován za důležitý faktor v patogenezi Alzheimerovy choroby (Sultana & Butterfield, 2008). Mozek využívá více kyslíku než jiné tkáně, což zvyšuje potenciální expozici reaktivním formám kyslíku (Cheignon et al., 2018). Ve skutečnosti je Alzheimerova choroba vysoce spojena s buněčným oxidačním stresem, včetně zvýšené oxidace a nitrace proteinů a glykoloxidace a peroxidace lipidů (Butterfield & Lauderback, 2002). Akumulace amyloidu-beta může také vyvolat oxidační stres (Butterfield et al., 2007). Ošetření antioxidačními sloučeninami tedy teoreticky poskytne ochranu proti oxidačnímu stresu a toxicitě amyloidu-beta (Teixeira et al., 2013). Oxidační stres je však pouze jedním z rysů Alzheimerovy choroby, a proto je ošetření antioxidačními sloučeninami navrženo jako součást kombinované terapie (Persson et al., 2014).

2.3.5 Hypotéza zánětu

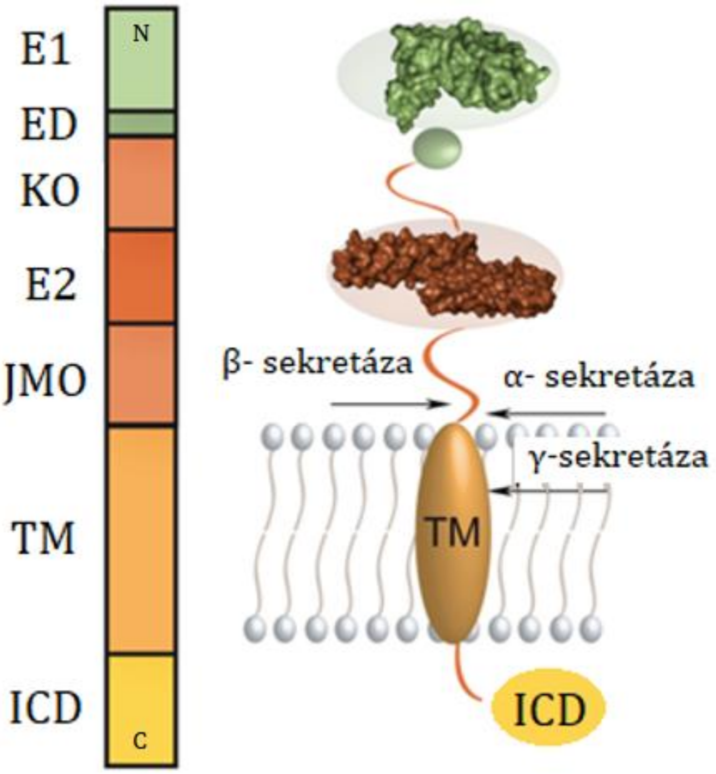
Reaktivní glióza a neurozánět jsou dalšími charakteristickými znaky Alzheimerovy choroby (Bolós et al., 2017). Byla publikována genetická studie, která identifikovala vzácné varianty genu, který kóduje spouštěcí receptor exprimovaný na myeloidních buňkách 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2 – TREM2) Tento imunitní receptor, který se nachází v mozkových mikrogliích byl publikován jako rizikový faktor pro nefamiliární Alzheimerovu chorobu (Colonna & Wang, 2016). Stále více důkazů ukazuje, že mikroglie se objevují jako hlavní hráči při Alzheimerově chorobě (Hong et al., 2016). Deficity ve funkci mikroglií mohou

přispívat k synaptickým abnormalitám pozorovaným u některých neurodegenerativních poruch (Paolicelli et al., 2011).

2.3.6 Amyloidový prekurzorový protein (APP)

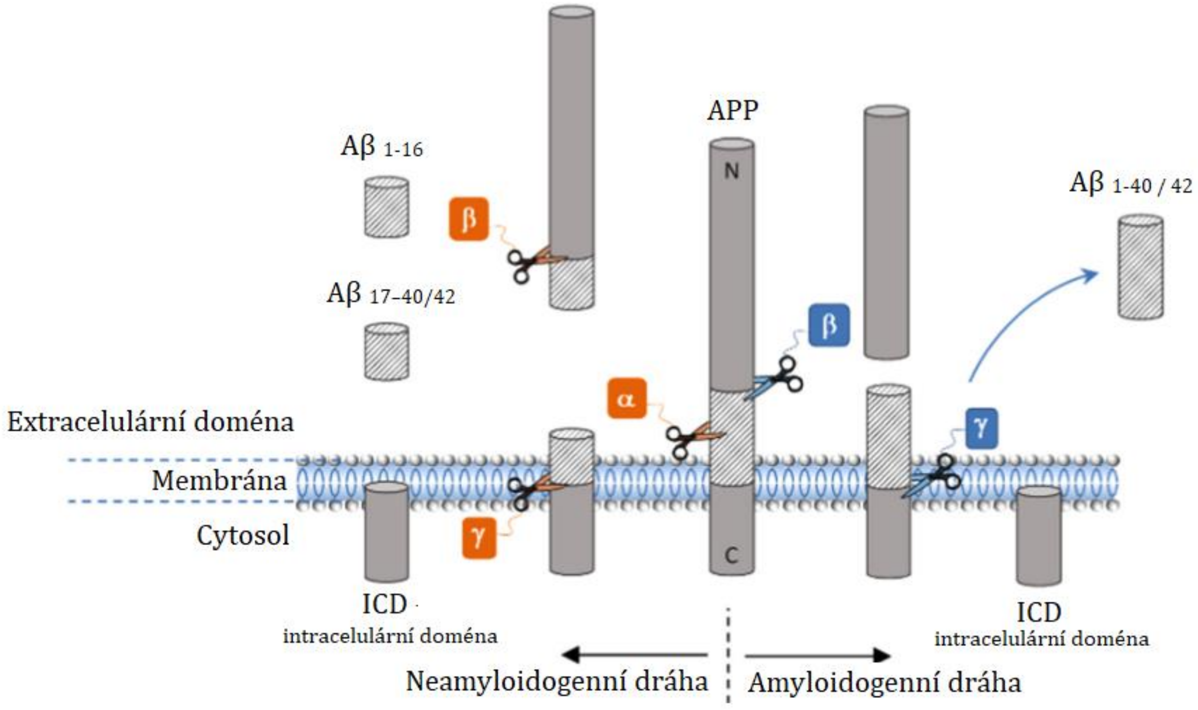
APP je integrální membránový protein, který je syntetizován v endoplazmatickém retikulu, poté transportován do Golgiho aparátu, a následně do plazmatické membrány, kde je postupně štěpen (Chen et al., 2017). Je to jeden ze tří členů větší genové rodiny přítomné v lidském genomu. Dalšími dvěma členy rodiny jsou proteiny strukturně a sekvenčně podobné APP (APLP) APLP1 a APLP2 (Chen et al., 2017; Coulson et al., 2000). Fyziologická role APP spočívá v regulaci vytváření synapsí a jejich dynamiky, anterográdního neuronálního transportu a exportu železa. APP vzniká v několika různých izoformách o velikosti od 695 do 770 aminokyselin. Nejhojnější izoforma APP 695 je exprimována především v neuronech, zatímco APP 751 a APP 770 jsou exprimovány především v periferních nervových buňkách a krevních destičkách (Chen et al., 2017; Guerreiro et al., 2012; Hardy, 1997). APP 751 a APP 770 obsahují další proteinové segmenty (oblast domény inhibitoru proteázy Kunitzova typu (Heald et al., 1991) a antigen MRC OX-2 mezi kyselou oblastí a doménou E2 (Konig et al., 1992).

APP 695 (Obr. 5) se skládá z transmembránové oblasti oddělující velkou NH_2-terminální extracelulární ektodoménu od mnohem menší COOH-terminální cytoplazmatické endodomény (Coburger et al., 2013; Daigle & Li, 1993; Wang & Ha, 2004). NH_2-terminální extracelulární ektodoména se skládá ze stabilních domén E1 (Leul8-Ala190) a E2 (Ser295-Asp500). Doména E1 je tvořena těsnou interakcí domény vázající měď a domény podobné růstovému faktoru, E2 je centrální doménou APP. Kyselá oblast spojující E1 a E2 je stejně flexibilní jako juxtamembránová oblast spojující E2 s transmembránovým helixem, ukotvujícím APP v plazmatické membráně. Na vnitřní straně plazmatické membrány se nachází C-terminální konec intracelulární domény (Coburger et al., 2013).



Obrázek č. 5: Celková struktura APP: Ektodoména APP 695 se skládá ze dvou složených domén: doména E1- (Leu18-Ala190) a E2 (Ser295-Asp500). Kyselá oblast (KO) mezi oběma doménami je stejně flexibilní jako juxtamembránová oblast (JMO). Domény E1 a E2 spolu těsně neinteragují, což vede k rozšíření celkové konformace. Toto rozšíření (oblast ED, Glu191-Glu227) se nachází mezi E1 a kyselou oblastí jako další částečná struktura. E2 je centrální doménou APP. Transmembránový helix (TM) je část APP procházející plazmatickou membránou a oddělující ektodoménu od endodomény (ICD – intracelulární doména). Šipky ukazují místa, kde je APP štěpen α-, β- a γ-sekretázou (převzato a upraveno z Coburger et al., 2013).

Lidský APP je zpracováván (proteolyticky štěpen) dvěma alternativními cestami (Obr. 6) – amyloidogenní a neamyloidogenní. V neamyloidogenní dráze probíhá postupné štěpení APP membránově vázanými α-sekretázami, poté γ-sekretázou nebo β-sekretázou a v amyloidogenní dráze probíhá štěpení APP působením membránově vázaných β- a γ-sekretáz, což vede k tvorbě amyloid-beta peptidů (Cheignon et al., 2018; G. F. Chen et al., 2017; Haass et al., 1995).

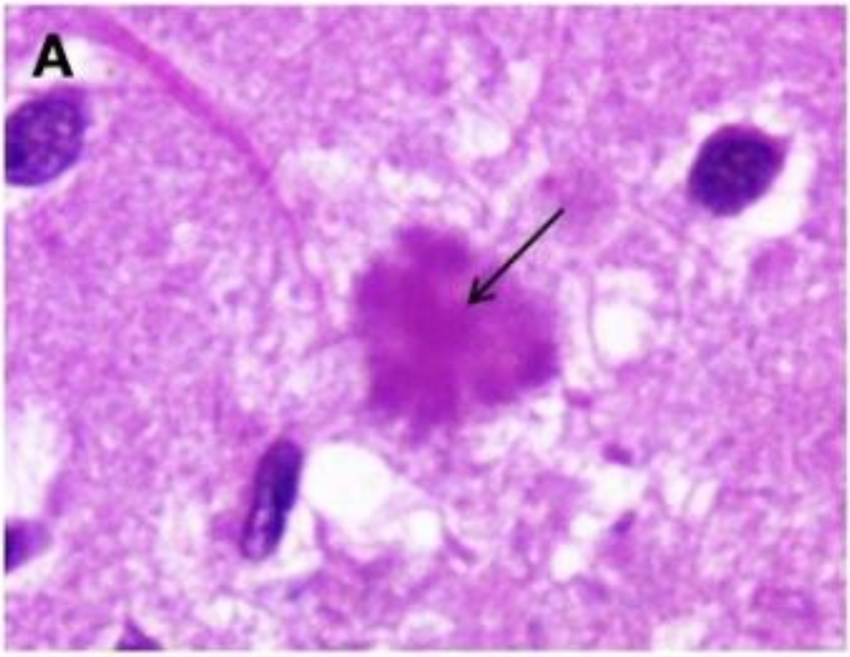


Obrázek č. 6: Schematický pohled na proteolytické štěpení APP. V neamyloidogenní dráze se APP nejprve štěpí α-sekretázou a poté γ-sekretázou za vzniku zkrácených amyloid-beta peptidů (Aβ $_{17–40/42}$) nebo β-sekretázou, což vede k tvorbě zkráceného amyloid-beta peptidu (Aβ $_{1-16}$). V amyloidogenní dráze se APP štěpí postupně β- a γ-sekretázami, což vede k tvorbě amyloid-beta peptidů (Aβ $_{1-40\,/\,42}$) plné délky (převzato a upraveno z Cheignon et al., 2018).

2.3.7 Amyloid-beta peptid

Amyloid-beta peptid je peptid skládající se z 38 až 43 aminokyselinových zbytků (Cheignon et al., 2018), který vzniká proteolytickým štěpením APP (Chen et al., 2017). Sekvence primárních aminokyselin amyloidu-beta byla poprvé objevena v extracelulárních depozitech amyloidních plaků v roce 1984 (Glenner & Wong, 1984). Nejvíce informací o struktuře amyloidu-beta pochází z nukleární magnetické rezonance, další důležité informace podávají metody studia molekulární dynamiky. Obecně se předpokládá, že amyloid-beta je vnitřně nestrukturovaný, a proto jej nelze běžnými metodami krystalizovat (Chen et al., 2017).

Nově vzniklý amyloid-beta je buď uvolňován do extracelulárního prostoru, nebo zůstává spojen se strukturami plazmatické membrány (Chen et al., 2017). Akumulace amyloidu-beta v mozku je považována za časnou toxickou událost v patogenezi Alzheimerovy choroby. Vznik Alzheimerovy choroby je spojen se vznikem amyloidních (senilních) plaků, resp. akumulací amyloid beta peptidu do extracelulární léze (průměru 10-200 μm) v mozku (Obr. 7), převážně v mozkové kůře.



Obrázek č. 7: Metoda barvení hematoxylin–eosin zvýrazňuje senilní plaky v mozkovém parenchymu při Alzheimerově chorobě, šipka znázorňuje amyloidní jádro klubíčka senilního plaku. Zvětšení 400× (převzato a upraveno z Taipa et al., 2012).

Monomery amyloidu-beta agregují do různých forem oligomerů, které pak mohou tvořit pravidelné fibrily a senilní plaky (Glenner & Wong, 1984; Haass et al., 1995). Amyloidní oligomery jsou rozpustné a mají schopnost se šířit po celém mozku (Chen et al., 2017). Bylo zjištěno, že oligomery amyloidu-beta indukují mitochondriální dysfunkci a oxidační stres v neuronech pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. Mitochondriální dysfunkce vede k tak masivnímu zvýšení

cytosolické koncentrace vápenatých iontů v neuronech, až se stává pro buňky toxickou (Ahmed et al., 2010). Výzkumy posledních dvou desetiletí naznačují, že oligomerní nebo prefibrilární formy amyloidu-beta jsou pro neuronální buňky nejvíce škodlivé. Rozpustný amyloid-beta se může vázat na mnohé molekuly v extracelulárním prostoru, a také na membránové receptory (Chen et al., 2017).

Distribuce a velikost oligomerů je heterogenní, o jejich struktuře je toho známo relativně málo. Rovněž není známo, zda oligomerní struktury představují základní jednotky amyloidního proteinu, které se poté skládají do fibril, nebo jsou jen v rovnováze s monomery, které přímo tvoří fibrily bez přechodné oligomerní struktury (Chen et al., 2017; Masliah et al., 1991; Terry et al., 1991).

Amyloidní fibrily jsou větší, nerozpustné a mohou se dále skládat do amyloidních plaků tvořících histologické léze (Glenner & Wong, 1984). Amyloidní fibrily vykazují neurotoxicitu vedoucí k buněčné smrti, z toho vyplývající ztrátě paměti a dalším charakteristickým příznakům Alzheimerovy choroby (Chen et al., 2017). Přítomnost fibril je také jedním z hlavních biomarkerů pro diagnostiku Alzheimerovy choroby (Glenner & Wong, 1984; Haass et al., 1995) .

2.3.8 Alzheimerova choroba a akumulace amyloid-beta peptidu

Neuronální buňky pacientů trpících Alzheimerovou chorobou jsou vysoce závislé na produkci mitochondriální energie a náchylné k mitochondriální dysfunkci (Moreira et al., 2009). Mitochondrie jako hlavní producenti energie hrají ústřední roli v patologii Alzheimerovy choroby a jejich špatná funkce má vliv na poškození neuronů vyvolaných peptidem amyloid-beta (Chen & Yan, 2010). Akumulace intramitochondriálního amyloidu-beta byla popsána u transgenních myší s Alzheimerovou chorobou (Du et al., 2010) a také v mozku lidských pacientů trpících touto nemocí (Cha et al., 2012). Amyloid-beta může také uvnitř mitochondrií ovlivňovat transport molekul mitochondriálními membránami a dýchacím řetězcem (Audano et al., 2018; Chen & Yan, 2010). Do mitochondrií může být amyloid-beta importován buď translokázami vnější membrány (Hansson Petersen et al., 2008), mitochondriálními receptory pro konečné produkty pokročilé glykace (Takuma et al., 2009), nebo lokálně odštěpeny z APP mitochondriální γ-

sekretázou (Pavlov et al., 2011). Intramitochondriální amyloid-beta je degradován pitrilysin metalopeptidázou 1 jejíž aktivita je snížena v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou i na myších modelech této nemoci (Alikhani et al., 2011). Důležité je, že aktivace mitochondriálního odbourávání amyloidu-beta probíhá zvýšenou neuronální expresí pitrilysin metalopeptidázy 1. Tato aktivace v myším modelu Alzheimerovi choroby zlepšila oxidační stres, neurozánět, synaptickou funkci, paměť a učení (Fang et al., 2015).

Mitochondriální dysfunkce, poškození neuronů a neuronální smrt také podporuje toxický komplex 17β-HSD10-amyloid-beta vzniklý navázáním amyloidu-beta na enzym 17β-HSD10 (Lustbader et al., 2004; Yan et al., 1999). Přesné mechanismy neurotoxicity amyloidu-beta nejsou zcela známy (Kissinger et al., 2004). Zvýšená hladina 17β-HSD10 při Alzheimerově chorobě může být přirozeným mechanismem k obnovení úrovně aktivity tohoto enzymu snížené jeho vazbou na intracelulární amyloid-beta (Yang et al., 2011).

2.3.9 Vazba 17β – HSD10 na amyloid-beta

Enzym 17β-HSD10 byl jako vazebný partner amyloidu-beta poprvé identifikován v roce 1997 pomocí kvasinkového dvouhybridního screeningu s využitím cDNA buněčné linie HeLa (Yan et al., 1997). Je známo, že vazebným místem amyloidu-beta je oblast aminokyselinových zbytků, označovaná jako LD. Bodové mutace v oblasti LD (konkrétně u aminokyselinových zbytků 98–101 a 108–110) brání vazbě amyloidu-beta na enzym. Oblast LD je v rámci rodiny enzymů SDR jedinečná, a tím pádem činí 17β-HSD10 jediným enzymem z rodiny SDR, na který je schopen se navázat na amyloid-beta. Vazba mezi amyloidem-beta a 17β-HSD10 je tvořena prostřednictvím hydrofobních interakcí a působí sterické změny v oblasti vazebného místa pro kofaktor NAD^+ (Lustbader et al., 2004).

Navázáním amyloidu-beta na enzym 17β-HSD10 je blokována jeho enzymatická funkce. Enzym s navázaným kofaktorem NAD^+ s amyloidem-beta nijak neinteraguje. Přesto, že se amyloid-beta a kofaktor NAD^+ vážou na různá místa enzymu 17β-HSD10, je jejich současná vazba na enzym vyloučená (Lustbader et al.,

2004; Yan et al., 2007). Při navázání amyloidu-beta na enzym dochází k jeho inhibici pro substrát acetoacetyl-CoA (Oppermann et al., 1999).

Enzym 17β-HSD10 má schopnost degradovat toxické aldehydy, ale při vazbě amyloidu-beta potenciálně mění svoji substrátovou specificitu. Aldehydy vytvořené z mozkových lipidů nelze detoxikovat, a proto poškozují a zabíjejí neurony (Lustbader et al., 2004; Yan et al., 1999). Kromě toho interakce 17β-HSD10 s amyloidem-beta vede ke změně hladiny exprese jiných proteinů, jako je zvýšení peroxiredoxinu II (antioxidační enzym řídící hladiny peroxidů v buňkách a chránící neurony před toxickými hladinami amyloidu-beta)(Yao et al., 2007) a endofilinu AI (protein hrající roli při tvorbě vezikul lokalizovaný v cytoplazmě, přítomen v presynaptických nervových zakončeních)(Ren et al., 2008). Zvýšená hladina peroxiredoxinu II u Alzheimerovy choroby je pravděpodobně kompenzačním mechanismem neuronů, které se pokoušejí chránit před toxickými účinky amyloidu-beta (Yao et al., 2007). Zvýšená hladina endofilinu AI vede k narušení synaptické aktivity a zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), což dále přispívá k mitochondriální dysfunkci a poklesu kognitivních funkcí (Ren et al., 2008). Oba tyto proteiny mohou sloužit jako indikátory interakce 17β-HSD10 – amyloid-beta, protože jejich hladiny se po porušení této toxické interakce vrátí na fyziologické úrovně. Narušení vazby 17β-HSD10 – amyloid-beta a obnovení fyziologické úrovně 17β-HSD10 nebo inhibice nadměrně exprimovaného enzymu by mohly vést k opětovnému nastolení homeostázy (Ren et al., 2008; Yao et al., 2007). Byl také prokázán protektivní vliv estradiolu vůči toxickým účinkům amyloidu-beta, preventivní podávání estradiolu snižuje riziko onemocnění Alzheimerovou chorobou (Dye et al., 2012)

Byl publikován experiment se syntetizovaným 17β-HSD10-„návnadovým“ (bait) peptidem, jehož aminokyselinová sekvence zahrnovala aminokyselinové zbytky oblasti LD. Cílem experimentu bylo zjistit, zda 17β-HSD10-„návnadový“ peptid tvoří vazbu s amyloidem-beta a tím ochrání enzym 17β-HSD10. Buněčné linie byly vystaveny působení amyloidu-beta, přidáním 17β-HSD10-„návnadového“ peptidu byla snížena tvorba volných radikálů a uvolňování cytochromu c z mitochondrií a tím došlo ke zvýšení celkové životaschopnosti buněk (Lustbader et al., 2004). Byla provedena studie léčby Alzheimerovy choroby na zvířecím modelu.

Cílem studie byla systémová léčba Alzheimerovy choroby pomocí 17β-HSD10-„návnadového“ peptidu. Pokusná skupina vykazovala zlepšení kognitivních funkcí v porovnání s kontrolní neléčenou skupinou (Yao et al., 2011). Následná studie prokázala, že 17β-HSD10-„návnadový“ peptid není vhodný pro běžnou léčbu z důvodu jeho malé dostupnosti po perorálním podání. Další nevýhodou je nízká stabilita peptidu v organismu (Yao et al., 2011).

Nalezení potencionálních cílů léčby Alzheimerovy choroby je prací mnoha výzkumných skupin, které se snaží nalézt nízkomolekulární látky schopné inhibovat interakci 17β-HSD10 a amyloidem-beta. Mezi prvními publikovanými výsledky jsou studie z roku 2006 (Xie et al., 2006).

Otázkou zůstává, zda se amyloid-beta peptid podílí na infantilní formě neurodegenerativního deficitu 17β-HSD10 (Yang et al., 2014). Bylo publikováno, že amyloid-beta peptid je nedetekovatelný v mozkomíšním moku jedince s deficitem 17β-HSD10 (nemoc HSD10) (Ortez et al., 2011). Pokud by se toto pozorování potvrdilo u dalších postižených jedinců, znamenalo by to, že missense mutace (mutace měnící smysl, mutace v genetickém kódu, jejímž důsledkem je změna struktury polypeptidového vlákna určitého proteinu) v genu HSD17B10 by mohla změnit metabolismus nebo transport APP. Studie efektu absence nebo sníženého množství 17β-HSD10 mohou vést k novým cestám léčby Alzheimerovy choroby (Yang et al., 2014).

3. Cíl práce

Cílem této práce byla charakterizace dvou mutantních forem lidského proteinu 17β-HSD10. Expresní vektory pro produkci mutantních forem enzymu vložené do bakterií byly již na pracovišti přítomny. Práce byla rozdělena do těchto čtyř částí:

1. Literární rešerše – struktura enzymu 17β-HSD10, jeho funkce v organismu, vazba na amyloid-beta a relevantní patologie.

2. Exprese a purifikace proteinu 17β-HSD10 a jeho mutovaných variant

3. SDS-PAGE elektroforéza produkovaných proteinu, ověření velikosti a čistoty vypurifikovaných proteinových variant.

4. Charakterizace mutantních forem stanovením enzymatické aktivity wt 17β-HSD10 a jeho dvou mutantních variant – určení reakční kinetiky dle Michaelis – Mentenové

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

- 17β-estradiol (Sigma-Aldrich)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich)
- Antibiotikum kanamycin (Serva)
- Autoindukční Overnight Express TB médium (Novagen)
- Benzonase® Nuclease (Millipore)
- Bradfordovo činidlo
- Bromfenolová modř
- cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
- Coomassie Brilliant Blue G (CBBG)
- Destilovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dodecylsíran sodný (SDS)
- Glycin
- Glycerol
- Ni-NTA resin (Thermo Scientific™)
- Hovězí sérový albumin – BSA (P-LAB)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Imidazol
- Koncentrovaná kyselina octová
- Kyselina fosforečná
- Lysozym (Sigma-Aldrich)
- LB Broth (Miler) médium (Sigma-Aldrich)
- Methanol
- Nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma (NAD^+) (Sigma-Aldrich)
- Nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma (NADH) (Sigma-Aldrich)
- Peroxodisíran amonný (APS)

- Precision Plus Protein ™ Kaleidoskope ™ (BioRad)
- Sekundární butanol
- Síran amonný ($(NH_4)_2SO_4$)
- Tris HCl (BioRad)
- Tris – base (Sigma-Aldrich)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED)
- β-merkaptoetanol

4.1.2 Biologický materiál

- Buňky *E. coli* BL21 (DE3) optimalizované pro expresi rekombinantních proteinů (Novagen)

4.1.3 Přístroje

- Box s laminárním prouděním (Faster Dasit)
- Centrifugy (Eppendorf)
- Vertikální elektroforézy (BioRad)
- Hluboko mrazící box (ThermoFisher)
- Inkubátor s třepací jednotkou (MiuLab)
- Laboratorní váhy (Kern)
- Vortex (Grant Instruments)
- UV/VIS spektrofotometr (Tecan Spark 10M, Männedorf, Switzerland)
- UV transiluminátor s kamerou (Uvitec Cambridge)
- Sonikátor (Hilscher)
- Denzitometr (Biosan)

4.1.4 Pufry

- Lyzační pufr (50 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH=8)
- Promývací pufr 1 (50 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH=8)
- Promývací pufr 2 (50 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH=8)
- Eluční pufr (50 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH=8)

- Výměnný pufr bez glycerolu (71 mM Tris, 214 mM NaCl, pH=8)
- Reakční pufr (100 mM KH_2PO_4, pH = 8,0)

4.2 Rozmražení bakteriálních štoků a exprese 17β-HSD10 a jeho mutantních variant

Buňky *E. coli* BL21 (DE3) nesoucí plazmid pET28b s rekombinantními vloženými geny HSD10 pro protein 17β-HSD10 a jeho dvě mutantní formy 17β-HSD10 (Y168G, K172G), 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) byly již na pracovišti přítomny ve formě bakteriálních štoků. U mutantní formy 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) byla provedena sekvenční záměna v řetězci primární bílkovinné struktury v místě vazby na amyloid beta, která změnila výsledné složení aminokyselin serinu 98, lysinu 99, tryptofanu 100 a tyrosinu 101 na alaniny (98, 99, 100, 101). U mutantní formy 17β-HSD10 (Y168G, K172G) byla provedena sekvenční záměna v řetězci primární bílkovinné struktury v aktivním místě, která změnila výsledné složení aminokyselin z tyrosinu 168 a lyzinu 172 na glycin 168 a 172. Štoky byly skladovány při −80 °C v 30% glycerolu. Pro práci byly štoky zaočkovány do LB média s antibiotikem kanamycinem o finální koncentraci 50 μg/ml a inkubovány přes noc při 37 °C a 200 rpm ve třepačce. Druhý den bylo 100 μl kultury zaočkováno do LB média s kanamycinem o koncentraci 50 μg/ml a kultura byla kultivována při 37 °C a 200 rpm ve třepačce, dokud kultura nedosáhla optické denzity OD 600 ± 0,6. Poté byla kultura zchlazena na ledu a přesazena do předem připraveného autoindukčního Overnight Express TB média s kanamycinem o koncentraci 100 μg/ml. Exprese probíhala 18 hodin při 25 °C a 200 rpm ve třepačce. Narostlá kultura byla centrifugována při 7000 x g po dobu 5 minut /4°C. Supernatant byl odlit a bakteriální peleta byla zamražena při −20 °C do dalšího použití.

4.3 Purifikace 17β-HSD10 a jeho mutantních variant

První část purifikace spočívala v lyzování bakteriálních buněk (pelet). Byl připraven lyzační pufr, který byl uchováván v lednici a z něhož byla namíchána lyzační směs (10 ml lyzační pufr, 10 mg lysozym, 1 tbl cOmplete mini, 6 µl benzonáza).

Bakteriální peleta byla resuspendována v lyzačním pufru a směs byla inkubována 30 minut na ledu. Po inkubaci byla směs sonikována na ledu (12x 10 s sonikace, 30 s inkubace na ledu) a nerozbité zbytky buněk byly po lyzi odstraněny pomocí centrifugace (16 000 x g, 10 minut, 4 °C). K další práci byl používán supernatant.

Pro purifikaci byly připraveny polypropylenové filtrační kolony (5ml). Na kolonu byl nanesen 1 ml Ni-NTA resinu. Byl nechán vykapat uskladňovací roztok a kolona byla dvakrát promyta 10 ml lyzačního pufru. Na kolonu s resinem bylo přeneseno 5 ml supernatantu obsahující protein uvolněný z buněk a 1 hodinu inkubováno na ledu na kývačce. Po inkubaci byl z filtrační kolony odkapán roztok, z něhož byl odebrán vzorek na pozdější analýzu. Kolona byla třikrát promyta 10 ml promývacího pufru 1 a následně třikrát promyta 10ml promývacího pufru 2. Při každém promytí byla kolona 1 minutu inkubována na rotátoru spolu s promývacím pufrem.

Následně bylo provedeno pět elucí po 1 ml pomocí elučního pufru, přičemž každá eluce byla inkubována 1 minutu bez rotátoru. Eluce byly jímány do zkumavek, se kterými bylo dále pracováno.

V eluátech bylo stanoveno orientační množství proteinu pomocí Bradfordova činidla. Bradfordova metoda je založena na interakci proteinů s Coomassie Brilliant Blue (CBB) v kyselém prostředí. Interakce je doprovázena změnou barvy roztoku z červeno-hnědé na modrou a také posunem absorpčního maxima ze 450 nm na 590 nm, čehož se využívá při kvantitativní analýze.

Vzorky obsahující protein byly následně spojeny a centrifugovány na centrikoně Amicon® Ultra-4, 10 kDa při 7 000 x g po dobu 10 minut při 4 °C, u vzorků byl vyměněn eluční pufr za výměnný pufr bez glycerolu. Tento postup byl opakován 4x, před každou centrifugací bylo přidáno potřebné množství výměnného

pufru. Vzorky byly zkoncentrovány na objem asi 1 ml. Koncentrace proteinu ve vzorku byla stanovena spektrofotometricky Bradfordovou linearizovanou metodou (kapitola 4.4 Bradfordova linearizovaná metoda). Vzorky byly rozpipetovány na alikvoty a zamraženy při −80 °C.

4.4 Bradfordova linearizovaná metoda

Vzorek purifikovaného proteinu byl smíchán s Bradfordovým činidlem v poměru 1:5 a 1:10 (Tabulka 1), byla připravena i kalibrační řada s BSA – hovězím sérovým albuminem (koncentrace: 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, jako negativní kontrola bylo použito potřebné množství výměnného pufru bez glycerolu). Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 µl vzorku proteinu nebo proteinu kalibrační řady a 150 µl Bradfordova činidla. Destička byla poté inkubována 5 minut při laboratorní teplotě na kývačce a následně vložena do spektrofotometru Tecan Spark, zde byla měřena koncentrace proteinu ve vzorku. Měření bylo provedeno v triplikátech. V počítačovém programu spektrofotometru byl navolen program pro Bradfordovou linearizovanou metodu (Bradford linearized metod). Měření probíhalo při laboratorní teplotě, absorbance byla měřena při vlnových délkách 590 nm a 450 nm. Poměrem absorbancí vlnových délek 590 nm/450 nm, odečtením hodnoty blanku (negativní kontroly) a dosazením do rovnice přímky kalibrační řady byla vypočítána koncentrace proteinu ve vzorku.

Tabulka č. 1: Bradfordovo činidlo

Komponenta	**Množství**
Coomassie Brilliant Blue R250	50 mg
Methanol	25 ml
Kyselina fosforečná 85 %	50 ml
H_2O	doplnit do 100 ml

4.5 SDS-PAGE

Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je separační metoda proteinů na základě jejich elektroforetické mobility. Proteiny jsou v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS separovány podle délky polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti a konformace proteinu.

Aparatura pro nalití gelu byla sestavena ze skel odmaštěných etanolem a příslušných spacerů umožňujících vytvořit výsledný gel o tloušťce 1 mm. 12 % separační gel (Tabulka 2) byl nalit do předem sestavené aparatury, následně byla směs převrstvena 700 µl sekundárního butanolu, polymerace probíhala 60 minut. Sekundární butanol byl vylit, gel byl promyt destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem. Následně byl namíchán a nalit 4 % zaostřovací gel (Tabulka 3) a vložen hřebínek pro tvorbu jamek k nanášení vzorku, polymerace probíhala 45 minut.

Tabulka č. 2: Separační gel 12% - množství na dva gely

Komponenta	**Množství**
H_2O	4 ml
1,5M Tris HCl pH 8,8	3,04 ml
Akrylamid 30%	4,8 ml
SDS 10%	120 µl
APS 10%	40 µl
TEMED	4,8 µl

Tabulka č. 3: Zaostřovací gel 4 % - množství na 2 gely

Komponenta	**Množství**
H_2O	2,03 ml
0,5M Tris HCl pH 6,8	830 µl
Akrylamid 30%	430 µl
SDS 10%	33,3 µl
APS 10%	16,63 µl
TEMED	3,33 µl

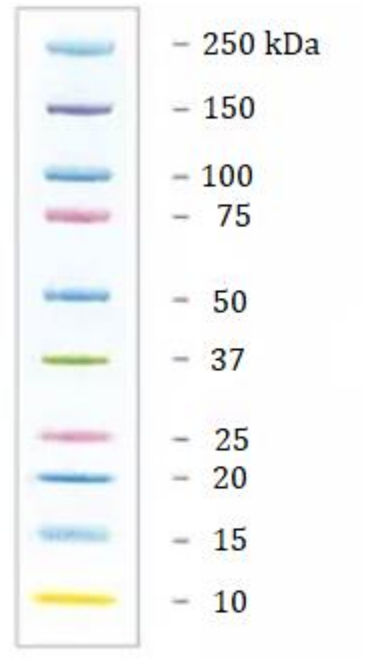
Z koncentrace proteinu bylo vypočteno množství vzorku tak, aby na gel byl nanesen přesně 1 µg enzymu, potřebné množství bylo docíleno naředěním enzymu vodou. Vzorek proteinu byl smíchán se vzorkovým pufrem (Tabulka 4) v poměru 2:1 a povařen 5 minut při 95 °C. Stejným způsobem byl připraven i vzorek obsahující 1 µg BSA rozpuštěného ve vodě. Byla sestavena aparatura na vertikální elektroforézu. Skla byla umístěna do elektroforetické vany a zalita potřebným množstvím elektrodového pufru (Tabulka 5). Na připravené polymerizované gely byly naneseny vzorky proteinu a BSA. Jako marker molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein ™ Kaleidoskope ™ (Obrázek 8) o objemu 10 µl. Byly nastaveny parametry elektroforézy, která probíhala při konstantním napětí 200 V a maximálním proudu 60 mA na jeden gel, což odpovídalo času trvání elektroforézy 60 minut.

Tabulka č. 4: Složení vzorkového pufru (3x koncentrovaný)

Komponenta	**Množství**
0,5 M TRIS-HCl pH 6,8	3,75 ml
Glycerol	3 ml
SDS	0,69 g
Bromofenolová modř 0,5 %	0,06 ml
H_2O	doplnit do 8,5 ml
β-merkaptoethanol	150 µl

Tabulka č.5: Složení elektrodového pufru, pH 8,5

Komponenta	**Množství**
50 mM TRIS base	6 g
384 mM glycin	22,8 g
SDS	1 g
H_2O	doplnit do 1 l



Obrázek č. 8: Marker molekulových hmotností. Standard sloužící pro odečet velikostí proteinů v rozsahu od 10 kDa po 250 kDa (upraveno z BioRad Laboratories, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards., 2022)

Po skončení elektroforézy byl gel omyt destilovanou vodou a následně fixován ve fixačním roztoku (Tabulka 6) po dobu asi 1 hodiny, poté byl gel vyjmut, a vložen do potřebného množství barvícího roztoku (Tabulka 7). Čas barvení je orientační a trval asi 10 hodin (přes noc). Druhý den ráno byl gel minimálně 3x omyt potřebným množstvím destilované vody, promývání a inkubace s destilovanou vodou trvala do odbarvení pozadí. Odbarvený gel byl uchováván v destilované vodě kvůli rehydrataci, naskenován a dále analyzován.

Tabulka č. 6: Fixační roztok pro SDS-PAGE gely

Komponenta	**Množství**
Koncentrovaná kyselina octová	10 ml
Methanol	40 ml
H_2O	50 ml

Tabulka č. 7: Složení barvícího roztoku Blue Silver

Komponenta	**Množství**
85% kyselina fosforečná	8 ml
Síran amonný	10 g
Coomassie Brilliant Blue G (CBBG)	0,12g
Methanol	20 ml
H_2O	doplnit do 80 ml

4.6 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant – reakční kinetika podle Michaelis – Mentenové

4.6.1 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant

V biochemii je jedním z nejznámějších modelů enzymové kinetiky rovnice a graf rychlosti reakční kinetiky podle Michaelis – Mentenové. Tuto rovnici publikovali v roce 1913 německý biochemik Leonor Michaelis a kanadská lékařka Maud Mentenová (Michaelis & Menten, 1913). Rovnice charakterizuje závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu. Čím vyšší je koncentrace substrátu, tím je enzymatická reakce rychlejší. Od okamžiku nasycení enzymu substrátem se však dalším zvyšováním koncentrace substrátu enzymatická reakce urychlit nedá. Pro charakterizaci enzymatické reakce se používá Michaelisova konstanta (K_M) neboli rovnovážná konstanta reakce, která udává koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce polovinou maximální reakční rychlosti (Srinivasan, 2021).

Pro stanovení enzymové aktivity byl připraven reakční pufr (složení pufru v kapitole 4.1.4 Pufry), roztok kofaktoru NAD^+ a roztok substrátu 17β-estradiol. Byl připraven 12,5 mM zásobní roztok 17β-estradiolu rozpuštěného v bezvodém DMSO, výsledná koncentrace 17β-estradiolu v reakci byla 25 µM. Dále byl připraven 10 mM zásobní roztok kofaktoru NAD^+ rozpuštěný v destilované vodě, konečná koncentrace roztoku v reakci je 500 µM. Enzym uchovávaný ve výměnném pufru byl naředěn na konečnou koncentraci 250 µg/ml. Byla připravena a namíchána první část reakční směsi (Tabulka 8). Měření bylo provedeno v tetraplikátech.

Tabula č. 8: Preinkubovaná reakční směs

Komponenta	**Množství (µl)**
Enzym (250 µg/ml)	1,1
NAD^+ (10 mM)	11,5
KH_2PO_4 pufr (100 nM)	217,4

Tyto komponenty byly napipetovány do mikrotitrační destičky a inkubovány 5 minut při 37 °C v spektrofotometru Tecan Spark, kde probíhalo jejich míchání při 510 rpm po dobu prvních 5 sekund. Do černé měřící destičky bylo napipetováno 0,4 µl zásobního roztoku 17β-estradiolu, po uplynutí inkubační doby bylo do měřící destičky s 17β-estradiolem připipetováno 199,6 µl inkubované reakční směsi (celkový objem reakce tady činil 200 µl), směs byla ve spektrofotometru promíchána po dobu 5 sekund při 162 rpm. Byla měřena fluorescence v čase, excitace (λ_{ex}) probíhala při 340 nm a emise (λ_{em}) při 460 nm. Stanovení enzymatické aktivity je založené na měření změny fluorescence NADH vzniklého při reakci v čase. Změna fluorescence charakterizuje enzym 17β-HSD10 a jeho mutantní formy17β-HSD10 (Y168G, K172G) a 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A)

4.6.2 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (K_M)

Michaelisova konstanta (K_M) udává koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce polovinou maximální reakční rychlosti. Čím nižší hodnota K_M je, tím vyšší má enzym afinitu k substrátu. Pro stanovení K_M je potřeba provést měření s různými koncentracemi substrátu. Byly provedeny dvě série měření s konstantní koncentrací 25 µM 17β-estradiolu (a různými koncentracemi NAD^+), a s konstantní koncentrací 500 µM NAD^+ (a různými koncentracemi 17β-estradiolu). Měření probíhalo na spektrofotometru Tecan Spark, v černé mikrotitrační destičce, postup měření byl stejný jako v kapitole 4.6.1 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant.

Byl připraven reakční pufr, enzym 17β-HSD10 uchovávaný ve výměnném pufru byl naředěn na konečnou koncentraci 250 µg/ml. Na reakci s konstantní koncentrací 17β-estradiolu byla připravena ředící řada NAD^+ o koncentracích 1000µM, 500µM, 250µM, 125µM, 62,5µM, 31,25µM, 15,62µM, 0µM (negativní kontrola). Byl použit zásobní roztok 17β-estradiolu o koncentraci 12,5mM rozpuštěný v bezvodém DMSO (výsledná koncentrace 17β-estradiolu v reakci byla 25 µM). Na reakci s konstantní koncentrací NAD^+ byla připravena ředící řada 17β-estradiolu o koncentracích 80µM, 40µM, 20µM, 10µM, 5µM, 2,5µM, 1,25µM, 0µM (negativní kontrola) a zásobní roztok 10mM kofaktoru NAD^+ rozpuštěného v destilované vodě, konečná koncentrace NAD^+ v reakci byla 500 µM. Proces přípravy vzorku a podmínky měření byly stejné jako při měření enzymatické aktivity enzymu.

4.7 Statistické vyhodnocení

Pro porovnání hodnot změny fluorescence u enzymů 17β-HSD10, 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) a 17β-HSD10 (Y168G, K172G) byl nejprve použit dvouvýběrový F-test (Snedecor, 1946) (α=0,05) pro srovnání, zda oba soubory hodnot pochází z rozdělení se stejným rozptylem, tedy i stejnou směrodatnou odchylkou. Předpokladem tohoto testu bylo splnění normality pozorovaných hodnot, což bylo ověřeno pomocí metody kvantil-kvantilového grafu (QQ-plot)(Wilk & Gnanadesikan, 1968). Pro konečnou analýzu hodnot fluorescence byl použit dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů (Scrimgeour & Welch, 1984) (α=0,05). Statistická analýza byla provedena v programu Microsoft Excel. Tyto testy byly použity, aby byly porovnány hodnoty fluorescence mezi wt enzymem a jeho mutantními variantami.

5 Výsledky

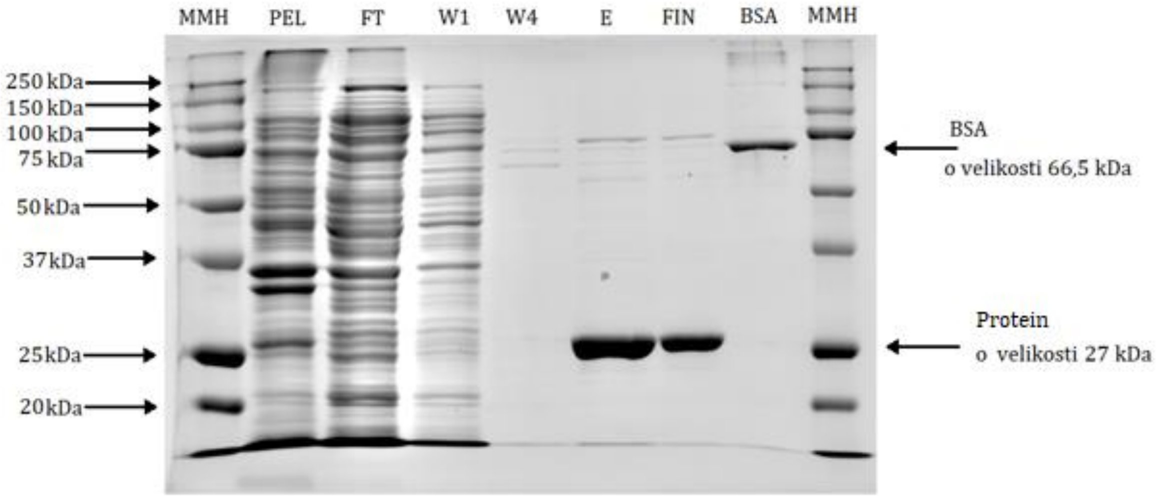
5.1 Výsledky purifikace 17β-HSD10 a jeho mutantních variant – SDS-PAGE elektroforéza

Objemy roztoků obsahujících purifikované varianty 17β-HSD10 jsou uvedeny v tabulce 9.

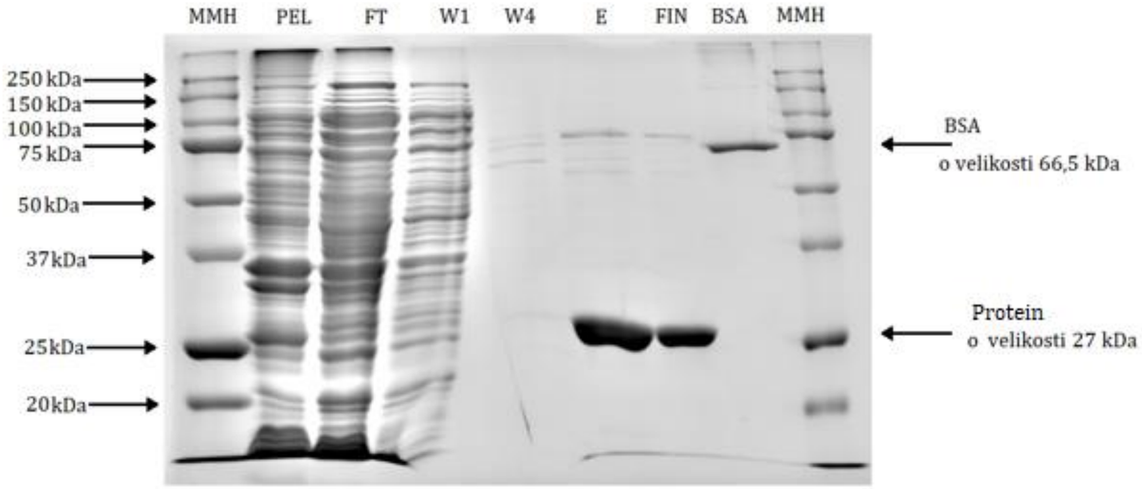
Tabulka č. 9: Objem purifikovaného proteinu

Enzym	Objem
17β-HSD10	1080 µl
17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A)	750 µl
17β-HSD10 (Y168G, K172G)	750 µl

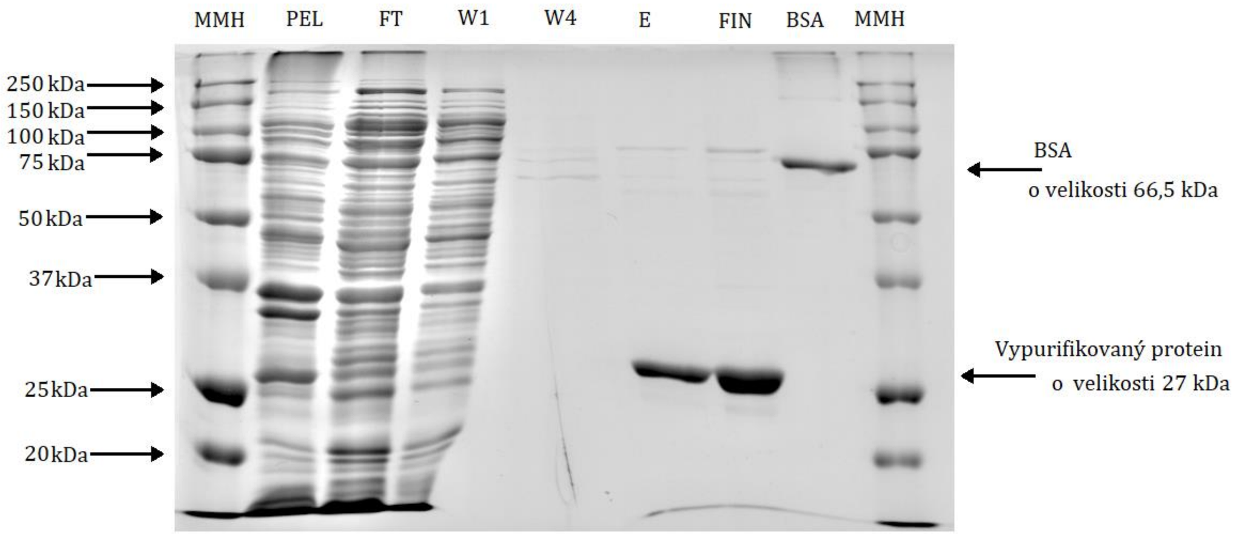
Purifikované proteiny byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Během celého procesu purifikace byly odebírány vzorky na kvalitativní analýzu. Pro detekci byl použit 4 % zaostřovací gel a 12 % separační akrylamidový gel. Vzorky byly nanášeny po povaření s vzorkovým pufrem spolu s markerem molekulových hmotností a hovězím sérovým albuminem (BSA). V oblasti, která podle markeru molekulových hmotností odpovídá velikosti 27 kDa byly na gelu dle předpokladu detekovány purifikované rekombinantní proteiny, a v oblasti, která podle markeru molekulových hmotností odpovídá velikosti 66,5 kDa byl pozorován proužek vzorku BSA. Gel byl zafixován fixačním roztokem a pro detekci bylo použito barvení pomocí roztoku Blue Silver. Odbarvený gel byl naskenován. Pro každou variantu proteinu byl udělán separátní gel 17β-HSD10 (Obrázek 9), 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) (Obrázek 10), 17β-HSD10 (Y168G, K172G) (Obrázek 11).



Obrázek č. 9: Purifikace proteinu 17β-HSD10. Vzorky byly na gel umístěny v pořadí marker molekulových hmotností (MMH) – vzorek bakteriální pelety (PEL) – vzorek supernatantu proteklého kolonou po navázání proteinu na Ni-NTA resin (FT) – vzorek po prvním promytí promývacím pufrem (W1) – vzorek po prvním promytí promývacím pufrem 2 (W4) – vzorek proteinu v elučním pufru, (E) –vzorek proteinu ve výměnném pufru (FIN) – vzorek obsahující hovězí sérový albumin (BSA) – marker molekulových hmotností (MMH).



Obrázek č. 10: Purifikace mutantní formy proteinu 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A). Vzorky byly na gel umístěny v pořadí marker molekulových hmotností (MMH) – vzorek bakteriální pelety (PEL) – vzorek supernatantu proteklého kolonou po navázání proteinu na Ni-NTA resin (FT) – vzorek po prvním promytí promývacím pufrem (W1) – vzorek po prvním promytí promývacím pufrem 2 (W4) – vzorek proteinu v elučním pufru (E) – vzorek proteinu ve výměnném pufru (FIN) – vzorek obsahující hovězí sérový albumin (BSA) – marker molekulových hmotností (MMH).



Obrázek č. 11: Purifikace mutantní formy proteinu 17β-HSD10 (Y168G, K172G). Vzorky byly na gel umístěny v pořadí marker molekulových hmotností (MMH) – vzorek bakteriální pelety (PEL) – vzorek supernatantu proteklého kolonou po navázání proteinu na Ni-NTA resin (FT) – vzorek po prvním promytí promývacím pufrem (W1) – vzorek po prvním promytí promývacím pufrem 2 (W4) – vzorek proteinu v elučním pufru (E) – vzorek proteinu ve výměnném pufru (FIN) – vzorek obsahující hovězí sérový albumin (BSA) – marker molekulových hmotností (MMH).

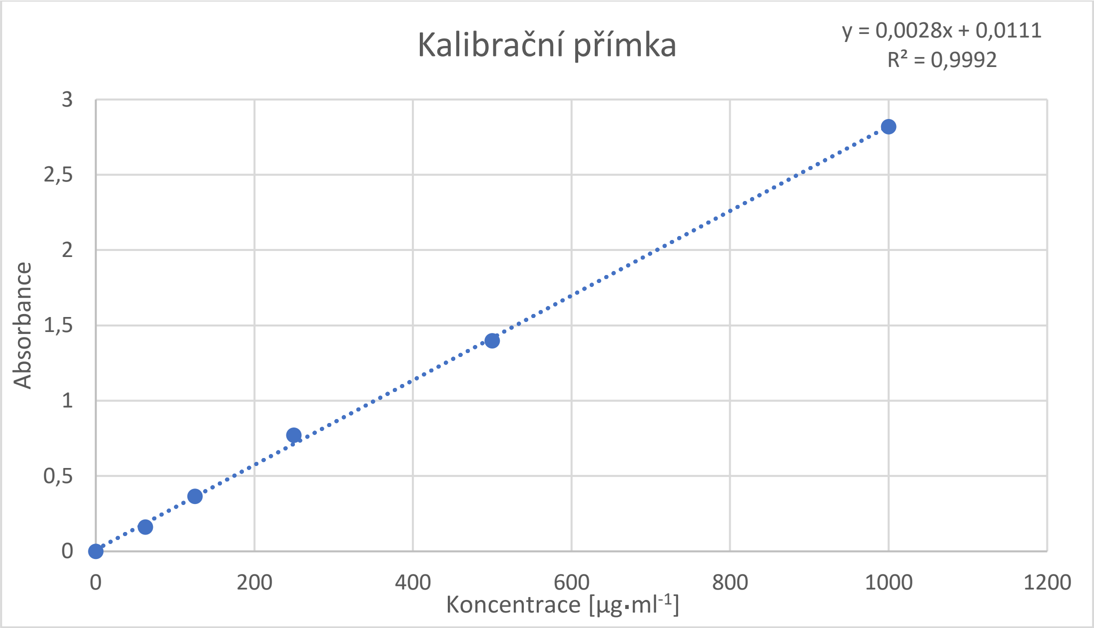
Odpovídající velikost purifikovaného proteinu byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou. Umístění proužku odpovídá příslušné velikosti proteinu 27 kDa jak v případě 17β-HSD10, tak i v případě jeho dvou mutantních variant. Na gelu byl zobrazen i proužek vzorku BSA o velikosti 66,5 kDa. Purifikovaného proteinu i BSA bylo na gel naneseno stejné množství 1 µg, a to z důvodu porovnání nanášky a čistoty purifikovaného proteinu.

5.2 Bradfordova linearizovaná metoda pro měření koncentrace proteinu ve vzorku

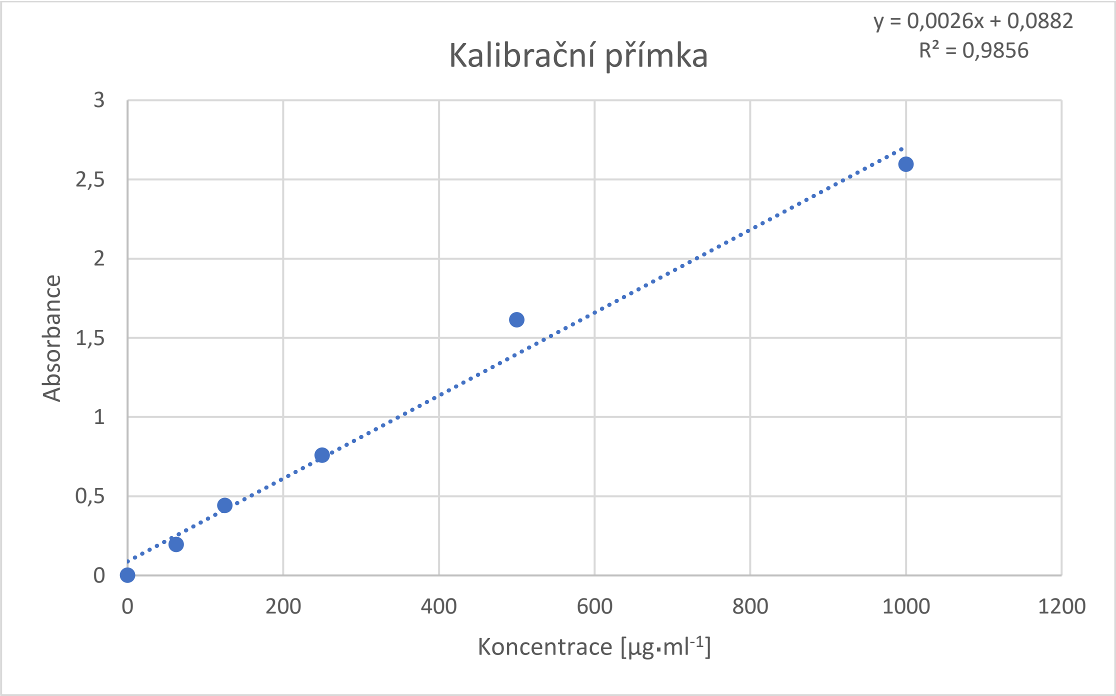
U vypurifikovaných vzorků ve výměnném pufru bez glycerolu byla měřena koncentrace proteinu. Měření probíhalo pomocí spektrofotometru Tecan Spark při laboratorní teplotě, absorbance byla měřena při vlnových délkách 590 nm a 450 nm, programem pro Bradfordovou linearizovanou metodu (Bradford linearized metod)

5.2.1 Sestavení kalibrační řady

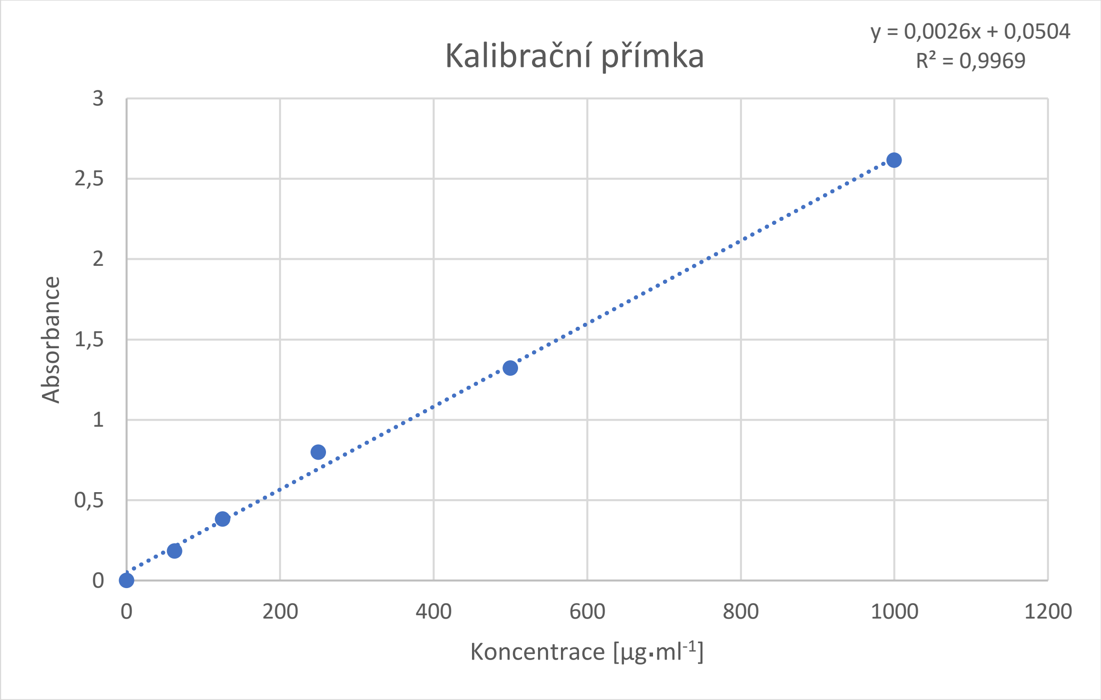
Vzorek proteinu 17β-HSD10 a 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) byl ředěn 10x a v případě proteinu 17β-HSD10 (Y168G, K172G) 5x a 10x. Důvodem pro dvojí ředění byl předpoklad nízké koncentrace proteinu ve vzorku, jelikož při výměně pufru a zakoncentrování proteinu na centrikoně Amicon ® Ultra-4, 10 kDa, vykazoval vzorek svým chováním tyto předpoklady. Dvojím ředěním by mělo být předejito případné chybě při výpočtu koncentrace z kalibrační přímky. Závěrečná koncentrace byla vypočtena průměrem obou hodnot ředění. Měření probíhalo v triplikátech, pro naměřené hodnoty absorbance BSA byla sestavena kalibrační řada a kalibrační křivka. Následně byl z hodnot sestrojen graf kalibrační přímky (Obr. 12, Obr. 13, Obr. 14), a rovnice přímky. Z rovnice kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace vzorku v µg/ml.



Obrázek č. 12: Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci proteinu. Z rovnice přímky je vypočítána koncentrace proteinu 17β-HSD10



Obrázek č. 13: Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci proteinu. Z rovnice přímky je vypočítána koncentrace proteinu 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A).



Obrázek č. 14: Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci proteinu. Z rovnice přímky je vypočítána koncentrace proteinu 17β-HSD10 (Y168G, K172G)

Pomocí Bradfordovy linearizované metody byla spočítána koncentrace proteinu ve vzorcích (Tabulka 10).

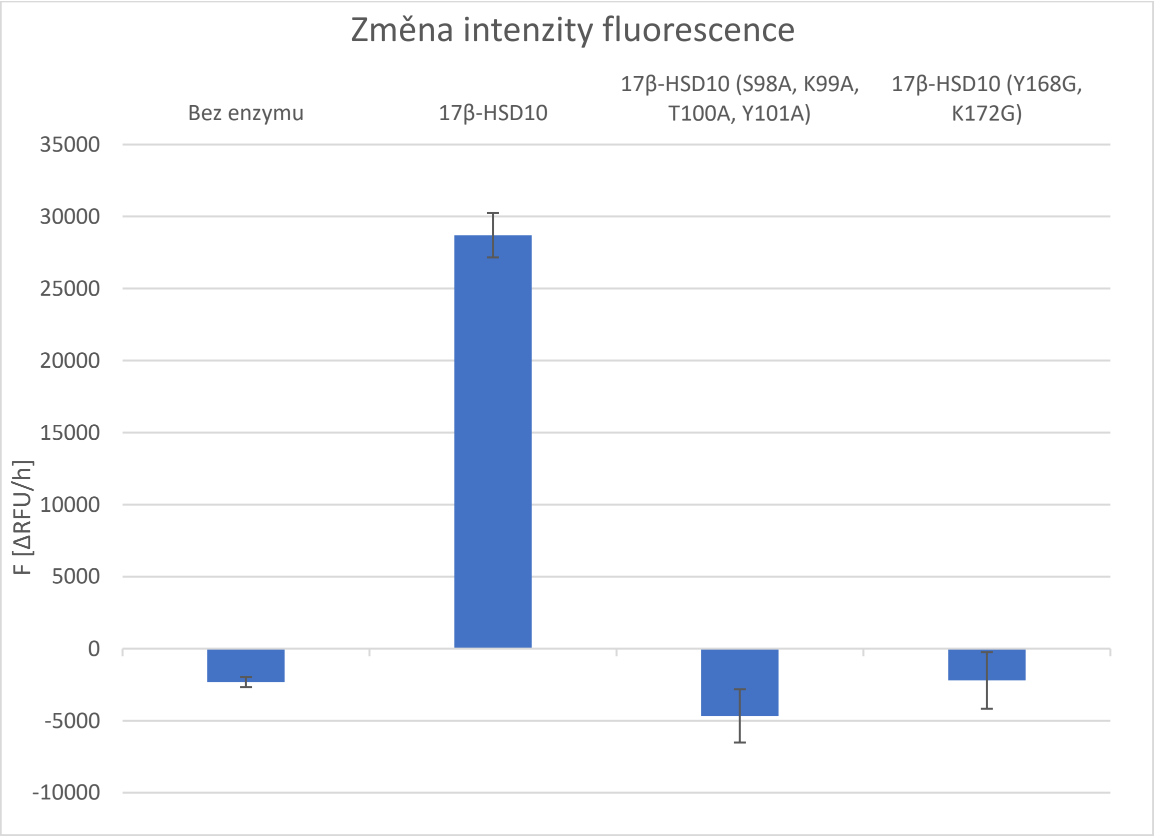
Tabulka č. 10: Koncentrace purifikovaného proteinu

Enzym	**Objem proteinu**	**Koncentrace proteinu**	**Celkové množství proteinu**
17β-HSD10	1080 μl	1956,2 μg/ml	2112,7 μg
17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A)	750 μl	1420,4 μg/ml	1065,3 μg
17β-HSD10 (Y168G, K172G)	750 μl	1029,6 μg/ml	772,2 μg

5.3 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantních variant – reakční kinetika podle Michaelis – Mentenové

5.3.1 Stanovení aktivity 17β-HSD10 a jeho mutantní variant

Stanovení enzymatické aktivity je založené na měření fluorescence NADH vzniklého při reakci enzymu 17β-HSD10 s navázaným kofaktorem NAD^+ a substrátu, kterým byl 17β-estradiol. 17β-estradiol byl přeměněn na estron a proton vodíku byl navázán na kofaktor za vzniku NADH. Jako negativní kontrola byla použita reakce bez enzymu. Měření bylo provedeno při λ_{ex} = 340 nm a λ_{em} = 460 nm a teplotě 37 °C. Pro analýzu dat bylo použito měření z času 5–25 minut, v tomto čase vykazovala reakce lineární nárůst. Pro enzym 17β-HSD10 a jeho dvě mutantní varianty byla vypočtena změna intenzity fluorescence za hodinu (Obrázek 15). Z grafu vyplývá, že pouze 17β-HSD10 vykazuje enzymatickou aktivitu – tvorba NADH. Toto tvrzení bylo ověřeno statisticky.



Obrázek č. 15: Graf změny intenzity fluorescence za hodinu. Fluorescence (F), změna relativní intenzity fluorescence za hodinu (ΔRFU/h)

5.3.2 Statistické porovnání hodnot fluorescence u enzymů 17β-HSD10, 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) a 17β-HSD10 (Y168G, K172G)

Ověření normality bylo provedeno pomocí metody QQ- pot (Wilk & Gnanadesikan, 1968). Byla prokázána normalita dat.

Při porovnaní hodnot fluorescence u 17β-HSD10 a 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) byly testovány následující hypotézy, testové kritérium a byl stanoven kritický obor. Postup testování byl proveden podle Snedecor (1946).

Hypotézy

$$H_0\colon \sigma^2_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)} = \sigma^2_{17\beta-HSD10}$$

$$H_1\colon \sigma^2_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)} \neq \sigma^2_{17\beta-HSD10}$$

Testové kritérium

$$F = \frac{S^2_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)}}{S^2_{17\beta-HSD10}}$$

$$S^2_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)} \geq S^2_{17\beta-HSD10}$$

S……… rozptyl

Kritický obor

$$F = 1{,}45$$

$$K = \{F > F_\alpha\ (m-1, n-1)\}$$

$$K = \{1{,}45 \ngtr 19{,}2\}$$

Pro platnost nulové hypotézy byla srovnána hodnota statistiky F=1,45 s kvantily F rozdělení odpovídající dané hladině významnosti testu (α=0,05) F_α =19,2 a hypotéza byla po srovnání výsledků zamítnuta.

V případě srovnání hodnot u enzymů 17β-HSD10 a 17β-HSD10 (Y168G, K172G) byly opět testovány následující hypotézy, testové kritérium a byl stanoven kritický obor. Postup testování byl rovněž proveden podle Snedecor (1946).

Hypotézy

$$H_0: \sigma^2_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)} = \sigma^2_{17\beta-HSD10}$$

$$H_1: \sigma^2_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)} \neq \sigma^2_{17\beta-HSD10}$$

Testové kritérium

$$F = \frac{S^2_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)}}{S^2_{17\beta-HSD10}}$$

$$S^2_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)} \geq S^2_{17\beta-HSD10}$$

S……… rozptyl

Kritický obor

$$F = 1{,}64$$

$$K = \{F > F_\alpha\ (m-1, n-1)\}$$

$$K = \{1{,}64 \ngtr 19{,}16\}$$

Pro platnost nulové hypotézy byla srovnána hodnota statistiky F=1,64 s kvantily F rozdělení odpovídající dané hladině významnosti testu (α=0,05) F_α =19,16 čímž došlo opět k zamítnutí nulové hypotézy.

V obou výše zmíněných případech se rozptyly u obou souborů statisticky lišily, na základě čehož byl zvolen t-test s nerovností rozptylů na hladině α=0,05, který se standartně využívá pro vyhodnocení experimentů při neznámé střední hodnotě (Scrimgeour & Welch, 1984). Pro využití testu musel být splněn předpoklad, že měření jsou nezávislá, což vyplývalo z povahy experimentu a dále, že naměřené hodnoty pochází z normálního rozdělení, k čemuž byl využit již zmíněný normální diagram (QQ-plot), který tento předpoklad potvrdil.

Při srovnání hodnot fluorescence u enzymů 17β-HSD10 a 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) byly opět testovány následující hypotézy, testové kritérium a byl stanoven kritický obor. Postup testování byl proveden podle Scrimgeour & Welch (1984).

Hypotézy

$$H_0: \mu_{X_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)}} = \mu_{X_{17\beta-HSD10}}$$

$$H_1: \mu_{X_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)}} < \mu_{X_{17\beta-HSD10}}$$

Testové kritérium

$$T = \frac{\bar{X}_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)} - \bar{X}_{17\beta-HSD10}}{\sqrt{\frac{s^2_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)}}{n_{17\beta-HSD10\ (S98A,K99A,T100A,Y101A)}} + \frac{s^2_{17\beta-HSD10}}{n_{17\beta-HSD10}}}}$$

$\bar{X}$……… průměr

s^2……….. výběrové rozptyly

n……… počet pozorování

Kritický obor

$$T = -26{,}02$$

Kritický obor leží v intervalu

$$W = (-\infty, -2{,}015048373\rangle$$

Po srovnání výsledků testů (hodnoty) byla nulová hypotéza zamítnuta.

Při srovnání hodnot fluorescence u enzymů 17β-HSD10 a 17β-HSD10 (Y168G, K172G) byly opět testovány následující hypotézy, testové kritérium a byl stanoven kritický obor. Postup testování byl opět proveden podle Scrimgeour & Welch (1984).

Hypotézy

$$H_0: \mu_{X_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)}} = \mu_{X_{17\beta-HSD10}}$$

$$H_1: \mu_{X_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)}} < \mu_{X_{17\beta-HSD10}}$$

Testové kritérium

$$T = \frac{\bar{X}_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)} - \bar{X}_{17\beta-HSD10}}{\sqrt{\frac{s^2_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)}}{n_{17\beta-HSD10\ (Y168G,K172G)}} + \frac{s^2_{17\beta-HSD10}}{n_{17\beta-HSD10}}}}$$

$\bar{X}$……… průměr

s^2……….. výběrové rozptyly

n……… počet pozorování

Kritický obor

$$T = -23{,}33$$

Kritický obor leží v intervalu

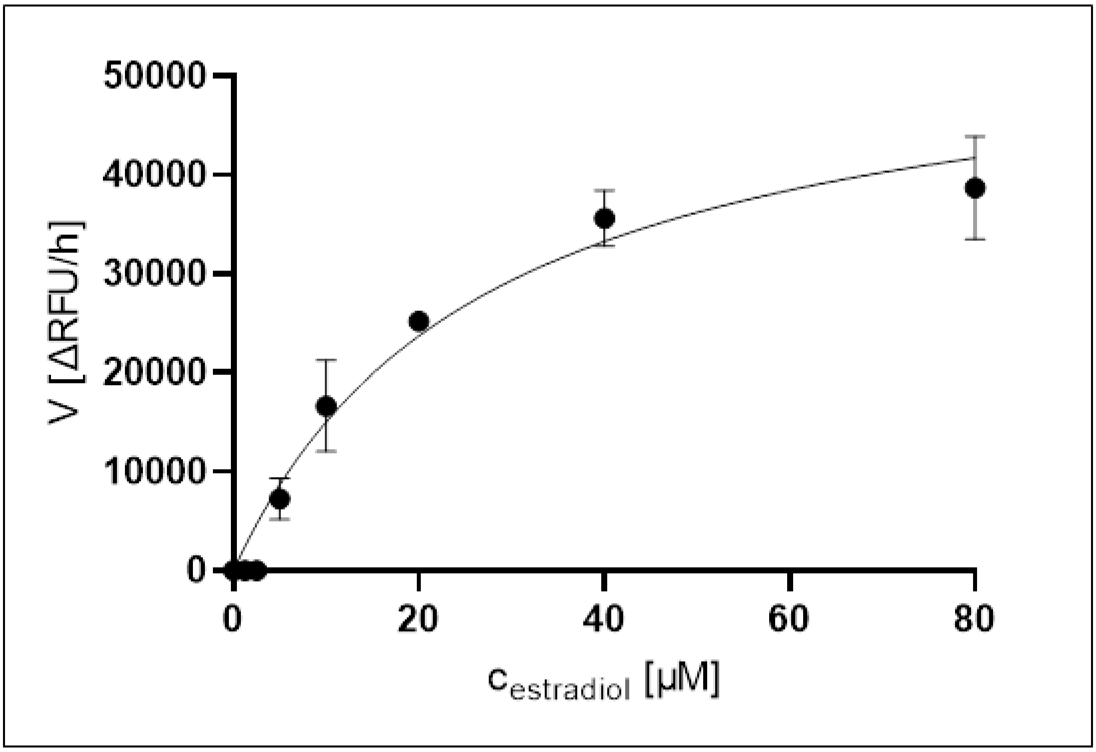
$$W = (-\infty, -2{,}015048373\rangle$$

Po srovnání výsledků testů (hodnoty) byla nulová hypotéza zamítnuta.

Na hladině významnosti α=0,05 bylo prokázáno, že enzymatická aktivita 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) je statisticky nižší než 17β-HSD10. Na hladině významnosti α=0,05 bylo prokázáno, že enzymatická aktivita 17β-HSD10 (Y168G, K172G) je nižší než 17β-HSD10.

5.3.3 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (K_M) pro 17β-estradiol

Podmínky reakce a příprava enzymu 17β-HSD10 a postup analýzy dat byl stejný jako v kapitole 5.3.3 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (KM) při konstantní koncentraci 17β-estradiolu. Byla připravena měřící řada s různými koncentracemi 17β-estradiolu. Výsledky měření byly analyzovány v programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Byl sestaven graf průběhu enzymatické reakce (Obrázek 16). Nelineární regresní analýzou byla za použití dat reakční rychlosti vypočtena maximální rychlost reakce (V_{max}) a Michaelisova konstanta (K_M). V_{max} je 55 877 ± 4 963 ΔRFU/h, K_M je 27,18 ± 5,28 μM.



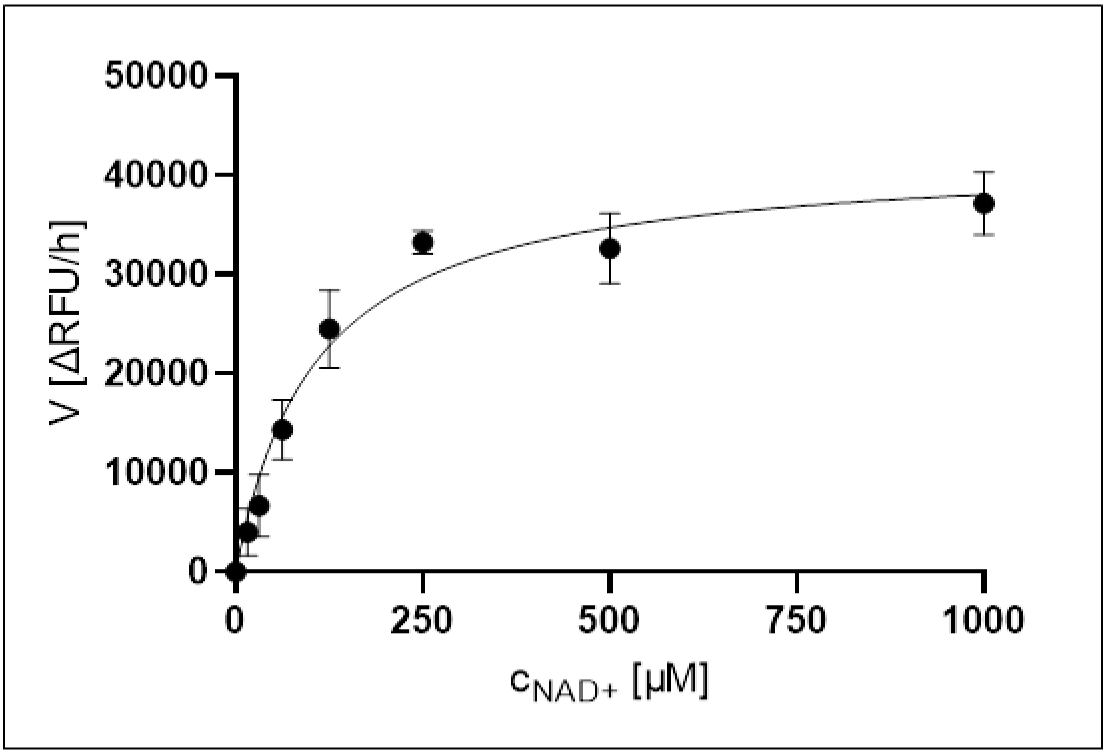
Obrázek č. 16: Graf průběhu enzymatické reakce znázorňující závislost rychlosti reakce na koncentraci 17β-estradiolu. Rychlost reakce (V), změna relativní intenzity fluorescence za hodinu (ΔRFU/h), koncentrace 17β-estradiolu ($c_{estradiol}$).

5.3.4 Stanovení rovnovážné konstanty reakce – Michaelisova konstanta (K_M) pro NAD^+

Mutantní varianty proteinu nevykazovaly enzymatickou aktivitu, proto byl ke stanovení K_M použit pouze 17β-HSD10.

Purifikovaný protein 17β-HSD10 byl zředěn na koncentraci 250 μg/ml, byla připravena měřící řada s různými koncentracemi NAD^+. Měření fluorescence probíhalo při 37 °C, excitace probíhala při 340 nm a emise při 460 nm. Měření probíhalo každých 30 sekund po dobu 30 minut. Jako relevantní data intenzity fluorescence byla použita data naměřená v časovém rozmezí 5 až 25 minut (lineární průběh reakce). Z těchto dat byla vypočtena intenzita fluorescence v čase 1 hodiny.

Výsledky měření byly analyzovány v programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Byl sestaven graf průběhu enzymatické reakce (Obrázek 17). Nelineární regresní analýzou byla za použití dat reakční rychlosti vypočtena maximální rychlost reakce (V_{max}) a Michaelisova konstanta (K_M). V_{max} je 42 089 ± 2 021 ΔRFU/h, K_M je 105,8 ± 16,3 μM.



Obrázek č. 17: Graf průběhu enzymatické reakce znázorňující závislost rychlosti reakce na koncentraci NAD^+. Rychlost reakce (V), změna relativní intenzity fluorescence za hodinu (ΔRFU/h), koncentrace NAD^+ (c_{NAD^+}).

6 Diskuse

17β-HSD10 je jedním z možných důležitých modulátorů rozvoje patogeneze neurodegenerativních onemocnění konkrétně Alzheimerovy choroby (vzhledem ke své enzymatické aktivitě je však spojen i s rozvojem dalších onemocnění). Interakce amyloidu-beta s 17β-HSD10 blokuje jeho enzymatickou aktivitu, tato interakce by mohla souviset se symptomy neurodegenerace. Podobně jako vazba amyloidu-beta na 17β-HSD10, i mutace v místě vazby kofaktoru nebo v katalytickém místě by měly mít inhibiční účinky na enzymatickou aktivitu. Pro tyto účely je třeba příslušné racionálně navržené mutantní formy (spolu s enzymem divokého typu) exprimovat, izolovat a charakterizovat jejich enzymatické charakteristiky.

Aitken et al. (2016) uvádí, že protein byl eluován a uchováván v pufru (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 % objemu glycerol, pH 7,5), Schmidt et al. (2020) uvádí jako eluční pufr (50 mM pufr fosforečnanu sodného, 150 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) a pufr pro dlouhodobé skladování při −80 °C (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 30% glycerol, pH 7,5). Uchovávací pufr použitý v této diplomové práci byl výměnný pufr (71 mM Tris-HCl, 214 mM NaCl, pH=8) byl bez glycerolu. Bylo zjištěno, že 17β-HSD10 rozpoznává glycerol jako substrát, a tím pádem glycerol ovlivňuje enzymovou aktivitu. Vypurifikovaný protein byl skladován ve výměnném pufru při −80 °C pouze krátkodobě v řádu několika málo dnů (do 14 dní od původní izolace). Při dlouhodobém uchovávání bude do výměnného pufr (71 mM Tris-HCl, 214 mM NaCl, pH=8) přidáno 30% objemu glycerolu. Celkově můžu konstatovat, že metodika přípravy a izolace enzymu a jeho variant byla ve shodě s relevantní literaturou a experimentální výsledek ukazuje, že se jedná o vhodnou kombinaci podmínek.

Při zakoncentrovávání proteinu bylo chování vzorku 17β-HSD10 (Y168G, K172G) odlišné od chování zbývajících dvou vzorků proteinu. Výměna pufru a zakoncentrování na centrikoně Amicon® Ultra-4, 10 kDa bylo mnohem rychlejší. Bylo tedy předpokládáno, že 17β-HSD10 (Y168G, K172G) má menší koncentraci. Tohoto předpokladu bylo využito při měření Bradfordovy linearizované metody k určení koncentrace proteinu. Vzorek 17β-HSD10 (Y168G, K172G) byl ředěn oproti ostatním vzorkům pouze 5x a 10x aby bylo předejito případnému přílišnému

naředění při přípravě kalibrační řady, Výsledné měření skutečně ukázalo, že celkové množství proteinu 17β-HSD10 (Y168G, K172G) bylo nižší (772,2 μg) než množství dvou zbylých enzymových variant (17βHSD10 - 2112,7 μg, 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) - 1065,3 μg).

Velikost izolovaných proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE, výsledky odpovídají velikosti 27 kDa, která je publikovaná v literatuře (Schmidt et al., 2020). Je tedy zřejmé, že během izolace nedošlo k podstatné proteolýze a možnému narušení funkce proteinu tímto způsobem. Pro ověření čistoty a množství proteinu (potvrzující kvantifikaci získanou pomocí Bradfordovy linearizované metody) byl použit standard BSA. Proužky proteinu BSA a purifikovaného proteinu by měly mít teoreticky stejnou integrovanou intenzitu signálu a plochu proužku, a to vzhledem k tomu, že v obou případech bylo na gel naneseno stejné množství - 1 μg proteinu. Na gelech je však patrný rozdíl v intenzitě, což by mohlo být způsobeno nepřesnou nanáškou. Druhou možností je odlišná vazba Coomassie Briliant Blue R na oba proteiny, což je prokázáno u celé řady proteinů. Vazba variant CBB na konkrétní protein obecně koreluje s jeho celkovým nábojem a mírou hydrofobicity (Schägger & von Jagow, 1991).

Enzymová aktivita 17β-HSD10 a jeho dvou mutantních variant byla ověřena enzymatickou reakcí purifikovaných proteinů. V této diplomové práci byl jako substrát použit 17β-estradiol. Právě 17β-estradiol jako substrát pro stanovení enzymové aktivity využívají i Shafqat et al. (2003), Yang et al. (2005), Yang et al., (2014). Dalšími používanými substráty k ověření enzymatické aktivity jsou Acetoacetyl-CoA (Aitken et al., 2016). Shafqat et al. (2003) používá jako substráty hydroxybutyryl-CoA, dihydrotestosteron, 5α-pregnan-20β-ol-3-on, isoursodeoxycholovou kyselinu, chenodeoxycholovou kyselinu a dehydrokortikosteron. 17β-estradiol byl z výše uvedených substrátů zvolen proto, že vzhledem k možnému vztahu enzymu k patogenezi Alzheimerovy choroby se jeví jako nejrelevantnější (He et al., 1999).

Obě mutantní varianty 17β-HSD10 nevykazovaly při použitém eseji enzymatickou aktivitu. He et al. (2003) publikoval článek, o oxidační aktivitě 17β-HSD10. V tomto článku uvádí mutantní variantu HSD10 (Y168F), výslednou mutací byla změna aminokyselin v primární bílkovinné struktuře z tyrosinu 168

na fenylalanin. Tato mutantní varianta byla neaktivní. U mutantní varianty 17β-HSD10 (Y168G, K172G) studované v této diplomové práci byla také provedena změna tyrosinu ve stejné pozici 168, tentokrát ovšem na fenylalaninu funkčně podobný alanin. Bylo tedy očekáváno, že mutantní varianta nebude enzymaticky aktivní. Tento předpoklad byl potvrzen i experimentálními výsledky. O enzymaticky neaktivních mutantních formách 17β-HSD10 píše i Yang et al. (2005), změna aminokyselin v primární bílkovinné struktuře byla v tomto případě (Y168G a/nebo K172G), tedy u stejných aminokyselin jako u mutantní varianty 17β-HSD10 (Y168G, K172G). Lustbader et al. (2004) také prokázal, že přesto, že mutantní varianta nemá enzymatickou aktivitu, je schopna vázat amyloid-beta téměř stejně jako nemutovaný protein. Neaktivní mutantní forma proteinu tedy nemohla zprostředkovat cytotoxicitu amyloidu-beta.

Tohoto faktu by bylo možné využít při výzkumu a lečbě Alzheimerovy choroby. Enzymaticky neaktivní mutantní varianta 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A), (mutace byla provedena v místě vazby na amyloid-beta), by neměla být schopna navázat amyloid-beta. Tato mutantní varianta by mohla předejít vzniku mitochondriálně toxického komplexu 17β-HSD10-amyloid-beta, který napomáhá mitochondriálním disfunkcím při Alzheimerově chorobě. Neschopnost vazby 17β-HSD10-amyloid-beta mutantní formy 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) a jejího terapeutického využití je předmětem dalšího výzkumu. Pro potvrzení výše zmíněného potenciálu této mutantní formy bude nezbytné testovat její vazbu na amyloid-beta, optimálně společně s testováním enzymatické aktivity, která může být konformačně modulována vazbou.

Úplná ztráta enzymatické aktivity 17β-HSD10 (S98A, K99A, T100A, Y101A) je z jedné strany překvapivá, neboť mutovaná oblast je poměrně vzdálená od katalytického místa, na druhou stranu ji bylo možné očekávat, neboť vazba amyloidu-beta enzymatickou aktivitu inhibuje. Jedná se v tomto případě o potvrzení strukturně biologického fenoménu, kdy mutace ve vazebném místě pro molekulu modulující funkci enzymu má obdobný efekt, jako vazba modulátoru (v tomto případě inhibitoru-amyloidu) samotného. Jak jsem zmínila výše, pro potvrzení všech těchto závěrů je třeba doplnit do testování aktivitu mutovaných variant přítomnost amyloidu-beta.

Co se týká enzymatické aktivity původní nemutované varianty 17β-HSD10, He et al. (1999) uvádí K_M pro 17β-estradiol 43 ± 2,1 μM, obdobné hodnoty uvádí i Shafqat et al. (2003) a Yang et al. (2005). V této diplomové práci byly naměřeny hodnoty K_M pro 17β-estradiol 27,18 ± 5,28 μM.

He et al. (1999) uvádí K_M pro NAD^+ 50 ± 6,4 μM. V této diplomové práci byly naměřeny hodnoty K_M pro NAD^+ 105,8± 16,3 μM. V jednom případě se jedná pro naše měření o hodnotu o cca čtvrtinu nižší, v druhém případě poloviční. Nejedná se tedy pravděpodobně o možný problém s aktivitou samotného purifikovaného preparátu (nižší aktivita v jednom případě nemůže být vysvětlena obecnou neaktivitou enzymu, když s použitím jiného substrátu je aktivita naopak vyšší). Odlišnost získaných hodnot oproti literatuře může být způsobena mnoha důvody – např. teplotou, čistotou použitých reagencií, jejich stářím nebo způsobem jejich uchování. Přestože jsou hodnoty naměřené v této diplomové práci mírně odlišné v porovnání s literaturou, umožnují jednoznačné využití nemutovaného purifikovaného 17β-HSD10 jako pozitivní kontroly pro určování aktivity mutovaných variant.

7 Závěr

17β-HSD10 je důležitý mitochondriální protein nezbytný pro udržení homeostázy a přežití buněk. Jeho role se však může za patologických podmínek, jako je jeho nadměrná exprese nebo zvýšené hladiny amyloidu-beta, změnit. Jedná se také o jeden z nejlépe prozkoumaných intracelulárních proteinů, který interaguje s amyloidem-beta. Tato interakce vede k poškození mitochondrií, které je typické pro Alzheimerovu chorobu. Z tohoto důvodu mohou být léčebné strategie využívající inhibitory 17β-HSD10 nebo inhibitory interakce17β-HSD10 s amyloidem-beta vhodnou volbou ke zpomalení progrese onemocnění souvisejících s 17β-HSD10, především pro léčbu Alzheimerovy choroby.

V této práci byla popsána purifikace rekombinantního proteinu 17β-HSD10 a jeho dvou mutantních variant. U všech tří proteinů byla pomocí SDS-PAGE prokázána správná velikost 27kDa a jejich čistota. Byla změřena koncentrace purifikovaných proteinů, a především bylo fluorescenční metodou prokázáno, že mutantní formy nemají enzymatickou aktivitu. Toho je možné využít v budoucím výzkumu a možnostech léčby Alzheimerovy choroby (vyvázání amyloidu-beta, zabránění tvorby fibril a senilních plaků). U přirozené formy proteinu 17β-HSD10 byla prokázána enzymatická aktivita, (kofaktorem této reakce byl NAD^+) srovnatelná s literaturou (He et al., 1999). Jako substrát byl použit 17β – estradiol. Pomocí nelineární regresní analýzy byla vypočtena Michaelisova konstanta (K_M) a maximální rychlost reakce (V_{max}), které charakterizuje purifikovaný protein 17β-HSD10.

8 Literatura

1. Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., … Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-B 1-42 oligomers to fibrils. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(5). https://doi.org/10.1038/nsmb.1799

2. Aitken, L., Quinn, S. D., Perez-Gonzalez, C., Samuel, I. D. W., Penedo, J. C., & Gunn-Moore, F. J. (2016). Morphology-Specific Inhibition of β-Amyloid Aggregates by 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 10. *ChemBioChem*, *17*(11). https://doi.org/10.1002/cbic.201600081

3. Akagawa, S., Fukao, T., Akagawa, Y., Sasai, H., Kohdera, U., Kino, M., … Kaneko, K. (2017). Japanese male siblings with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-coa dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without neurological regression. In *JIMD Reports* (Vol. 32). https://doi.org/10.1007/8904_2016_570

4. Alikhani, N., Guo, L., Yan, S., Du, H., Pinho, C. M., Chen, J. X., … Yan, S. S. (2011). Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid-β degrading enzyme, PreP peptidasome, in alzheimer's disease brain mitochondria. *Journal of Alzheimer's Disease*, *27*(1). https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101716

5. Amberger, A., Deutschmann, A. J., Traunfellner, P., Moser, P., Feichtinger, R. G., Kofler, B., & Zschocke, J. (2016). 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 10 predicts survival of patients with colorectal cancer and affects mitochondrial DNA content. *Cancer Letters*, *374*(1). https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.011

6. Audano, M., Schneider, A., & Mitro, N. (2018). Mitochondria, lysosomes, and dysfunction: their meaning in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*. https://doi.org/10.1111/jnc.14471

7. Ayan, D., Maltais, R., & Poirier, D. (2012). Identification of a 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type10 Steroidal Inhibitor: A Tool to Investigate the Role of Type10 in Alzheimer's Disease and Prostate Cancer. *ChemMedChem*, *7*(7). https://doi.org/10.1002/cmdc.201200129

8. Balson, R., Gibson, P. R., Ames, D., & Bhathal, P. S. (1995). Tacrine-Induced Hepatotoxicity. *CNS Drugs*, *4*(3). https://doi.org/10.2165/00023210-

199504030-00002

9. Belelli, D., & Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABAA receptor. *Nature Reviews Neuroscience*. https://doi.org/10.1038/nrn1703

10. BioRad Laboratories, Inc. Česká republika Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards. (2022) Retrieved from https://www.bio- rad.com/en-cz/sku/1610395-precision-plus-protein-kaleidoscope- prestained-protein-standards-value-pack?ID=1610395

11. Bolós, M., Perea, J. R., & Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomolecular Concepts*. https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0029

12. Brinkman, S. D., & Gershon, S. (1983). Measurement of cholinergic drug effects on memory in alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *4*(2). https://doi.org/10.1016/0197-4580(83)90038-6

13. Butterfield, D. A., & Lauderback, C. M. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: Potential causes and consequences involving amyloid β-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(11). https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00794-3

14. Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F., & Sultana, R. (2007). Roles of amyloid β-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.037

15. Carlson, E. A., Marquez, R. T., Du, F., Wang, Y., Xu, L., & Yan, S. S. Du. (2015). Overexpression of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 increases pheochromocytoma cell growth and resistance to cell death. *BMC Cancer*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12885-015-1173-5

16. Cazorla, M. R., Verdú, A., Pérez-Cerdá, C., & Ribes, A. (2007). Neuroimage Findings in 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Pediatric Neurology*, *36*(4).

https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.11.014

17. Cha, M. Y., Han, S. H., Son, S. M., Hong, H. S., Choi, Y. J., Byun, J., & Mook-Jung, I. (2012). Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLoS ONE*, *7*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034929

18. Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014

19. Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*. https://doi.org/10.1038/aps.2017.28

20. Chen, J. X., & Yan, S. S. (2010). Role of mitochondrial amyloid-β in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100357

21. Coburger, I., Dahms, S. O., Roeser, D., Gührs, K. H., Hortschansky, P., & Than, M. E. (2013). Analysis of the overall structure of the multi-domain amyloid precursor protein (APP). *PLoS ONE*, *8*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081926

22. Colonna, M., & Wang, Y. (2016). TREM2 variants: New keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(4). https://doi.org/10.1038/nrn.2016.7

23. Connell, J. W., Rodriguez-Martin, T., Gibb, G. M., Kahn, N. M., Grierson, A. J., Hanger, D. P., … Gallo, J. M. (2005). Quantitative analysis of tau isoform transcripts in sporadic tauopathies. *Molecular Brain Research*, *137*(1–2). https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.02.014

24. Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry International*. https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00125-4

25. Daigle, I., & Li, C. (1993). apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein

related to the human β-amyloid protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(24). https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.12045

26. Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., & Yan, S. S. Du. (2010). Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(43). https://doi.org/10.1073/pnas.1006586107

27. Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration*. https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y

28. Dye, R. V., Miller, K. J., Singer, E. J., & Levine, A. J. (2012). Hormone replacement therapy and risk for neurodegenerative diseases. *International Journal of Alzheimer's Disease*. https://doi.org/10.1155/2012/258454

29. Edell, W. S., & Tunis, S. L. (2001). Antipsychotic treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia in geropsychiatric inpatients. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, *9*(3). https://doi.org/10.1097/00019442-200108000-00014

30. Ensenauer, R., Niederhoff, H., Ruiter, J. P. N., Wanders, R. J. A., Otfried Schwab, K., Brandis, M., & Lehnert, W. (2002). Clinical variability in 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Annals of Neurology*, *51*(5). https://doi.org/10.1002/ana.10169

31. Falk, M. J., Gai, X., Shigematsu, M., Vilardo, E., Takase, R., McCormick, E., … Hou, Y. M. (2016). A novel HSD17B10 mutation impairing the activities of the mitochondrial Rnase P complex causes X-linked intractable epilepsy and neurodevelopmental regression. *RNA Biology*, *13*(5). https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1159381

32. Fang, D., Wang, Y., Zhang, Z., Du, H., Yan, S., Sun, Q., … Yan, S. S. Du. (2015). Increased neuronal PreP activity reduces Aβ accumulation, attenuates neuroinflammation and improves mitochondrial and synaptic function in Alzheimer disease's mouse model. *Human Molecular Genetics*, *24*(18).

https://doi.org/10.1093/hmg/ddv241

33. Fine, A., Hoyle, C., Maclean, C. J., LeVatte, T. L., Baker, H. F., & Ridley, R. M. (1997). Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys. *Neuroscience*, *81*(2). https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00208-X

34. Flynn, F. G., Cummings, J. L., & Gornbein, J. (1991). Regular articles. Delusions in dementia syndromes: Investigation of behavioral and neuropsychological correlates. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *3*(4). https://doi.org/10.1176/jnp.3.4.364

35. Fukao, T., Akiba, K., Goto, M., Kuwayama, N., Morita, M., Hori, T., … Hasegawa, Y. (2014). The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *Journal of Human Genetics*, *59*(11). https://doi.org/10.1038/jhg.2014.79

36. García-Villoria, J., Gort, L., Madrigal, I., Fons, C., Fernández, C., Navarro-Sastre, A., … Ribes, A. (2010). X-inactivation of HSD17B10 revealed by cDNA analysis in two female patients with 17B-hydroxysteroid dehydrogenase 10 deficiency. *European Journal of Human Genetics*, *18*(12). https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.118

37. García-Villoria, J., Ofman, R., Sala, P. R., Merinero, B., Ramos, J., García-Silva, M. T., … Ribes, A. (2005). 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (MHBD) deficiency: An X-linked inborn error of isoleucine metabolism that may mimic a mitochondrial disease. *Pediatric Research*, *58*(3). https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000176916.94328.cd

38. Gilley, D. W., Whalen, M. E., Wilson, R. S., & Bennett, D. A. (1991). Hallucinations and associated factors in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *3*(4). https://doi.org/10.1176/jnp.3.4.371

39. Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *120*(3).

https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80190-4

40. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, *3*(4). https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9

41. Goedert, Michel. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*. https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90078-Z

42. Goedert, Michel. (2015). Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Aβ, tau, and α-synuclein. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1255555

43. Goedert, Michel, & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1132814

44. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(13). https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913

45. Guerreiro, R. J., Gustafson, D. R., & Hardy, J. (2012). The genetic architecture of Alzheimer's disease: Beyond APP, PSENS and APOE. *Neurobiology of Aging*. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.025

46. Haam, J., & Yakel, J. L. (2017). Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of Neurochemistry*. https://doi.org/10.1111/jnc.14052

47. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., … Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine*, *1*(12). https://doi.org/10.1038/nm1295-1291

48. Hansson Petersen, C. A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P. F., Alafuzoff, I., … Ankarcrona, M. (2008). The amyloid β-peptide is imported into

mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(35). https://doi.org/10.1073/pnas.0806192105

49. Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01030-2

50. Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1566067

51. Hasselmo, M. E., Anderson, B. P., & Bower, J. M. (1992). Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *Journal of Neurophysiology*, *67*(5). https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.5.1230

52. He, X. Y., Dobkin, C., & Yang, S. Y. (2011). Does the HSD17B10 gene escape from X-inactivation. *European Journal of Human Genetics*. https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.192

53. He, X. Y., Dobkin, C., & Yang, S. Y. (2019). 17β-Hydroxysteroid dehydrogenases and neurosteroid metabolism in the central nervous system. *Molecular and Cellular Endocrinology*. https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.002

54. He, X. Y., Merz, G., Mehta, P., Schulz, H., & Yang, S. Y. (1999). Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17β- hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15014

55. He, X. Y., Merz, G., Yang, Y. Z., Mehta, P., Schulz, H., & Yang, S. Y. (2001). Characterization and localization of human type 10 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*. https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02421.2421.x

56. He, X. Y., Wegiel, J., & Yang, S. Y. (2005). Intracellular oxidation of allopregnanolone by human brain type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Brain Research*, *1040*(1–2). https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.022

57. He, X. Y., Wen, G. Y., Merz, G., Lin, D., Yang, Y. Z., Mehta, P., … Yang, S. Y. (2002).

Abundant type 10 17β-hydroxysteroid dehydrogenase in the hippocampus of mouse Alzheimer's disease model. *Molecular Brain Research*, *99*(1). https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00102-X

58. He, X. Y., Yang, Y. Z., Peehl, D. M., Lauderdale, A., Schulz, H., & Yang, S. Y. (2003). Oxidative 3α-hydroxysteroid dehydrogenase activity of human type 10 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *87*(2–3). https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.07.007

59. He, X. Y., Yang, Y. Z., Schulz, H., & Yang, S. Y. (2000). Intrinsic alcohol dehydrogenase and hydroxysteroid dehydrogenase activities of human mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochemical Journal*, *345*(1). https://doi.org/10.1042/0264-6021:3450139

60. Heald, S. L., Tilton, R. F., Hammond, L. J., Lee, A., Bayney, R. M., Kamarck, M. E., … Unterbeck, A. (1991). Sequential NMR Resonance Assignment and Structure Determination of the Kunitz-Type Inhibitor Domain of the Alzheimer's β-Amyloid Precursor Protein. *Biochemistry*, *30*(43). https://doi.org/10.1021/bi00107a015

61. Hong, S., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology*. https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.12.004

62. Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Da Silva, H. M. A., & Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, *444*(7118). https://doi.org/10.1038/nature05324

63. Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzàlez-Duarte, R., Jeffery, J., & Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). Biochemistry, 34, 6003– 6013. https://doi.org/10.1021/ bi00018a001

64. Kissinger, C. R., Rejto, P. A., Pelletier, L. A., Thomson, J. A., Showalter, R. E., Abreo, M. A., … Villafranca, J. E. (2004). Crystal structure of human ABAD/HSD10 with a bound inhibitor: Implications for design of Alzheimer's disease therapeutics. *Journal of Molecular Biology*. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.071

65. Konig, G., Monning, U., Czech, C., Prior, R., Banati, R., Schreiter-Gasser, U., …

Beyreuther, K. (1992). Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the βA4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(15). https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50090-4

66. Korman, S. H. (2006). Inborn errors of isoleucine degradation: A review. *Molecular Genetics and Metabolism*. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.07.010

67. Krištofiková, Z., Bocková, M., Hegnerová, K., Bartoš, A., Klaschka, J., Říčný, J., … Homola, J. (2009). Enhanced levels of mitochondrial enzyme 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in patients with Alzheimer disease and multiple sclerosis. *Molecular BioSystems*, *5*(10). https://doi.org/10.1039/b904799a

68. Kruman, I. I., & Mattson, M. P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *Journal of Neurochemistry*, *72*(2). https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720529.x

69. Lee, G., Neve, R. L., & Kosik, K. S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*, *2*(6). https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90050-0

70. Lenski, C., Kooy, R. F., Reyniers, E., Loessner, D., Wanders, R. J. A., Winnepenninckx, B., … Ramser, J. (2007). The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. *American Journal of Human Genetics*, *80*(2). https://doi.org/10.1086/511527

71. Loreck, D. J., Bylsma, F. W., & Folstein, M. F. (1994). The Dementia Signs and Symptoms Scale: A New Scale for Comprehensive Assessment of Psychopathology in Alzheimer's Disease. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, *2*(1). https://doi.org/10.1097/00019442-199400210-00009

72. Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., … Wu, H. (2004). ABAD Directly Links Aβ to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science*, *304*(5669). https://doi.org/10.1126/science.1091230

73. Manthey, D., & Behl, C. (2006). From structural biochemistry to expression

profiling: Neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience*, *138*(3). https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.058

74. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003

75. Masliah, A., Terry, R. D., Alford, M., DeTeresa, R., & Hansen, L. A. (1991). Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, *138*(1).

76. Mazanetz, M. P., & Fischer, P. M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. https://doi.org/10.1038/nrd2111

77. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group⋆ under the auspices of department of health and human services task force on alzheimer's disease. *Neurology*, *34*(7). https://doi.org/10.1212/wnl.34.7.939

78. Michaelis, L., & Menten, M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, *49*.

79. Minati, L., Edginton, T., Grazia Bruzzone, M., & Giaccone, G. (2009). Reviews: Current concepts in alzheimer's disease: A multidisciplinary review. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*. https://doi.org/10.1177/1533317508328602

80. Moreira, P. I., Duarte, A. I., Santos, M. S., Rego, A. C., & Oliveira, C. R. (2009). An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0972

81. Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and "wingmen." *Nature Neuroscience*. https://doi.org/10.1038/nn.4018

82. Ofman, R., Ruiter, J. P. N., Feenstra, M., Duran, M., Poll-The, B. T., Zschocke, J., …

Wanders, R. J. A. (2003). 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency is caused by mutations in the HADH2 gene. *American Journal of Human Genetics*, *72*(5). https://doi.org/10.1086/375116

83. Olpin, S. E., Pollitt, R. J., McMenamin, J., Manning, N. J., Besley, G., Ruiter, J. P. N., & Wanders, R. J. A. (2002). 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in a 23-year-old man. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *25*(6). https://doi.org/10.1023/A:1021251202287

84. Oppermann, U. C. T., Salim, S., Tjernberg, L. O., Terenius, L., & Jörnvall, H. (1999). Binding of amyloid β-peptide to mitochondrial hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (ERAB): Regulation of an SDR enzyme activity with implications for apoptosis in Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, *451*(3). https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00586-4

85. Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., … Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): The 2002 update. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 143–144). https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00164-3

86. Ortez, C., Villar, C., Fons, C., Duarte, S. T., Pérez, A., García-Villoria, J., … García-Cazorla, A. (2011). Undetectable levels of CSF amyloid-β peptide in a patient with 17β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Journal of Alzheimer's Disease*, *27*(2). https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110647

87. Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., … Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, *333*(6048). https://doi.org/10.1126/science.1202529

88. Pavlov, P. F., Wiehager, B., Sakai, J., Frykman, S., Behbahani, H., Winblad, B., & Ankarcrona, M. (2011). Mitochondrial γ-secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein. *The FASEB Journal*, *25*(1). https://doi.org/10.1096/fj.10-157230

89. Perez-Cerda, C., & Ribes, A. (2006). Erratum: 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (MHBD) deficiency: An X-linked inborn error of isoleucine metabolism that may mimic a mitochondrial disease (Pediatric Research

(2005) 58 (488-491)). *Pediatric Research*. https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000190664.69081.f1

90. Persson, T., Popescu, B. O., & Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. https://doi.org/10.1155/2014/427318

91. Poll-The, B. T., Wanders, R. J. A., Ruiter, J. P. N., Ofman, R., Majoie, C. B. L. M., Barth, P. G., & Duran, M. (2004). Spastic diplegia and periventricular white matter abnormalities in 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, a defect of isoleucine metabolism: Differential diagnosis with hypoxic-ischemic brain diseases. *Molecular Genetics and Metabolism*, *81*(4). https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.11.013

92. Porcu, P., Barron, A. M., Frye, C. A., Walf, A. A., Yang, S. Y., He, X. Y., … Melcangi, R. C. (2016). Neurosteroidogenesis Today: Novel Targets for Neuroactive Steroid Synthesis and Action and Their Relevance for Translational Research. *Journal of Neuroendocrinology*. https://doi.org/10.1111/jne.12351

93. Powell, A. J., Read, J. A., Banfield, M. J., Gunn-Moore, F., Yan, S. D., Lustbader, J., … Brady, R. L. (2000). Recognition of structurally diverse substrates by type II 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH II)/amyloid-β binding alcohol dehydrogenase (ABAD). *Journal of Molecular Biology*, *303*(2). https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4139

94. Pozzi, S., Benedusi, V., Maggi, A., & Vegeto, E. (2006). Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1089). https://doi.org/10.1196/annals.1386.035

95. Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Gemma-Claire, A., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International*. https://doi.org/10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x

96. Rauschenberger, K., Schöler, K., Sass, J. O., Sauer, S., Djuric, Z., Rumig, C., … Zschocke, J. (2010). A non-enzymatic function of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 is required for mitochondrial integrity and cell survival.

EMBO Molecular Medicine. https://doi.org/10.1002/emmm.200900055

97. Ren, Y., Hong, W. X., Davey, F., Taylor, M., Aiton, J., Coote, P., … Gunn-Moore, F. J. (2008). Endophilin I expression is increased in the brains of Alzheimer disease patients. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(9). https://doi.org/10.1074/jbc.M707932200

98. Richardson, A., Berry, G. T., Garganta, C., & Abbott, M. A. (2017). Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase type 10 disease in siblings. In *JIMD Reports* (Vol. 32). https://doi.org/10.1007/8904_2016_547

99. Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*. https://doi.org/10.1007/s00401-004-0952-x

100. Sarter, M., & Bruno, J. P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: Toward a unifying hypothesis. *Brain Research Reviews*. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(96)00009-4

101. Sass, J. O., Forstner, R., & Sperl, W. (2004). 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency: Impaired catabolism of isoleucine presenting as neurodegenerative disease. *Brain and Development*, *26*(1). https://doi.org/10.1016/S0387-7604(03)00071-8

102. Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, *199*(2). https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90094-A

103. Schmidt, M., Benek, O., Vinklarova, L., Hrabinova, M., Zemanova, L., Chribek, M., … Musilek, K. (2020). Benzothiazolyl ureas are low micromolar and uncompetitive inhibitors of 17B-HSD10 with implications to Alzheimer's disease treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6). https://doi.org/10.3390/ijms21062059

104. Scrimgeour, E. M., & Welch, J. S. (1984). Angiostrongylus cantonensis in East New Britain, Papua New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *78*(6). https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90016-6

105. Seaver, L. H., He, X. Y., Abe, K., Cowan, T., Enns, G. M., Sweetman, L., … Yang, S. Y. (2011). A novel mutation in the HSD17B10 gene of a 10-year-old boy with refractory epilepsy, choreoathetosis and learning disability. *PLoS ONE*, *6*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027348

106. Shafqat, N., Marschall, H. U., Filling, C., Nordling, E., Wu, X. Q., Björk, L., … Oppermann, U. (2003). Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17 β-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: Characterization of multifunctional 3α/7α/7β/17β/20β/21-HSD. *Biochemical Journal*, *376*(1). https://doi.org/10.1042/BJ20030877

107. Silbernagl, S., & Lang, F. (2001). *Atlas patofyziologie člověka*. Grada.

108. Srinivasan, B. (2021). A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond. *FEBS Journal*. https://doi.org/10.1111/febs.16124

109. Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, *8*(6). https://doi.org/10.1002/ca.980080612

110. Sultana, R., & Butterfield, D. A. (2008). Redox proteomics studies of in vivo amyloid beta-peptide animal models of Alzheimer's disease: Insight into the role of oxidative stress. *Proteomics - Clinical Applications*. https://doi.org/10.1002/prca.200780024

111. Summers, W. K., Viesselman, J. O., Marsh, G. M., & Candelora, K. (1981). Use of THA in treatment of Alzheimer-like dementia: Pilot study in twelve patients. *Biological Psychiatry*, *16*(2).

112. Sutton, V. R., O'Brien, W. E., Clark, G. D., Kim, J., & Wanders, R. J. A. (2003). 3-Hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. Journal of inherited metabolic disease, 26(1), 69 71. https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024083715568

113. Taipa, R., Pinho, J., & Melo-Pires, M. (2012). Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias. *Frontiers in Neurology*, *MAY*. https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00068

114. Takuma, K., Fang, F., Zhang, W., Yan, S., Fukuzaki, E., Du, H., … Yan, S. S. Du. (2009). RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-β and neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(47). https://doi.org/10.1073/pnas.0905686106

115. Teixeira, J., Silva, T., Andrade, P., & Borges, F. (2013). Alzheimer's Disease and Antioxidant Therapy: How Long How Far? *Current Medicinal Chemistry*, *20*(24). https://doi.org/10.2174/1871523011320240001

116. Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., … Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, *30*(4). https://doi.org/10.1002/ana.410300410

117. Tieu, K., Perier, C., Vila, M., Caspersen, C., Zhang, H. P., Teismann, P., … Przedborski, S. (2004). L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase II protects in a model of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *56*(1). https://doi.org/10.1002/ana.20133

118. Trauger, J. W., Jiang, A., Stearns, B. A., & LoGrasso, P. V. (2002). Kinetics of allopregnanolone formation catalyzed by human 3α-hydroxysteroid dehydrogenase type III (AKR1C2). *Biochemistry*, *41*(45). https://doi.org/10.1021/bi026109w

119. Trojanowski, J. Q., & Mattson, M. P. (2003). Overview of Protein Aggregation in Single, Double, and Triple Neurodegenerative Brain Amyloidoses. *NeuroMolecular Medicine*. https://doi.org/10.1385/NMM:4:1-2:1

120. Tucker, R. P. (1990). The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Research Reviews*. https://doi.org/10.1016/0165-0173(90)90013-E

121. Vilardo, E., & Rossmanith, W. (2015). Molecular insights into HSD10 disease: Impact of SDR5C1 mutations on the human mitochondrial RNase P complex. *Nucleic Acids Research*, *43*(10). https://doi.org/10.1093/nar/gkv408

122. Vinklářová, L., Schmidt, M., Benek, O., Kuča, K., Gunn-Moore, F., & Musílek, K.

(2020). Friend or enemy? Review of 17β-HSD10 and its role in human health or disease. *Journal of Neurochemistry*. https://doi.org/10.1111/jnc.15027

123. W., J., & Snedecor, G. W. (1946). Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. *Journal of the Royal Statistical Society*, *109*(4). https://doi.org/10.2307/2981342

124. Wang, Y., & Ha, Y. (2004). The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Molecular Cell*, *15*(3). https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.037

125. Waters, P. J., Lace, B., Buhas, D., Gravel, S., Cyr, D., Boucher, R. M., … Maranda, B. (2019). HSD10 mitochondrial disease: p.Leu122Val variant, mild clinical phenotype, and founder effect in French-Canadian patients from Quebec. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *7*(12). https://doi.org/10.1002/mgg3.1000

126. Wilk, M. B., & Gnanadesikan, R. (1968). Probability plotting methods for the analysis of data. *Biometrika*, *55*(1). https://doi.org/10.1093/biomet/55.1.1

127. Xie, Y., Deng, S., Chen, Z., Yan, S., & Landry, D. W. (2006). Identification of small-molecule inhibitors of the Aβ-ABAD interaction. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *16*(17). https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.099

128. Yan, S. Du, Fu, J., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., Al-Mohanna, F., … Stern, D. (1997). An intracellular protein that binds amyloid-β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, *389*(6652). https://doi.org/10.1038/39522

129. Yan, S. Du, Shi, Y., Zhu, A., Fu, J., Zhu, H., Zhu, Y., … Stern, D. M. (1999). Role of ERAB/L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase type II activity in Aβ-induced cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(4). https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2145

130. Yan, Y., Liu, Y., Sorci, M., Belfort, G., Lustbader, J. W., Yan, S. S. Du, & Wang, C. (2007). Surface plasmon resonance and nuclear magnetic resonance studies of ABAD-Aβ interaction. *Biochemistry*, *46*(7). https://doi.org/10.1021/bi061314n

131. Yang, S. Y., Dobkin, C., He, X. Y., & Brown, W. T. (2013). Transcription start sites and epigenetic analysis of the HSD17B10 proximal promoter. *BMC Biochemistry*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2091-14-17

132. Yang, S. Y., He, X. Y., Isaacs, C., Dobkin, C., Miller, D., & Philipp, M. (2014). Roles of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in neurodegenerative disorders. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.001

133. Yang, S. Y., He, X. Y., & Miller, D. (2007). HSD17B10: A gene involved in cognitive function through metabolism of isoleucine and neuroactive steroids. *Molecular Genetics and Metabolism*. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.06.001

134. Yang, S. Y., He, X. Y., & Miller, D. (2011). Hydroxysteroid (17β) dehydrogenase X in human health and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.011

135. Yang, S. Y., He, X. Y., Olpin, S. E., Sutton, V. R., McMenamin, J., Philipp, M., … Malik, M. (2009). Mental retardation linked to mutations in the HSD17B10 gene interfering with neurosteroid and isoleucine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(35). https://doi.org/10.1073/pnas.0902377106

136. Yao, J., Du, H., Yan, S., Fang, F., Wang, C., Lue, L. F., … Yan, S. S. Du. (2011). Inhibition of amyloid-β(Aβ) peptide-binding alcohol dehydrogenase-Aβ interaction reduces Aβ accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *31*(6). https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4717-10.2011

137. Yao, J., Taylor, M., Davey, F., Ren, Y., Aiton, J., Coote, P., … Gunn-Moore, F. J. (2007). Interaction of amyloid binding alcohol dehydrogenase/Aβ mediates up-regulation of peroxiredoxin II in the brains of Alzheimer's disease patients and a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *35*(2). https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.03.013

138. Zschocke, J. (2012). HSD10 disease: Clinical consequences of mutations in the HSD17B10 gene. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(1).

https://doi.org/10.1007/s10545-011-9415-4

139. Zschocke, J., Ruiter, J. P. N., Brand, J., Lindner, M., Hoffmann, G. F., Wanders, R. J. A., & Mayatepek, E. (2000). Progressive infantile neurodegeneration caused by 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency: A novel inborn error of branched-chain fatty acid and isoleucine metabolism. *Pediatric Research*, *48*(6). https://doi.org/10.1203/00006450-200012000-00025